



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ-ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ**

**«ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΩΝ ΑΔΡΕΝΕΡΓΙΚΩΝ ΚΑΙ ΝΤΟΠΑΜΙΝΕΡΓΙΚΩΝ
ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ ΣΤΗ ΡΥΘΜΙΣΗ
ΤΩΝ ΚΥΤΟΧΡΩΜΑΤΩΝ CYP3A1/2, CYP2C11 ΚΑΙ CYP2D1/2»**

**ΔΑΣΚΑΛΟΠΟΥΛΟΣ ΕΥΑΓΓΕΛΟΣ-ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ
ΦΑΡΜΑΚΟΠΟΙΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ, 2012



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ-ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ**

**«ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΩΝ ΑΔΡΕΝΕΡΓΙΚΩΝ ΚΑΙ ΝΤΟΠΑΜΙΝΕΡΓΙΚΩΝ
ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ ΣΤΗ ΡΥΘΜΙΣΗ
ΤΩΝ ΚΥΤΟΧΡΩΜΑΤΩΝ CYP3A1/2, CYP2C11 ΚΑΙ CYP2D1/2»**

**ΔΑΣΚΑΛΟΠΟΥΛΟΣ ΕΥΑΓΓΕΛΟΣ-ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ
ΦΑΡΜΑΚΟΠΟΙΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ, 2012

Ημερομηνία αίτησης του κ Δασκαλόπουλου Ευάγγελου -Παναγιώτη: 12-9-2006

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 589^α/3-10-2006

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπουσα

Κωνσταντή Μαρία Επίκουρη Καθηγήτρια Φαρμακολογίας Ιατρικής Σχολής πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Μαρσέλος Μάριος –Αθανάσιος Καθηγητής Φαρμακολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Κωνσταντόπουλος Σταύρος Καθηγητής Παθολογίας –Πνευμονολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 17-10-2006

«Ο ρόλος των αδρενεργικών και ντοπαμινεργικών συστημάτων στη ρύθμιση των κυτοχρωμάτων CYP3A1/2, CYP2C11 και CYP2D1/2»

ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 725^α/6-12-2011

Ευαγγέλου Άγγελος	Καθηγητής Φυσιολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Κωνσταντόπουλος Σταύρος	τ. Καθηγητής Παθολογίας -Πνευμονολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Μαρσέλος Μάριος –Αθανάσιος	Καθηγητής Φαρμακολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Καλφακάκου Βασιλική	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Κωνσταντή Μαρία	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φαρμακολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Σύρρου Μαρίκα	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Γενικής Βιολογίας –Ιατρικής Γενετικής, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Παππός Περικλής	Επίκουρος Καθηγητής Φαρμακολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 22-12-2011

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ Η Γραμματέας της Σχολής

Μαργαρίτα Τζαφλίδου
Καθηγήτρια Ιατρικής Φυσικής



ΜΑΡΙΑ ΚΑΠΙΤΟΠΟΥΛΟΥ

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)».

*Στους γονείς μου,
Γιώργο και Κατερίνα,*

Στην Βασιλική,

*Στη γιαγιά μου, Άννα
και στη μνήμη των δύο αγαπημένων μου παππούδων, Βαγγέλη και Ζώη
και της γιαγιάς μου, Ευγενίας.*

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η μελέτη αυτή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας της Ιατρικής σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, κατά το χρονικό διάστημα 2006-2011, υπό την επίβλεψη της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας κυρίας Μαρίας Κωνσταντή. Η Διδακτορική αυτή Διατριβή δε θα είχε ολοκληρωθεί χωρίς την αμέριστη βοήθεια και ενεργή συμμετοχή όλων των μελών του Εργαστηρίου Φαρμακολογίας, της οικογένειας και των φίλων μου. Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά:

- Τον Καθηγητή Φαρμακολογίας, κύριο **Μάριο-Αθανάσιο Μαρσέλο**, Διευθυντή του Εργαστηρίου Φαρμακολογίας, ο οποίος μου έδωσε τη δυνατότητα να γίνω μέλος της πανεπιστημιακής κοινότητας και έθεσε στη διάθεσή μου όλη την υλικοτεχνική υποδομή του Εργαστηρίου Φαρμακολογίας. Θα ήθελα να του εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου γιατί ήταν πάντα πρόθυμος να βοηθήσει σε κάθε πρόβλημα που αντιμετώπιζα. Επιπροσθέτως ήταν συνεχής πηγή έμπνευσης καθώς και παράγοντας ηρεμίας και σιγουριάς για όλο το Εργαστήριο.

- Την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φαρμακολογίας, κυρία **Μαρία Κωνσταντή**, επιβλέπουσά μου, για την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος της Διδακτορικής Διατριβής. Η καθοδήγηση και η βοήθεια της ήταν συνεχής. Θα ήθελα να της εκφράσω την εκτίμηση, την αγάπη και την αμέριστη ευγνωμοσύνη μου για την εμπιστοσύνη που επέδειξε στο πρόσωπό μου, την συνεχή της καθοδήγηση, την υπομονή της καθώς και τις συμπαράστασή της σε θέματα ενδο- αλλά και εξω-εργαστηριακά.

- Τον Καθηγητή Πνευμονολογίας, κύριο **Σταύρο Κωνσταντόπουλο**, ο οποίος με καθοδηγούσε και με συμβούλευε συνεχώς και ήταν πάντα διαθέσιμος για κάθε απορία ή πρόβλημα που προέκυπτε με την Διδακτορική Διατριβή.

- Τον Επίκουρο Καθηγητή Φαρμακολογίας, κύριο **Περικλή Παππά** για την άριστη πολυεπίπεδη συνεργασία του, την συνεχή καθοδήγησή του σε θέματα που άπτονταν της εξειδίκευσής του και το ευχάριστο κλίμα που πάντα δημιουργούσε στο Εργαστήριο.

- Την Επίκουρη Καθηγήτρια Φαρμακολογίας, κυρία **Κατερίνα Αντωνίου**, η οποία είχε πάντα χρόνο για απορίες ή επίλυση προβλημάτων που τυχόν προέκυπταν. Επίσης, θα ήθελα να την

ευχαριστήσω για την διδακτική της καθοδήγηση στην εργαστηριακή εκπαίδευση των φοιτητών.

- Την Καθηγήτρια Μικροβιολογίας κυρία **Σταματίνα Λεβειδιώτου-Στεφάνου** για την συνεργασία της και την πολύτιμη βοήθεια της με την προσφορά της υλικοτεχνικής υποδομής του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας, ειδικά πρὸς το τέλος του πειραματικού μέρους της Διδακτορικής μου Διατριβής.

- Την κυρία **Φωτεινή Μάλλιου**, υποψήφια Διδάκτορα της Ιατρικής Σχολής, που προσέφερε υπερπολύτιμη βοήθεια στους τελευταίους μήνες την Διδακτορικής μου Διατριβής. Πραγματικά της χρωστάω πολλά, για την ανεκτίμητη βοήθειά της και την επιμονή της να με βοηθά ατέλειωτες ώρες στο εργαστήριο, αλλά και να με στηρίζει ως πραγματική φίλη.

- Τις κυρίες **Όλγα Κωτσόβολου** και **Γεωργία Ρέντση**, Διδάκτορες της Ιατρικής Σχολής, για την εκμάθηση διαφόρων μοριακών πειραματικών τεχνικών, την ειλικρινή φιλία τους και την ανεκτίμητη βοήθειά τους στα αρχικά βήματα αυτής της Διδακτορικής Διατριβής.

- Τις Διδάκτορες της Ιατρικής Σχολής, κυρία **Μάρθα Νικολαΐδου** και κυρία **Όλγα Χουλιάρρα** καθώς και τους υποψήφιους Διδάκτορες, κύριο **Παναγιώτη Χαρκίτη**, κυρία **Μαριάνθη Σωτηροπούλου**, κυρία **Ειρήνη Μπιζιώτα** και κύριο **Λεωνίδα Μαυροειδή** για την άριστη πολυεπίπεδη συνεργασία τους σε όλες τις φάσεις της Διατριβής μου καθώς και για την φιλία τους.

- Τις κυρίες **Ακυλίνα Μπαλωμένου** και **Όλγα Τσουμάνη** για τη αρωγή τους σε όλα τα θέματα που άπτονταν των αρμοδιοτήτων τους και για τις συμβουλές τους καθ' όλη τη διάρκεια της Διδακτορικής μου Διατριβής.

- Τους κύριους **Αθανάσιο Βέρρο** και **Αποστόλη Μπίλλη** για τη άριστη συνεργασία τους σε ότι είχε να κάνει με το Εκτροφείο Πειραματοζώων, καθώς και για την προθυμία τους να βοηθούν όπου προέκυπτε ανάγκη.

- Όλα τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου Φαρμακολογίας (μεταπτυχιακούς φοιτητές κτλ) καθώς και των άλλων Εργαστηρίων της Ιατρικής Σχολής που με βοήθησαν σε τεχνικό

επίπεδο, όπως επίσης και το προσωπικό της Γραμματείας της Ιατρικής Σχολής Ιωαννίνων για την βοήθειά τους στην διεκπεραίωση των γραφειοκρατικών θεμάτων της Διδακτορικής Διατριβής.

- Την γιαγιά μου **Άννα Παπανικολάου**, που με την αγνή αγάπη της με ενθάρρυνε πάντα να συνεχίζω την προσπάθεια και με έμαθε να επιμένω στο στόχο μου χωρίς να παύω ποτέ να είμαι ο εαυτός μου.

- Όλους τους φίλους που στάθηκαν δίπλα μου (ακόμα και όταν βρίσκονταν εκατοντάδες χιλιόμετρα μακριά) αυτά τα χρόνια και με στήριξαν σε αυτό το έργο. Ειδική αναφορά πρέπει να γίνει στον κουμπάρο μου **Παρασκευά Τζαναβάρα**, ο οποίος είναι κάτι παραπάνω από "καλύτερος μου φίλος" και θα του χρωστώ για πάντα.

- Την **Βασιλική Πάσογλου**, η οποία με συντροφεύει χρονικά σχεδόν από την αρχή αυτής της Διδακτορικής Διατριβής, με κάνει πραγματικά ευτυχισμένο και με στήριξε όλα αυτά τα χρόνια σε κάθε (λογική ή μη) επιλογή μου.

- Πάνω από όλους, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου, **Γιώργο Δασκαλόπουλο** και **Κατερίνα Δασκαλοπούλου-Παπανικολάου**, οι οποίοι πραγματικά έδωσαν και συνεχίζουν να δίνουν τα πάντα, στηρίζοντάς με σε ότι ήθελα να επιτύχω. Η αγάπη και η αφοσίωσή τους τους είναι κάτι το ανεκτίμητο και σίγουρα τους χρωστώ πάρα πολλά από όσα έχω επιτύχει μέχρι τώρα στη ζωή μου.

Ιωάννινα, Ιανουάριος 2012

Ευάγγελος-Παναγιώτης Δασκαλόπουλος

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1. ΣΤΡΕΣ	1
1.1. Οι έννοιες της ομοιόστασης και του στρες	1
1.2. Παράγοντες που επηρεάζουν την αντίδραση στο στρες	3
1.2.1. Υποθαλαμο-Υποφυσιο-Επινεφριδιακός άξονας και ρόλος των γλυκοκορτικοειδών	4
1.2.2. Συμπαθητικό και παρασυμπαθητικό σύστημα	8
1.2.3. Άλλοι παράγοντες ρύθμισης της αντίδρασης στο στρες	10
1.3. Παθοφυσιολογία συνδεδεμένη με τη φυσιολογική αντίδραση στο στρες	11
1.4. Το στρες στις μοντέρνες κοινωνίες	19
2. ΗΠΑΤΙΚΟΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΚΥΤΟΧΡΩΜΑΤΑ	20
2.1. Γενικά περί ηπατικού μεταβολισμού ξеноβιοτικών	20
2.2. Κυτοχρώματα CYPs	28
2.2.1. Γενικά	28
2.2.2. Υποοικογένεια CYP3A	33
2.2.3. Υποοικογένεια CYP2C	43
2.2.4. Υποοικογένεια CYP2D	52
2.2.5. Υποοικογένεια CYP2A	61
3. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΟΧΡΩΜΑΤΩΝ CYPs	64
3.1. Γενικά	64
3.2. Πυρηνικοί μεταγραφικοί παράγοντες	71
3.2.1. CAR	75
3.2.2. PXR	76
3.2.3. RXR	79
3.2.4. HNF	81
3.3. Γλυκοκορτικοειδή και στρες	85
3.3.1. Γλυκοκορτικοειδή και CYPs	85
3.3.2. Στρες και CYPs	88
3.4. Ορμόνες	92
3.4.1. Θυρεοειδικές ορμόνες	92
3.4.2. Αυξητική ορμόνη και STAT5b	95

3.5. Ινσουλίνη και ρύθμιση των CYPs: ρόλος των D₂-ντοπαμινεργικών υποδοχέων.....	98
3.5.1. Ινσουλίνη.....	98
3.5.2. Ο ρόλος της Ινσουλίνης στην ενεργοποίηση του μονοπατιού PI3K/Akt.....	99
3.5.3. Σχέση Ινσουλίνης και μονοπατιού PI3K/Akt/mTOR/p70S6k στην ρύθμιση των CYPs.....	103
3.5.4. Ρύθμιση των CYPs από την Ινσουλίνη: ρόλος του μονοπατιού PI3K/Akt/NO.....	104
3.5.5. Ρύθμιση των CYPs από την Ινσουλίνη: ρόλος του μονοπατιού PI3K/Akt/FoxO1.....	107
3.5.6. Ινσουλίνη και ο ρόλος των D ₂ -ντοπαμινεργικών υποδοχέων στη ρύθμιση των CYPs.....	110
3.5.7. Ινσουλίνη και ο ρόλος των α ₂ -αδρενεργικών υποδοχέων στη ρύθμιση των CYPs.....	113
3.6. Μονοπάτι των MAPK.....	115
3.6.1. JNK.....	116
3.7. Μονοπάτι cAMP/PKA.....	118

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	122
---------------------------	------------

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	124
--------------------------	------------

1. Πειραματόζωα.....	124
2. Πειραματικά μοντέλα πρόκλησης στρες.....	126
2.1. Στρες Περιορισμού (Restraint Stress - RS).....	126
2.2. Στρες Μητρικής Αποστέρησης (Maternal Deprivation Stress - MDS).....	127
3. Απομόνωση και καλλιέργεια πρωτογενών ηπατοκυττάρων από ήπαρ επίμυος.....	132
3.1. Διαδικασία απομόνωσης πρωτογενών ηπατοκυττάρων.....	132
3.2. Ποσοτικός προσδιορισμός κυττάρων και τοποθέτησή τους σε πιάτα με επικάλυψη κολλαγόνου.....	136
3.3. Αξιολόγηση της βιωσιμότητας των ηπατοκυττάρων.....	138
4. Φάρμακα - χημικές ουσίες.....	139

4.1. <i>In vivo</i> αξιολόγηση της επίδρασης του στρες και των αδρενεργικών μονοπατιών, στη ρύθμιση των κυτοχρωμάτων <i>CYPs</i>	139
4.2. <i>In vivo</i> αξιολόγηση της επίδρασης των D ₂ -ντοπαμινεργικών μονοπατιών, στη ρύθμιση των κυτοχρωμάτων <i>CYPs</i>	140
4.3. <i>In vitro</i> αξιολόγηση της επίδρασης του συστήματος των αδρενεργικών μονοπατιών στη ρύθμιση των κυτοχρωμάτων <i>CYPs</i>	141
4.4. <i>In vitro</i> αξιολόγηση της επίδρασης του συστήματος των ντοπαμινεργικών μονοπατιών, της ινσουλίνης και του μονοπατιού PI3K/Akt στη ρύθμιση των κυτοχρωμάτων <i>CYPs</i>	142
5. Θυσία των πειραματόζωων, απομόνωση και προσδιορισμός πρωτεϊνών-RNA.....	144
5.1. Επεξεργασία του ήπατος - ομογενοποίηση - απομόνωση κυτταροπλάσματος και μικροσωματίων.....	144
5.2. Προσδιορισμός πρωτεϊνών από μικροσωμάτια.....	145
5.3. Επεξεργασία του ήπατος - ομογενοποίηση - απομόνωση ολικών πρωτεϊνών (total cellular protein extraction).....	146
5.4. Απομόνωση RNA.....	149
6. Ορμονικοί προσδιορισμοί.....	153
7. Μετρήσεις δραστηριότητας των ενζύμων με την μέθοδο της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC).....	154
7.1. Προσδιορισμός πρωτεϊνών.....	154
7.2. Ανάλυση δειγμάτων με τη την μέθοδο της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC).....	154
8. Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κατά Western Blot.....	160
8.1. Ανοσοαποτύπωση κατά Western Blot σε μικροσωμιακές πρωτεΐνες.....	160
8.2. Ανοσοαποτύπωση κατά Western Blot σε φωσφορυλιωμένες πρωτεΐνες.....	165
9. Μεταγραφή του RNA σε cDNA και προσδιορισμός έκφρασης mRNA με τη μέθοδο RT-PCR.....	167
9.1. Μεταγραφή του RNA σε cDNA με τη μέθοδο της Αντίστροφης Μεταγραφής (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction).....	167
9.2. Προσδιορισμός έκφρασης mRNA με τη μέθοδο της Αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real Time PCR).....	169
10. Στατιστική ανάλυση.....	176

1. ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΣΤΡΕΣ ΚΑΙ ΤΩΝ ΑΔΡΕΝΕΡΓΙΚΩΝ ΜΟΝΟΠΑΤΙΩΝ ΣΤΗ**ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΚΥΤΟΧΡΩΜΑΤΩΝ CYPs.....178****1.1. Επίπεδα ορμονών μετά από έκθεση επιμύων σε στρες.....179****1.2. *In vivo* διερεύνηση της επίδρασης του στρες στην έκφραση των CYPs.....180**

1.2.1. CYP3A1/2.....180

1.2.2. CYP2C11.....182

1.2.3. CYP2D1/2.....184

1.2.4. CYP2A1.....186

1.3. *In vivo* διερεύνηση της επίδρασης των γλυκοκορτικοειδών στην έκφραση**των CYPs.....187**

1.3.1. CYP3A1/2.....187

1.3.2. CYP2C11.....189

1.4. *In vitro* διερεύνηση της επίδρασης των γλυκοκορτικοειδών στην έκφραση**των CYPs.....191****1.5. *In vitro* διερεύνηση του ρόλου της EPI στην έκφραση των CYPs.....193****1.6. *In vitro* διερεύνηση του ρόλου των αδρενεργικών οδών στην έκφραση των****CYPs.....195**

1.6.1. CYP3A1.....195

1.6.2. CYP3A2.....197

1.6.3. CYP2C11.....199

1.6.4. CYP2D1.....201

1.6.5. CYP2D2.....203

1.7. *In vivo* διερεύνηση του ρόλου των αδρενεργικών οδών στην έκφραση των**CYPs.....205**

1.7.1. CYP3A1/2.....205

1.7.2. CYP2C11.....207

1.7.3. CYP2D1/2.....209

1.7.4. CYP2A1.....211

1.8. *In vivo* διερεύνηση της επίδρασης των αδρενεργικών οδών στην**ενεργοποίηση του STAT5b.....212****1.9. *In vivo* διερεύνηση της επίδρασης του στρες στην ενεργοποίηση του****STAT5b.....213**

1.10. <i>In vivo</i> διερεύνηση της επίδρασης του στρες στην έκφραση των πυρηνικών μεταγραφικών παραγόντων που ρυθμίζουν τα <i>CYPs</i>	214
1.11. <i>In vivo</i> διερεύνηση του ρόλου των αδρενεργικών οδών στην έκφραση των πυρηνικών μεταγραφικών παραγόντων που ρυθμίζουν τα <i>CYPs</i>	216
1.12. <i>In vivo</i> διερεύνηση του ρόλου των αδρενεργικών οδών στην μεταβολή των επιπέδων των κυτοκινών.....	218
2. ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ D₂-ΝΤΟΠΑΜΙΝΕΡΓΙΚΩΝ ΜΟΝΟΠΑΤΙΩΝ ΣΤΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΚΥΤΟΧΡΩΜΑΤΩΝ <i>CYPs</i>.....	219
2.1. <i>In vivo</i> διερεύνηση της επίδρασης των D ₂ -ντοπαμινεργικών οδών στην έκφραση των <i>CYPs</i>	220
2.1.1. <i>CYP3A1/2</i>	220
2.1.2. <i>CYP2C11</i>	222
2.1.3. <i>CYP2D1/2</i>	224
2.2. <i>In vitro</i> διερεύνηση του ρόλου των D ₂ -ντοπαμινεργικών οδών στην έκφραση των <i>CYPs</i>	226
2.3. <i>In vitro</i> διερεύνηση του ρόλου της ινσουλίνης στην έκφραση των <i>CYPs</i>	228
2.4. <i>In vivo</i> διερεύνηση της εμπλοκής του μονοπατιού της PI3K/Akt στη ρύθμιση της έκφρασης των <i>CYPs</i>	230
2.5. <i>In vivo</i> διερεύνηση της επίδρασης της Sulp στην ενεργοποίηση του FoxO1.....	231
2.6. <i>In vivo</i> διερεύνηση της επίδρασης της Sulp στην ενεργοποίηση του STAT5b.....	232
2.7. Επίπεδα ορμονών μετά από αναστολή των D ₂ -ντοπαμινεργικών υποδοχέων.....	233
2.8. <i>In vivo</i> διερεύνηση του ρόλου των D ₂ -ντοπαμινεργικών οδών στην έκφραση των πυρηνικών μεταγραφικών παραγόντων που ρυθμίζουν τα <i>CYPs</i>	234
2.9. <i>In vivo</i> διερεύνηση της επίδρασης του Sulp στην έκφραση του NO.....	236
<u>ΣΥΖΗΤΗΣΗ</u>	238
<u>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</u>	246
<u>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</u>	250

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

- ACTH**, αδρενοκορτικοτρόπος ορμόνη
- ΑΝΣ**, Αυτόνομο Νευρικό Σύστημα
- AR**, αδρενεργικός υποδοχέας
- AVP**, αργινίνη-βαζοπρεσίνη
- BSA**, αλβουμίνη βόειου ορού
- C**, πειραματόζωα μάρτυρες (control)
- cAMP/PKA**, μονοπάτι κυκλικού AMP/πρωτεϊνικής κινάσης A
- CAR**, constitutive androstane receptor
- cDNA**, κυκλικό DNA
- CORT**, κορτικοστερόνη
- CRH**, κορτικοτροπίνη
- CYPs**, κυτοχρώματα
- DA**, ντοπαμίνη
- DBD**, περιοχή πρόσδεσης DNA
- DEXT**, δεξμεντετομιδίνη
- DM**, δεξαμεθαζόνη
- EDTA**, αιθυλενο-διαμινο-τετραοξικό οξύ
- eNOS**, ενδοθηλιακή συνθάση του NO
- EPI**, επινεφρίνη
- FoxO1**, Forkhead box protein O1
- GAPDH**, αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης
- GH**, αυξητική ορμόνη
- GR**, υποδοχέας των γλυκοκορτικοειδών
- HNF1α/4α**, hepatocyte nuclear factor 1α/4α
- HPLC**, υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης
- IL**, ιντερλευκίνη
- iNOS**, επαγωγίμη συνθάση του NO
- INS**, ινσουλίνη
- ISOP**, ισοπρεναλίνη
- JNK**, c-Jun N-terminal kinase
- ΚΝΣ**, Κεντρικό Νευρικό Σύστημα

LBD, περιοχή πρόσδεσης συνδέτη

MAPK, mitogen-activated protein kinase

MDR, επίμυες που ανταποκρίνονται στο στρες μητρικής αποστέρησης

MDS, στρες μητρικής αποστέρησης

MDNR, επίμυες που δεν ανταποκρίνονται στο στρες μητρικής αποστέρησης

mRNA, αγγελιοφόρο RNA

NADPH, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

NaOV, sodium orthovanadate (αναστολέας PKA)

NE, νορεπινεφρίνη

PI3K/Akt, μονοπάτι Phosphoinositide Kinase-3/Akt

RS, στρες περιορισμού

P70S6K, 70-kDa ribosomal protein S6 kinase

PVN, παρακοιλιακός πυρήνας

PXR, pregnane X receptor

RIPA, radio-immuno-precipitation assay

RT-PCR, αλυσιδωτή αντίδραση πολυμερισμού αντίστροφης μεταγραφής

RXR α , retinoid X receptor α

STAT5b, signal transducer and activator of transcription 5b

SULP, σουλπιρίδη

T3, τριϊωδοθυρονίνη

T4, θυροξίνη

TH, θυρεοειδικές ορμόνες

TNF- α , α -ογκονεκρωτικός παράγοντας

TSH, θυρεοτρόπος ορμόνη

WORT, wortmannin (αναστολέας PI3K)

ΥΥΕ άξονας, Υποθαλαμο-Υποφυσιο-Επινεφριδιακός άξονας (HPA axis)

Φ/O, φυσιολογικός ορός

\pm S.E, \pm τυπικό σφάλμα

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

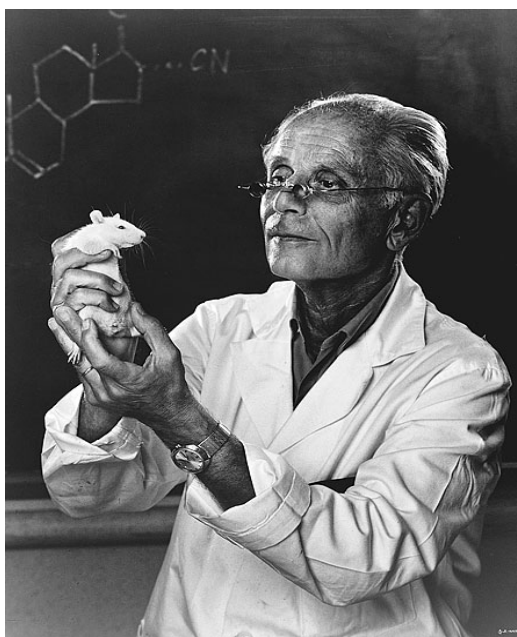
1. ΣΤΡΕΣ

1.1. Οι έννοιες της ομοιόστασης και του στρες

Όλοι οι ζωντανοί οργανισμοί επιβιώνουν μέσω της διατήρησης μιας πολύπλοκης δυναμικής και συγχρόνως αρμονικής ισορροπίας (ομοιόσταση). Αυτή η κατάσταση ισορροπίας συνεχώς επηρεάζεται από εσωτερικούς ή εξωτερικούς παράγοντες (στρεσογόνοι παράγοντες). Επομένως, το στρες μπορεί να περιγραφεί ως μια κατάσταση δυσαρμονίας, κατά την οποία απειλείται η ομοιόσταση ενός οργανισμού. Η επαναφορά της αρμονίας του συστήματος επιτυγχάνεται μέσω πολύπλοκων μηχανισμών προσαρμογής, οι οποίοι περιλαμβάνουν συμπεριφορικές αλλά και φυσιολογικές αντιδράσεις (Chrousos, 2009).

Η έννοια της ομοιόστασης ως γενικής αρχής της ισορροπίας ενός ζώντος οργανισμού, περιγράφηκε πρώτα από τους Αρχαίους Έλληνες. Ο Εμπεδοκλής πρότεινε την ιδέα ότι αυτή η ισορροπία είναι αναγκαία συνθήκη για τη ζωή και την επιβίωση του οργανισμού. Αργότερα, ο Ιπποκράτης διατύπωσε την θεωρία ότι όταν επικρατεί ισορροπία μεταξύ των στοιχείων της φύσης, τα οποία επηρεάζουν τη ζωή, διατηρείται η υγεία. Σε περιπτώσεις που η ισορροπία αυτή διαταραχθεί, ο οργανισμός ασθενεί. Στις αρχές του 19^{ου} αιώνα ο Claude Bernard εξέφρασε την θεωρία του "*milieu intérieur*" που θα μπορούσε να μεταφραστεί ως "εσωτερική δυναμική ισορροπία", ενώ λίγο αργότερα ο Αμερικανός Φυσιολόγος Walter Cannon μίλησε για την σημασία της "ομοιόστασης". Η έννοια του "στρες" πάντως χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από τον Ουγγροκαναδό ερευνητή Hans Selye (**Εικόνα 1**) την δεκαετία του '50, όταν και δημοσίευσε το σπουδαίο έργο του "Το Στρες της Ζωής" ("The Stress of Life") (Chrousos and Gold, 1992).

Οι στρεσογόνοι παράγοντες είναι δυνατόν να σχετίζονται με συναισθήματα, π.χ. φόβο, αγωνία ή έκθεση σε ένα καινούριο, άγνωστο, μη-φιλικό περιβάλλον. Επίσης, στρες μπορεί να προκληθεί σε έναν ζωντανό οργανισμό λόγω φυσικών παραγόντων όπως είναι το τραύμα, η αιμορραγία, ο πόνος (οξύς ή χρόνιος), η καταπόνηση από φυσική άσκηση / προσπάθεια, η εξαναγκασμένη ακινητοποίηση, η έκθεση σε ακραίες θερμοκρασίες κ.τ.λ. (Van de Kar and Blair, 1999).



Εικόνα 1: Hans Selye, Ουγγροκαναδός ενδοκρινολόγος και "πατέρας" της έννοιας του στρες.

Κάθε ζωντανός οργανισμός διαθέτει ένα πλουσιότατο οπλοστάσιο πολύπλοκων ομοιοστατικών συστημάτων, τα οποία ελέγχουν αντισταθμιστικούς μηχανισμούς. Αυτοί οι μηχανισμοί ενεργοποιούνται, όταν ο στρεσογόνος παράγοντας ξεπεράσει έναν ουδό συγκεκριμένης βαρύτητας και χρονικής διάρκειας και σκοπό έχουν να αντιστρέψουν την "μη-ομαλή" κατάσταση που τείνει να εγκαταστασθεί και επομένως να προστατεύσουν τον οργανισμό κατά τη διάρκεια οξέων επεισοδίων στρες. Η αντίδραση στο στρες προκαλεί πλήθος επιδράσεων, τόσο στο ΚΝΣ όσο και στην περιφέρεια. Στο ΚΝΣ ενεργοποιούνται νευρικές οδοί, που προκαλούν επαγρύπνηση, διέγερση και εστίαση της προσοχής, ενώ αντιθέτως αναστέλλονται νευρικές οδοί, οι οποίες σχετίζονται με την πρόσληψη τροφής, την ανάπτυξη και την αναπαραγωγή. Επίσης, συμβαίνουν αλλαγές στο καρδιαγγειακό σύστημα (αύξηση της αρτηριακής πίεσης και του καρδιακού ρυθμού), στο αναπνευστικό σύστημα (αύξηση του αναπνευστικού ρυθμού) αλλά και στον μεταβολισμό (αύξηση της γλυκονεογέννεσης και της λιπόλυσης). Όλες αυτές οι διεργασίες έχουν ως σκοπό την καλύτερη παροχή οξυγόνου και θρεπτικών συστατικών στον εγκέφαλο, την καρδιά και τους σκελετικούς μύες, ούτως ώστε να είναι δυνατή η αντίδραση της "**πάλης ή φυγής**" ("*fight or flight*") (Chrousos, 2009).

Πρέπει να αναφερθεί όμως, ότι ο τρόπος με τον οποίο "απαντά" στους διάφορους στρεσογόνους παράγοντες κάθε οργανισμός είναι διαφορετικός. Η ικανότητα ενός ατόμου να αντιδράσει σε ένα συγκεκριμένο στρεσογόνο ερέθισμα

επηρεάζεται σε πολύ μεγάλο βαθμό από γενετικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες, καθώς και από γεγονότα που συνέβησαν κατά τη διάρκεια της ανάπτυξής του. Επομένως, ο βαθμός ενεργοποίησης των μηχανισμών μετά από έκθεση στα στρεσογόνα ερεθίσματα και κατ' επέκτασιν και η ευαισθησία ενός οργανισμού στο χρόνιο στρες, συνδέεται στενά με αυτούς τους παράγοντες (Kyrou and Tsigos, 2009).

1.2. Παράγοντες που επηρεάζουν την αντίδραση στο στρες

Το σύστημα της αντίδρασης στο στρες συνδέεται στενά με διάφορες δομές του εγκεφάλου που σχετίζονται τόσο με γνωστικές λειτουργίες, όσο και με άλλες λειτουργίες όπως ο φόβος, ο θυμός και η ανταμοιβή. Αυτές οι δομές επηρεάζουν και επηρεάζονται από το σύστημα αντίδρασης στο στρες και αποτελούν ένα πολυσύνθετο σύστημα θετικής και αρνητικής ανατροφοδότησης του (Chrousos, 2009).

Ο εγκέφαλος είναι το όργανο, το οποίο παίζει τον σημαντικότερο ρόλο στην αντίδραση σε έναν στρεσογόνο παράγοντα, είτε αυτός είναι φυσικής, είτε ψυχολογικής φύσης. Πολλές δομές του εγκεφάλου εμπλέκονται σε αυτή τη διαδικασία, όπως ο θάλαμος, ο υποθάλαμος, ο ιππόκαμπος, η αμυγδαλή, ο προμετωπιαίος λοβός, το στέλεχος κ.α. (Van de Kar and Blair, 1999).

Το σύστημα της αντίδρασης στο στρες διαθέτει κεντρικές και περιφερικές δομές. Το κεντρικό τμήμα βρίσκεται στον υποθάλαμο και το στέλεχος και περιλαμβάνει δομές όπως:

- α) τους νευρώνες, οι οποίοι εδράζονται στον παρακοιλιακό πυρήνα (paraventricular nucleus ή PVN) του υποθαλάμου
- β) τους νευρώνες, οι οποίοι σχετίζονται με την παραγωγή και έκκριση της εκλυτικής ορμόνης της κορτικοτροπίνης (corticotropin-releasing hormone ή CRH) και της αργινίνης - βαζοπρεσίνης (arginine-vasopressin ή AVP)
- γ) τους CRH νευρώνες των παραγιγαντοκυτταρικών (paragiganto-cellular) και παραβραγχιακών (parabranchial) πυρήνων του προμήκη και του υπομέλανα τόπου (locus ceruleus ή LC)
- δ) άλλες κυτταρικές δομές στον προμήκη και την γέφυρα (pons medulla), οι οποίες σχετίζονται με την NE (LC/NE-συμπαθητικό σύστημα).

Επιπρόσθετα, υπάρχει και περιφερικό τμήμα, το οποίο παίζει, επίσης, σπουδαίο ρόλο στην ρύθμιση της αντίδρασης στο στρες. Αυτό περιλαμβάνει τον Υποθαλαμο-

Υποφυσιο-Επινεφριδιακό (ΥΥΕ) άξονα καθώς και τμήματα του παρασυμπαθητικού συστήματος (Chrousos, 2007).

1.2.1. Υποθαλαμο-Υποφυσιο-Επινεφριδιακός άξονας και ρόλος των γλυκοκορτικοειδών

Ο ΥΥΕ άξονας μαζί με το συμπαθητικό νευρικό σύστημα αποτελούν τους σημαντικότερους παράγοντες από τους οποίους εξαρτάται η ομοιόσταση (Johnson et al., 1992). Ο υποθάλαμος λειτουργεί ως "αισθητήρας" του εξωτερικού και εσωτερικού περιβάλλοντος, προσλαμβάνοντας, συνθέτοντας και ελέγχοντας διάφορες νευρικές και χημικές πληροφορίες. Έτσι, παραλαμβάνει σήματα, τα οποία προέρχονται από στρεσογόνες καταστάσεις και ενεργοποιεί το τελευταίο στάδιο της σύνθεσης των γλυκοκορτικοειδών. Αυτή η σύνθεση γίνεται σε δύο στάδια:

α) ο παρακοιλιακός πυρήνας (PVN) του υποθαλάμου διαθέτει μεγάλους νευρώνες, οι οποίοι συνθέτουν και εκκρίνουν δύο ορμόνες, την εκλυτική ορμόνη της κορτικοτροπίνης (CRH) και την αργινίνη - βαζοπρεσίνη (AVP). Οι δύο αυτές νευροορμόνες μεταφέρονται από τον υποθάλαμο, διά μέσου του υποφυσιακού πυλαίου συστήματος, στον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης. Εκεί, δρουν μαζί μέσω των αντίστοιχων υποδοχέων τους και διεγείρουν την παραγωγή της αδρενοκορτικοτρόπου ορμόνης (ACTH).

β) Η ACTH απελευθερώνεται στην συστηματική κυκλοφορία και δρα κατευθείαν στον φλοιό των επινεφριδίων, με αποτέλεσμα να προάγεται η σύνθεση των γλυκοκορτικοειδών, που με τη σειρά τους απελευθερώνονται στην κυκλοφορία (μέσω διάχυσης). Οι δύο κύριες γλυκοκορτικοειδικές ορμόνες είναι η κορτιζόλη και η κορτικοστερόνη και ανάλογα με το είδος του οργανισμού συντίθεται σε μεγαλύτερο βαθμό η μια από τις δύο. Έτσι, στον άνθρωπο επικρατέστερη είναι η κορτιζόλη, ενώ στα τρωκτικά η κορτικοστερόνη απαντάται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (Buckingham, 2006).

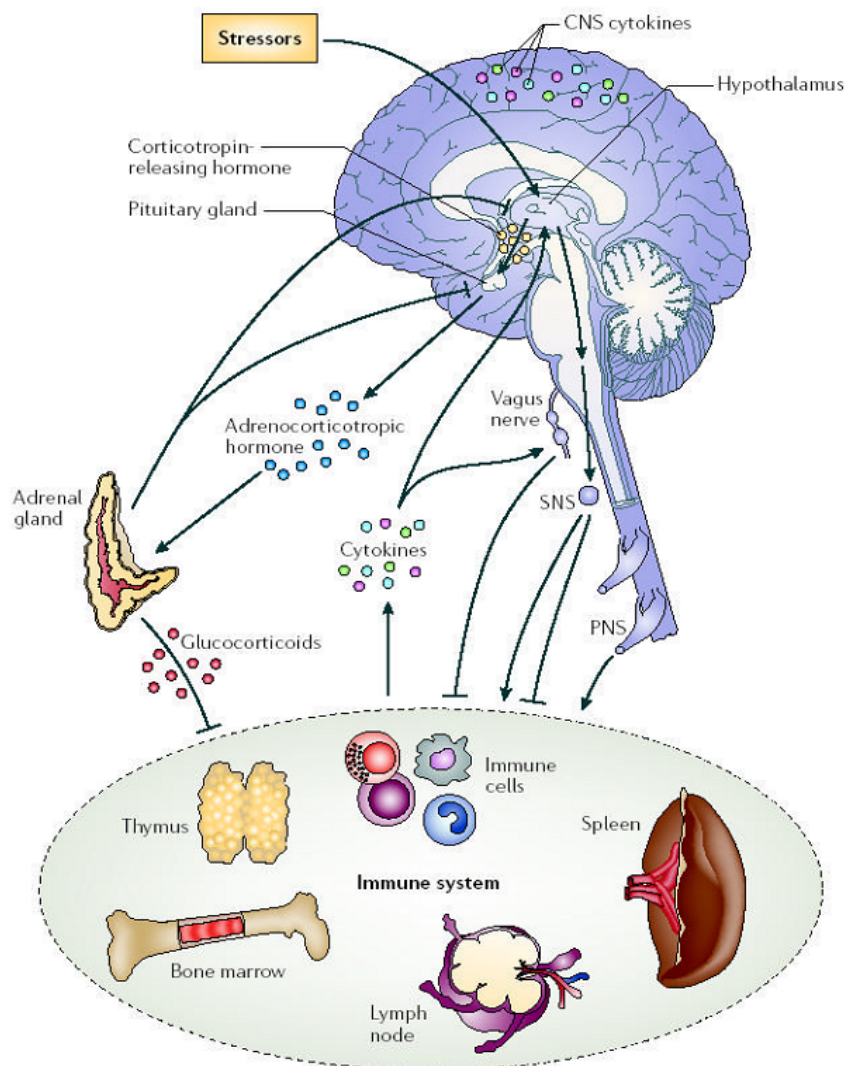
Σημασία και ρύθμιση της CRH, της AVP και της ACTH

Η CRH είναι ο βασικότερος ρυθμιστής του ΥΥΕ άξονα. Πρόκειται για ένα πεπτίδιο, το οποίο αποτελείται από 41 αμινοξέα, η παρουσία του οποίου καθώς και των αντίστοιχων υποδοχέων του έχει ταυτοποιηθεί, εκτός από τον υποθάλαμο, και σε περιοχές του μεταχιακού συστήματος, του πρόσθιου εγκεφάλου και του συστήματος LC/NE στο στέλεχος και τον νωτιαίο μυελό. Η CRH δρα απ' ευθείας, επηρεάζοντας την

έκκριση της ACTH, ενώ η AVP δρα συνεργητικά με την CRH και δεν μπορεί από μόνη της να επηρεάσει την έκκριση της ACTH. Οι νευρικές απολήξεις των νευρώνων του παρακοιλιακού πυρήνα, που παράγουν τις CRH και AVP, αλληλοεπηρεάζονται και συνδέονται στενά με τους νοραδρενεργικούς νευρώνες του στελέχους και αυτούς του υποφυσιακού πυλαίου συστήματος. Ειδικά, οι α_1 -αδρενεργικοί υποδοχείς παίζουν σημαντικότατο ρόλο στην επικοινωνία μεταξύ αυτών των νευρώνων. Τόσο οι νευρώνες που εκκρίνουν CRH, όσο και οι νευρώνες των κατεχολαμινών, συνδέονται μέσω σεροτονινεργικών και χολινεργικών συστημάτων, τα οποία προκαλούν διέγερση. Αντιθέτως, τα συστήματα του γ -αμινο-βουτυρικού οξέος (GABA), τα οπιοειδή πεπτίδια καθώς και τα γλυκοκορτικοειδή, ασκούν κατασταλτική δράση. Η έκκριση της CRH διεγείρεται επίσης, από το νευροπεπτίδιο Y (NPY), το οποίο ταυτόχρονα έχει ανασταλτική δράση για το σύστημα LC/NE-συμπαθητικό. Την ακριβώς αντίθετη δράση έχει η Ουσία P (Substance P), αφού ασκεί ανασταλτική δράση στον PVN αλλά ενεργοποιεί το LC/NE-συμπαθητικό σύστημα. Τέλος, οι νευρώνες του παρακοιλιακού πυρήνα διαθέτουν απολήξεις, που συνδέονται με τους νευρώνες, που παράγουν προ-οπιομελανοκορτίνη (pro-opiomelanocortin ή POMC). Αυτοί με τη σειρά τους συνδέονται με το σύστημα LC/NE-συμπαθητικό και καταλήγουν στους νευρώνες, που ελέγχουν τον πόνο και βρίσκονται στο οπίσθιο μέρος του εγκεφάλου, το οποίο περιλαμβάνει το στέλεχος και την παραγκεφαλίδα. Σε κατάσταση ηρεμίας, τόσο η CRH όσο και η AVP εκλύονται με ρυθμικό τρόπο, σύμφωνα με τον κερκαδιανό κύκλο. Η έκλυσή τους αυξάνεται νωρίς το πρωί, κάτι που έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της παραγωγής της ACTH και επομένως την αύξηση των επιπέδων της κορτιζόλης / κορτικοστερόνης στο αίμα. Αυτοί οι φυσιολογικοί ρυθμοί έκκρισης μεταβάλλονται από το ημερήσιο πρόγραμμα του ατόμου (ξύπνημα, περιβαλλοντικός φωτισμός, τροφικές συνήθειες), ενώ σε περίπτωση που εμφανιστεί ένα οξύ στρεσογόνο γεγονός, ο ρυθμός έκκρισης των CRH και AVP αυξάνεται (Chrousos, 2007).

Διάφοροι άλλοι παράγοντες είναι δυνατόν να επηρεάσουν κάποιο τμήμα ή τμήματα του ΥΥΕ άξονα και να αυξήσουν ή να εμποδίσουν την δραστηριότητά του. Είναι γνωστό ότι οι κυτοκίνες και ορισμένοι άλλοι παράγοντες, που σχετίζονται με την φλεγμονή, είναι ισχυροί επαγωγείς της κεντρικής αντίδρασης στο στρες. Πιο συγκεκριμένα, ο ογκονεκρωτικός παράγοντας- α (Tumor necrosis factor- α ή TNF- α), η Ιντερλευκίνη-1 β (IL-1 β) και η Ιντερλευκίνη-6 (IL-6), είναι δυνατόν να ενεργοποιήσουν τον ΥΥΕ άξονα κατά μόνας ή σε συνδυασμούς μεταξύ τους. Εξάλλου, άλλοι παράγοντες σχετιζόμενοι με την φλεγμονή, όπως ο παράγοντας ενεργοποίησης των

αιμοπεταλίων (PAF), τα εικοσανοειδή και η σεροτονίνη (5-HT) μπορούν επίσης να ενεργοποιήσουν τον άξονα, μέσω ενδοκρινών και / ή παρακρινών μονοπατιών. Όταν ενεργοποιηθεί ο ΥΥΕ άξονας, η κορτιζόλη / κορτικοστερόνη που εκκρίνεται, έχει ισχυρά ανοσοκατασταλτική δράση, καταστέλλοντας την παραγωγή κυτοκινών καθώς και την κινητικότητα και λειτουργικότητα των λευκοκυττάρων (Tsigos and Chrousos, 2002). Το **Σχήμα 1** παρουσιάζει τα μονοπάτια, που μετέχουν στη ρύθμιση του ενδοκρινικού συστήματος από το στρες.



Σχήμα 1: Σχηματική απεικόνιση των μονοπατιών που συμμετέχουν στη ρύθμιση του νευροενδοκρινικού συστήματος από το στρες. Επεξηγήσεις: Stressors, στρεσογόνοι παράγοντες; Adrenal gland, επινεφρίδια; Adrenocorticotropic hormone, αδρενοκορτικοτρόπος ορμόνη; Bone marrow, μυελός των οστών; CNS

cytokines, κυτοκίνες του ΚΝΣ; Corticotropin-releasing hormone, εκλυτική ορμόνης της κορτικοτροπίνης; Cytokines, κυτοκίνες; Glucocorticoids, γλυκοκορτικοειδή; Hypothalamus, υποθάλαμος; Immune cells, κύτταρα ανοσοποιητικού συστήματος; Immune system, ανοσοποιητικό σύστημα; Lymph node, λεμφαδένες; Pituitary gland, υπόφυση; PNS, παρασυμπαθητικό νευρικό σύστημα; SNS, συμπαθητικό νευρικό σύστημα; Spleen, σπλήνας; Thymus, θύμος αδένας; Vagus nerve, πνευμονογαστρικό νεύρο (Helmreich et al., 2005).

Σημασία και ρύθμιση των γλυκοκορτικοειδών

Τα γλυκοκορτικοειδή είναι οι τελικοί ρυθμιστές του ΥΥΕ άξονα. Ελέγχουν τη βασική λειτουργία του άξονα και παίζουν καθοριστικό ρυθμιστικό ρόλο στην αποδρομή της αντίδρασης του στρες μέσω της αρνητικής ανατροφοδότησης πάνω στον υποθάλαμο και την υπόφυση (Chrousos, 2007), (Kyrou and Tsigos, 2009).

Οι υποδοχείς των γλυκοκορτικοειδών εδράζονται σε μια πληθώρα ιστών και συστημάτων του οργανισμού και συνδέονται στενά με τα glucocorticoid responsive elements (GREs), τα οποία επάγουν ή αναστέλλουν διάφορα γονίδια (Kyrou and Tsigos, 2009). Πιο συγκεκριμένα, η ενεργοποίηση των υποδοχέων των γλυκοκορτικοειδών αναστέλλει διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες, περιλαμβανομένων των c-jun/cfos και NF-kB/Rel. Οι παράγοντες αυτοί επηρεάζουν άμεσα την μεταγραφή πλήθους γονιδίων, τα οποία σχετίζονται με μεταβολικές οδούς (Chrousos, 2007), (Rose et al., 2010).

Υπάρχουν δύο υπότυποι των υποδοχέων γλυκοκορτικοειδών, ο υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών I (ή υποδοχέας μινεραλο-κορτικοειδών) και ο υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών II, ο οποίος ενεργοποιείται κατά την αντίδραση στο στρες. Εφόσον συνδεθεί το υπόστρωμα με τον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών, ο υποδοχέας αλλάζει στερεοταξικά, μετατοπίζεται μέσα στον πυρήνα και εκεί επηρεάζει τα GREs διαφόρων γονιδίων, ενεργοποιώντας ή αναστέλλοντάς τα (Chrousos, 2007). Πρέπει να σημειωθεί ότι πειραματόζωα με εξουδετερωμένα ("knockout") γονίδια των υποδοχέων των γλυκοκορτικοειδών δεν μπορούν να επιβιώσουν, γεγονός που καταδεικνύει πόσο αναγκαίες για τη ζωή λειτουργίες επιτελούν τα γλυκοκορτικοειδή και οι υποδοχείς τους (Rose et al., 2010).

Τα ενδογενή γλυκοκορτικοειδή συμβάλλουν στην διάσπαση των υδατανθράκων και των πρωτεϊνών, ενώ επίσης έχουν επίδραση και στον τρόπο με τον οποίο

αποθηκεύονται και διασπώνται τα λίπη. Επίσης αυξάνουν την αρτηριακή πίεση, μεταβάλλοντας την ευαισθησία των ιστών στις κατεχολαμίνες αλλά και αυξάνοντας την κατακράτηση νερού και ηλεκτρολυτών. Παίζουν επίσης σημαντικότατο ρόλο στην φλεγμονή και τη λειτουργία του ανοσοποιητικού και ενδοκρινικού συστήματος. Εξίσου σημαντικές είναι οι δράσεις των ενδογενών γλυκοκορτικοειδών και στο ΚΝΣ. Από τη μια, ευθύνονται για την φυσιολογική δημιουργία δομών του εγκεφάλου κατά τη φάση της ανάπτυξης και από την άλλη παίζουν σημαίνοντα ρόλο στην εκφύλιση του νευρικού ιστού. Είναι δυνατόν να προκαλέσουν αλλαγές στον ψυχισμό και την συμπεριφορά του ατόμου αλλά και (μέσω της επιρροής τους στο μεταβολισμό) να μεταβάλλουν την αντίληψη του ατόμου όσον αφορά την θερμοκρασία, τον πόνο κ.α. (Buckingham, 2006).

1.2.2. Συμπαθητικό και παρασυμπαθητικό σύστημα

Το νευρικό σύστημα χωρίζεται σε κεντρικό (ΚΝΣ) και περιφερικό (ΠΝΣ). Το τελευταίο αποτελείται από κεντρομόλες και απαγωγές νευρικές ίνες. Οι κεντρομόλες (αισθητικές), μεταφέρουν νευρικές ώσεις από τα αισθητικά όργανα στον εγκέφαλο (ΚΝΣ), ενώ οι απαγωγές (κινητικές) νευρικές ίνες μεταφέρουν ώσεις από το ΚΝΣ σε μύες και αδένες. Η κεντρομόλος μοίρα του ΠΝΣ υποδιαιρείται στο κινητικό νευρικό σύστημα, το οποίο μεταφέρει τις ώσεις από τον εγκέφαλο στους μύες και το αυτόνομο νευρικό σύστημα (ΑΝΣ), το οποίο είναι υπεύθυνο για την μεταφορά ώσεων από το ΚΝΣ προς τους λείους μύες, το μυοκάρδιο και ορισμένους αδένες. Με τη σειρά του, το ΑΝΣ αποτελείται από δύο τμήματα, το συμπαθητικό και το παρασυμπαθητικό νευρικό σύστημα. Το συμπαθητικό νευρικό σύστημα όταν ενεργοποιηθεί, γενικά προετοιμάζει τον οργανισμό για φυσική δραστηριότητα, ενώ το παρασυμπαθητικό σύστημα ενεργοποιείται κατά την ηρεμία και σχετίζεται με φυτικές λειτουργίες (πέψη τροφής, κινητικότητα εντέρου και ουροποιητικού συστήματος κ.α.) (Seeley et al., 2000). Τόσο το συμπαθητικό, όσο και το παρασυμπαθητικό νευρικό σύστημα, ρυθμίζουν τις λειτουργίες του καρδιαγγειακού, αναπνευστικού, γαστρεντερικού, ουροποιητικού, ενδοκρινικού και άλλων συστημάτων (Chrousos, 2007). Το συμπαθητικό νευρικό σύστημα είναι ο δεύτερος κύριος παράγοντας (μαζί με τον ΥΥΕ άξονα) που επηρεάζει και επηρεάζεται από την αντίδραση στο στρες. Το συμπαθητικό σύστημα νευρώνει τα περιφερικά όργανα με τις μετα-γαγγλιακές νευρικές ίνες του, οι οποίες συνάπτονται στα συμπαθητικά γάγγλια με τους συμπαθητικούς νευρώνες που φτάνουν στους λείους μύες των αγγείων, την καρδιά, το έντερο, τους νεφρούς και άλλα όργανα. Παράλληλα, το

συμπαθητικό σύστημα παρέχει το μεγαλύτερο μέρος της επινεφρίνης (EPI) και ένα αρκετά μεγάλο μέρος της νορεπινεφρίνης (NE), που εκλύονται από τον μυελό των επινεφριδίων και απελευθερώνονται στην κυκλοφορία, μετά από την επίδραση κάποιου στρεσογόνου παράγοντα (Chrousos, 2007), (Kyrou and Tsigos, 2009).

Το LC/NE (locus coeruleus / norepinephrine) - συμπαθητικό σύστημα αποτελείται από νευρώνες του υπομέλανα τόπου (locus coeruleus) και άλλες δομές κυττάρων που παράγουν NE και βρίσκονται στη γέφυρα και τον προμήκη μυελό (Tsigos and Chrousos, 2002). Οι κατεχολαμινεργικοί νευρώνες του εγκεφάλου διαθέτουν ορισμένα χαρακτηριστικά, τα οποία τους κάνουν να ξεχωρίζουν από άλλα είδη νευρώνων του ΚΝΣ. Έτσι, ανατομικά είναι πολύ πολύπλοκοι, διαθέτοντας άξονες με πολλές νευρικές απολήξεις, ενώ ξεπερνούν τα όρια των πυρήνων του εγκεφάλου. Έχουν την δυνατότητα να απαντούν ταχύτατα σε συγκεκριμένα στρεσογόνα ερεθίσματα και μπορούν να επιδιορθώνουν γρήγορα τυχόν βλάβες των αξόνων τους. Τέλος, διαθέτουν εξειδικευμένους μεταφορείς για την επαναπρόσληψη των κατεχολαμινών από τον συναπτικό ή εξωσυναπτικό χώρο, ενώ παράλληλα διαθέτουν μεγάλο αριθμό μη-συναπτικών τελικών νευρικών απολήξεων και εκφράζουν πληθώρα νευροπεπτιδίων και συν-διαβιβαστών (Kvetnansky et al., 2009). Όταν ενεργοποιηθεί το σύστημα LC/NE, απελευθερώνονται στην κυκλοφορία του αίματος NE και EPI από ένα πυκνό δίκτυο νευρώνων σε όλο τον εγκέφαλο (Johnson et al., 1992), (Chrousos, 2007). Αυτοί οι δύο νευροδιαβιβαστές είναι οι καθοριστικοί παράγοντες που θέτουν σε συναγερμό τον οργανισμό, αυξάνοντας την αντίδραση στο στρες (συμπεριλαμβανομένης της ενεργοποίησης του ΥΥΕ άξονα) και αναστέλλουν φυτικές λειτουργίες, όπως η πρόσληψη τροφής και ο ύπνος. Επίσης η NE ενεργοποιεί την αμυγδαλή (όπου εδράζεται το κέντρο του φόβου) και συμβάλλει στην μόνιμη καταγραφή άσχημων εμπειριών στον ιππόκαμπο και το ραβδωτό σώμα (striatum). (Tsigos and Chrousos, 2002).

Επομένως, η συμπαθητική μοίρα του ANS συμβάλλει στην αντίδραση του οργανισμού στο στρες, μέσω των συμπαθητικών νευρώνων και του μυελού των επινεφριδίων. Τα ακριβώς αντίθετα αποτελέσματα προάγει η δράση της παρασυμπαθητικής μοίρας του ANS, η οποία έχει στενή - λειτουργικά - σχέση με την συμπαθητική μοίρα. Συνεπώς, αναστολή του παρασυμπαθητικού συστήματος επιφέρει ίδια αποτελέσματα με την ενεργοποίηση του συμπαθητικού (Johnson et al., 1992), (Chrousos, 2007).

Οι νευρώνες του συστήματος LC/NE έχουν στενότερη σχέση με την ρύθμιση της CRH. Έτσι, η CRH και το σύστημα LC/NE επάγουν το ένα, την δράση του άλλου και αυτό φαίνεται να γίνεται μέσω των α_1 -αδρενεργικών υποδοχέων. Η ίδια η CRH ασκεί έλεγχο μέσω αρνητικής ανατροφοδότησης (negative feedback) στους νευρώνες της CRH, ενώ οι προσυναπτικοί υποδοχείς CRH και οι α_2 -αδρενεργικοί υποδοχείς εξασκούν παρόμοιο έλεγχο στον υπομέλανα τόπο και τους νευρώνες της EPI, αντίστοιχα (Tsigos and Chrousos, 2002). Επίσης, νευροδιαβιβαστές όπως η 5-HT (σεροτονίνη) και η ACh (ακετυλοχολίνη) παίζουν σημαίνοντα ρόλο στη ρύθμιση του συμπαθητικού συστήματος, διεγείροντάς το, ενώ το γ -αμινο-βουτυρικό οξύ (GABA), διάφορα οπιοειδή πεπτίδια, τα γλυκοκορτικοειδή και η κορτικοτροπίνη δρούν ανασταλτικά στο LC-NE / συμπαθητικό σύστημα (συστήματα αρνητικής ανατροφοδότησης) (Johnson et al., 1992), (Tsigos and Chrousos, 2002).

1.2.3. Άλλοι παράγοντες ρύθμισης της αντίδρασης στο στρες

Κατά την ενεργοποίηση του συστήματος του στρες από διάφορους παράγοντες, σημαντικό ρόλο παίζουν και άλλα συστήματα πέραν του ANΣ: το μεσοφλοιώδες / μεσομεταιχμιακό ντοπαμινεργικό σύστημα, το σύμπλεγμα αμυγδαλής / ιπποκάμπου και το σύστημα της POMC. Η σχέση αυτή είναι αμφίδρομη, αφού αυτοί οι παράγοντες επηρεάζονται αλλά και επηρεάζουν το σύστημα του στρες (Chrousos, 2007).

α) Το μεσοφλοιώδες / μεσομεταιχμιακό ντοπαμινεργικό σύστημα

Τόσο το μεσοφλοιώδες (mesocortical), όσο και το μεσομεταιχμιακό (mesolimbic) σύστημα, νευρώνονται από το LC/NE-συμπαθητικό σύστημα και επομένως μπορούν να ενεργοποιηθούν από διάφορους στρεσογόνους παράγοντες (Chrousos, 2009). Το μεσοφλοιώδες σύστημα περιλαμβάνει ντοπαμινεργικούς νευρώνες, οι οποίοι εκτείνονται μέχρι τον προμετωπιαίο λοβό (prefrontal cortex) και εμπλέκονται στις ανώτερες γνωστικές λειτουργίες (Tsigos and Chrousos, 2002), (Chrousos, 2007). Το μεσομεταιχμιακό σύστημα αποτελείται από ντοπαμινεργικούς νευρώνες, οι οποίοι νευρώνουν τον επικλινή πυρήνα (nucleus accumbens) και παίζουν εξαιρετικά σημαντικό ρόλο στα φαινόμενα ενίσχυσης και ανταμοιβής (Chrousos, 2007).

β) Το σύμπλεγμα αμυγδαλής / ιπποκάμπου

Το σύμπλεγμα αμυγδαλής / ιπποκάμπου ενεργοποιείται κατά την οξεία κατάσταση στρες, που προκαλείται π.χ. από φόβο (Chrousos, 2007). Η αμυγδαλή

διαθέτει το δικό της σύστημα ενεργοποίησης φόβου / θυμού και επηρεάζει το σύστημα του στρες (σύστημα θετικής ανατροφοδότησης - positive feedback) (Chrousos, 2009). Αυτό, φαίνεται να γίνεται δια μέσου των νευρώνων CRH που διαθέτει, οι οποίοι ενεργοποιούνται από τα γλυκοκορτικοειδή, παίζοντας έτσι ρόλο στην ενίσχυση του αισθήματος του άγχους. Αντιθέτως, ο ιππόκαμπος έχει ρυθμιστικό ρόλο, αφού εξασκεί ανασταλτική δράση στην δράση της αμυγδαλής αλλά και ευθέως στον PVN, το σύστημα LC/NE αλλά και τους νευρώνες CRH (Chrousos, 2007). Η κατασταλτική δράση του ιπποκάμπου θεωρείται ότι συνδέεται με την έκφραση του εκ του εγκεφάλου προερχόμενου νευροτρόφου παράγοντα (brain-derived neurotrophic factor ή BDNF) (Taliaz et al., 2011).

γ) Σύστημα της προ-οπιομελανοκορτίνης

Οι νευρώνες του συστήματος LC/NE αλλά και εκείνοι που εκκρίνουν CRH και AVP, συνδέονται με νευρώνες του τοξοειδούς πυρήνα (arcuate nucleus) του υποθαλάμου, οι οποίοι παράγουν το πεπτίδιο προ-οπιομελανοκορτίνη (POMC). Η παραγωγή POMC διεγείρεται από την ενεργοποίηση του συστήματος του στρες και οδηγεί στην απελευθέρωση διαφόρων πεπτιδίων που προέρχονται από την POMC, όπως είναι η α-μελανοκυτοτρόπος ορμόνη (α-melanocyte-stimulating hormone ή α-MSH) και η β-ενδορφίνη. Αυτά τα πεπτίδια δρουν ανασταλτικά για το ΚΝΣ και έχουν αναλγητική δράση (Chrousos, 2007).

1.3. Παθοφυσιολογία συνδεδεμένη με τη φυσιολογική αντίδραση στο στρες

Όπως προαναφέρθηκε, η ενεργοποίηση του συστήματος του στρες γίνεται είτε ρυθμικά, σύμφωνα με τον κερκαδιανό ρυθμό (Nader et al., 2010), είτε μετά από έκθεση σε στρεσογόνους παράγοντες και έχει ως σκοπό την διατήρηση της ομοιόστασης ενός οργανισμού. Όταν αυτή η ενεργοποίηση διαρκεί μικρό χρονικό διάστημα, τα αποτελέσματά της είναι χρήσιμα για τον οργανισμό. Οι επιθυμητές - για μικρό χρονικό διάστημα - συνέπειες της ενεργοποίησης του συστήματος του στρες, διακρίνονται σε φαινόμενα από το ΚΝΣ αλλά και την περιφέρεια. Όσον αφορά το ΚΝΣ, η ενεργοποίηση της αντίδρασης στο στρες περιλαμβάνει αύξηση της εγρήγορης, την προσοχής και επιθετικότητας, ενώ αντίθετα οι φυτικές λειτουργίες (τροφή, αναπαραγωγή, ανάπτυξη) καταστέλλονται. Στην περιφέρεια, το σύστημα του στρες προκαλεί ενίσχυση της καρδιαγγειακής και αναπνευστικής λειτουργίας, ώστε να αυξηθεί η οξυγόνωση του

εγκεφάλου, της καρδιάς και των σκελετικών μυών, που χρειάζονται περισσότερο οξυγόνο και ενέργεια κατά την "πάλη ή φυγή". Επίσης, αυξάνεται ο καταβολισμός ώστε να παραχθούν μεγαλύτερα ποσά ενέργειας αλλά και ενισχύονται οι διαδικασίες εξουδετέρωσης και απέκκρισης των υποπροϊόντων του μεταβολισμού (συμπεριλαμβανομένων και των ξενοβιοτικών) (Chrousos, 2009).

Αντιθέτως, ένα πλήθος δυσλειτουργιών αναπτύσσεται σε όλα σχεδόν τα συστήματα του οργανισμού, σε περίπτωση που ο ΥΥΕ άξονας παραμείνει ενεργοποιημένος για παρατεταμένο χρονικό διάστημα (Tsigos and Chrousos, 2002) και σημαντικό ρόλο σε αυτή την κατάσταση φαίνεται να παίζουν τα αυξημένα επίπεδα κορτιζόλης (Kyrou and Tsigos, 2009). Η εμφάνιση αυτών των δυσλειτουργιών και η βαρύτητά τους, εξαρτώνται από ένα πλήθος παραγόντων, τόσο γενετικών όσο και περιβαλλοντικών. Κρίσιμη περίοδος για την ανάπτυξη της αντίστασης ή ευαισθησίας στις συνέπειες του στρες, φαίνεται να είναι η περίοδος της ανάπτυξης του οργανισμού (εμβρυϊκή ηλικία, νηπιακή ηλικία, παιδική ηλικία και εφηβεία), οπότε και το νευρικό σύστημα είναι ευαίσθητο σε δομικές και λειτουργικές εξαλλαγές. Χρόνιες καταστάσεις στρες κατά τη διάρκεια αυτών των αναπτυξιακών για τον εγκέφαλο περιόδων, μπορούν να προκαλέσουν μόνιμες εξαλλαγές που διαρκούν για όλη τη διάρκεια της ζωής του οργανισμού (Korosi and Baram, 2010), (Lai and Huang, 2011). Στον **Πίνακα 1** παρουσιάζονται ορισμένες καταστάσεις (φυσιολογικές και μη) οι οποίες σχετίζονται με την υπερβολική δραστηριότητα και την υπολειτουργία του ΥΥΕ άξονα.

Αυξημένη δραστηριότητα του ΥΥΕ	Μειωμένη δραστηριότητα του ΥΥΕ
Διαταραχή πανικού	Άσθμα
Εγκυμοσύνη	Ατυπική κατάθλιψη
Ιδεοψυχαναγκαστική Διαταραχή (OCD)	Διαταραχή της Εποχιακής Κατάθλιψης (SAD)
Καταθλιπτική μελαγχολία	Έκζεμα
Νευρική ανορεξία	Εμμηνόπαυση
Παχυσαρκία (μεταβολικό σύνδρομο)	Επιλόχεια περίοδος
Σακχαρώδης διαβήτης	Ινομυαλγία
Σεξουαλική κακοποίηση κατά την παιδική ηλικία	Καταστολή των επινεφριδίων
Σοβαρές χρόνιες παθήσεις	Μετά από θεραπεία με γλυκοκορτικοειδή
Στερητικό σύνδρομο αλκοόλ/ναρκωτικών	Μετά από θεραπεία για σύνδρομο Cushing
Σύνδρομο Cushing	Μετατραυματικές καταστάσεις
Υπερθυρεοειδισμός	Προεμμηνορροϊκό σύνδρομο
Υποσιτισμός	Ρευματοειδής αρθρίτιδα
Χρόνια υπερβολική άσκηση	Στέρηση νικοτίνης
Χρόνιος αλκοολισμός	Σύνδρομο χρόνιας κόπωσης
	Υποθυρεοειδισμός

Πίνακας 1: Καταστάσεις που συνδέονται με υπερ- και υπο-λειτουργία του ΥΥΕ άξονα. Ορισμένες από αυτές (π.χ. εγκυμοσύνη, εμμηνόπαυση) είναι φυσιολογικές ενώ άλλες (π.χ. κατάθλιψη, διαταραχές λειτουργίας θυρεοειδούς αδένα) δεν είναι (Stratakis and Chrousos, 1995).

Στρες και πρόωρη γήρανση

Έχει διαπιστωθεί ότι η έκθεση σε χρόνια στρες επιταχύνει την γήρανση. Αξίζει επίσης να σημειωθεί ότι ένας γηρασμένος οργανισμός έχει συνήθως μειωμένη ικανότητα να τερματίζει την αντίδραση του στρες, όταν το σύστημα έχει ενεργοποιηθεί. Εικάζεται ότι οι νευρώνες και οι υποδοχείς των γλυκοκορτικοειδών του ιπποκάμπου, ο οποίος όπως προαναφέρθηκε έχει κατασταλτικό ρόλο, υφίστανται βλάβες κατά τη διάρκεια της ζωής με αποτέλεσμα ο ιππόκαμπος να μην μπορεί να καταστείλλει τον ΥΥΕ άξονα μέσω αρνητικής ανατροφοδότησης (Johnson et al., 1992). Παράγοντες, που βρίσκονται αυξημένοι κατά την χρόνια αντίδραση του στρες, όπως τα γλυκοκορτικοειδή και η CRH ανιχνεύονται, επίσης, σε υψηλά επίπεδα σε άτομα μεγάλης ηλικίας. Αντιθέτως η βαζοπρεσίνη, η οποία φαίνεται να προστατεύει τους νευρώνες από την απόπτωση και τις κυτοκίνες, βρίσκεται σε μειωμένα επίπεδα στον υπερχιασματικό (suprachiasmatic) πυρήνα, ο οποίος σχετίζεται με τους κερκαδιανούς ρυθμούς (Aguilera, 2011). Επίσης, σύμφωνα με τον Wolkowitz et al., η δυσλειτουργία του ΥΥΕ άξονα και η κατάθλιψη είναι δυνατόν να εμπλέκονται σε ένα πολύπλοκο δίκτυο το οποίο οδηγεί

στην πρόωρη γήρανση των κυττάρων ενός οργανισμού. Οι κυτοκίνες αλλά και οι δυσλειτουργίες της τελομεράσης φαίνεται να διαδραματίζουν στρατηγικό ρόλο σε αυτό το φαινόμενο (Wolkowitz et al., 2010). Παρ' όλα αυτά, ο ρόλος του στρες στην πρόωρη γήρανση είναι αρκετά πολύπλοκος, αφού σημαντικό ρόλο σε αυτή την παθολογία φαίνεται να παίζουν επίσης η ινσουλίνη και ο λιπώδης ιστός, ειδικά όταν πρόκειται για παχύσαρκα άτομα (EpeI, 2009).

Στρες και αναπαραγωγικό σύστημα

Η ενεργοποίηση του ΥΥΕ άξονα στους ενήλικες προκαλεί καταστολή του άξονα της εκλυτικής ορμόνης των γοναδοτροφινών (Gonadotropin-releasing hormone ή GnRH) με συνέπεια διαταραχές και στα δύο φύλα (Chrousos, 2009). Πιο συγκεκριμένα, η παρατεταμένη ενεργοποίηση του ΥΥΕ άξονα, έχει άμεσες συνέπειες στο γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα, αφού προκαλεί καταστολή της GnRH, της ωχρινοποιητικής ορμόνης (Luteinizing Hormone ή LH), της βιοσύνθεσης των οιστρογόνων και της προγεστερόνης στις ωοθήκες αλλά και την ανάπτυξη της μήτρας από τα οιστρογόνα. Οι αλλαγές αυτές έχουν ως αποτέλεσμα τις διαταραχές ή ακόμη και την πλήρη διακοπή της έμμηνης ρύσης, ενώ αυξημένα επίπεδα της CRH για παρατεταμένες χρονικές περιόδους, μπορούν να οδηγήσουν σε πρόωρο τοκετό και προεκλαμψία / εκλαμψία (Kalantaridou et al., 2010), ή ακόμη και αποβολή του εμβρύου (Johnson et al., 1992). Παράγοντες του συστήματος στρες, που εμπλέκονται στην καταστολή των ορμονών αυτών, είναι η CRH, τα γλυκοκορτικοειδή, η β-ενδορφίνη (Kalantaridou et al., 2010) και η ACTH (Johnson et al., 1992). Και το αναπαραγωγικό σύστημα του άνδρα είναι δυνατόν να επηρεαστεί από την παρατεταμένη αντίδραση στο στρες. Έτσι, τα αυξημένα επίπεδα γλυκοκορτικοειδών καταστέλλουν την παραγωγή της τεστοστερόνης και της LH, γεγονός που οδηγεί σε καταστολή της λίμπιντο και μείωση της γονιμότητας (μειωμένη παραγωγή σπέρματος) (Kalantaridou et al., 2010).

Στρες και ανάπτυξη

Η ανάπτυξη στους ανθρώπους εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, που περιλαμβάνουν το γονιδίωμα, τη διατροφή, την παρουσία διαφόρων ορμονών, το ψυχοκοινωνικό περιβάλλον κ.α. Η αυξητική ορμόνη (growth hormone ή GH) είναι εξαιρετικής σημασίας για την φυσιολογική ανάπτυξη ενός οργανισμού. Σε περίπτωση παρατεταμένης ενεργοποίησης του συστήματος του στρες, τα γλυκοκορτικοειδή, η CRH και τα οπιοειδή (π.χ. β-ενδορφίνη) καταστέλλουν την έκκριση της GH (Johnson et al.,

1992) αλλά και άλλων παραγόντων που διαδραματίζουν ρόλο στην ανάπτυξη, όπως είναι ο ινσουλινόμορφος αυξητικός παράγοντας-1 (insulin-like growth factor-1 ή IGF-1) (Stratakis and Chrousos, 1995). Πρέπει να σημειωθεί ότι ο όρος "μη-φυσιολογική ανάπτυξη" περιλαμβάνει τόσο την ανάπτυξη των σκελετικών μυών, όσο και την ψυχολογική ανάπτυξη (Johnson et al., 1992).

Στρες και λειτουργία του θυρεοειδούς αδένος

Το στρες μέσω της δράσης των γλυκοκορτικοειδών, της σωματοστατίνης και διαφόρων κυτοκινών, προκαλεί μείωση της έκκρισης της θυρεοειδοτρόπου ορμόνης (thyroid stimulating hormone ή TSH) και μειωμένη μετατροπή της θυροξίνης (T4) στην τριϊωδοθυρονίνη (T3) στην περιφέρεια (Stratakis and Chrousos, 1995). Εξάλλου, ακόμη και οξεία επεισόδια στρες (όπως το tail-shock στρες) οδηγούν πολύ γρήγορα σε καταστολή των επιπέδων των TSH, T3 και T4 (Helmreich and Tylee, 2011) καταδεικνύοντας το πόσο ευαίσθητος είναι ο θυρεοειδής αδένος στο στρες.

Στρες και μεταβολισμός

Το στρες οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα κατεχολαμινών και γλυκοκορτικοειδών, τα οποία προκαλούν αύξηση της γλυκονεογένεσης, της γλυκογονόλυσης, της λιπόλυσης και της έκκρισης γλυκόζης από το ήπαρ (Chrousos, 2009). Επίσης, η πρωτεϊνόλυση (αποδόμηση πρωτεϊνών από τους μύες ή τα οστά) ενισχύεται, έχοντας ως σκοπό να υπάρχουν διαθέσιμα αμινοξέα για την παραγωγή ενέργειας (Kyrou and Tsigos, 2009). Επιπροσθέτως, η οξεία ενεργοποίηση του συστήματος του στρες, έχει ως αποτέλεσμα την καταστολή της όρεξης μέσω της δράσης της CRH. Τα γλυκοκορτικοειδή που απελευθερώνονται, ενισχύουν το αίσθημα της όρεξης, με στόχο ο οργανισμός να αναπληρώσει τις απώλειες σε ενέργεια και θρεπτικά συστατικά. Σε παρατεταμένη ενεργοποίηση όμως του ΥΥΕ άξονα, τα επίπεδα των γλυκοκορτικοειδών είναι μονίμως αυξημένα με αποτέλεσμα μονίμως αυξημένη όρεξη που οδηγεί σε αυξημένη (πέραν του φυσιολογικού) πρόσληψη τροφής και - συνεπακόλουθα - παχυσαρκία (De Vriendt et al., 2009). Η παχυσαρκία πολλές φορές είναι συνυφασμένη με διαταραχές στην ευαισθησία της ινσουλίνης, τον μεταβολισμό των λιπών και το μεταβολικό σύνδρομο (Kyrou and Tsigos, 2009). Εξαιρετικά μεγάλης σημασίας φαίνεται να είναι η 11β-υδροξυστεροειδική αφυδρογονάση τύπου 1 (11β-HSD1), το ένζυμο το οποίο μεταβολίζει την (ανενεργή) κορτιζόλη σε (ενεργή) κορτιζόλη στον λιπώδη ιστό (Cagampang et al., 2011).

Στρες και γαστρεντερικό σύστημα

Κατά την ενεργοποίηση του συστήματος του στρες, η στομαχική λειτουργία καταστέλλεται μέσω του πνευμονογαστρικού νεύρου (μείωση της πέψης), ενώ επίσης, η λειτουργία του παχέως εντέρου μειώνεται μέσω της NE, η οποία δρά στο παρασυμπαθητικό (καταστολή αφόδευσης) (Chrousos, 2009). Επίσης, η γαστρική στάση φαίνεται να προκαλείται λόγω των υψηλών επιπέδων CRH κατά την παρατεταμένη έκθεση σε στρες (Stratakis and Chrousos, 1995).

Στρες και ψυχική υγεία

Είναι πλέον κοινά αποδεκτό ότι η δυσλειτουργία του συστήματος του στρες παίζει σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση διαφόρων ψυχιατρικών νοσημάτων, που σχετίζονται με το άγχος (Rentesi et al., 2010) και πιο συγκεκριμένα, παθήσεις όπως είναι η κατάθλιψη, ο πανικός, η νευρική ανορεξία κ.α. (Johnson et al., 1992). Διάφοροι ψυχολογικοί παράγοντες, οι οποίοι ενεργοποιούν τον ΥΥΕ άξονα, είναι δυνατόν να οδηγήσουν στην πρόκληση καταθλιπτικών επεισοδίων. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι ψυχολογικοί στρεσογόνοι παράγοντες είναι οι πιο ισχυροί ενεργοποιητές του ΥΥΕ άξονα (Swaab et al., 2005). Πράγματι, έχει αποδειχθεί ότι διάφορα πειραματικά μοντέλα πρόκλησης στρες σε νεαρή ηλικία μπορούν να θεωρηθούν μοντέλα εμφάνισης κατάθλιψης (Schmidt et al., 2011). Ασθενείς, οι οποίοι πάσχουν από μείζονα κατάθλιψη, εμφανίζουν αυξημένη δραστηριότητα του ΥΥΕ άξονα και πιο συγκεκριμένα δραματικά αυξημένες τιμές της κορτιζόλης στο πλάσμα, τα ούρα και το εγκεφαλονωτιαίο υγρό. Επίσης, η υπόφυση και τα επινεφρίδια ατόμων, που πάσχουν από κατάθλιψη βαριάς μορφής, έχουν μεγαλύτερο μέγεθος σε σχέση με τα υγιή άτομα, ενώ τα επινεφρίδια παρουσιάζουν αυξημένη ευαισθησία στην ACTH για παραγωγή κορτιζόλης. Επίσης, τα επίπεδα της CRH είναι αυξημένα στον PVN και το εγκεφαλονωτιαίο υγρό καταθλιπτικών ασθενών, γεγονός που εικάζεται ότι οφείλεται σε διαταραχές των υποδοχέων των γλυκοκορτικοειδών. Πράγματι, τα αντικαταθλιπτικά φάρμακα φαίνεται να επηρεάζουν την λειτουργία των GR υποδοχέων και έτσι να μειώνουν τα επίπεδα της CRH και της κορτιζόλης και να επαναφέρουν την φυσιολογική λειτουργία του ΥΥΕ άξονα (Pariante and Miller, 2001). Και η σχιζοφρένεια θεωρείται ότι σχετίζεται στενά με την ενεργοποίηση του συστήματος του στρες (Walker et al., 2008). Ασθενείς, οι οποίοι εμφανίζουν ψύχωση, έχει διαπιστωθεί ότι εμφανίζουν αυξημένο μέγεθος της υπόφυσης αρκετούς μήνες πριν από το πρώτο ψυχωσικό επεισόδιο (Garner et al., 2005). Επίσης, έφηβοι με σχιζότυπη διαταραχή (άτομα υψηλού κινδύνου για εμφάνιση

ψύχωσης), έχουν αυξημένα επίπεδα κορτιζόλης σε σύγκριση με υγιείς εφήβους (Mittal et al., 2007). Τέλος, ακόμη και υγιείς συγγενείς ασθενών, που πάσχουν από σχιζοφρένεια, εμφανίζουν μεγαλύτερα μεγέθη υπόφυσης σε σύγκριση με μάρτυρες, εύρημα που συνδέει την υπερδραστηριότητα του ΥΥΕ άξονα με την εμφάνιση σχιζοφρένειας (Mondelli et al., 2008).

Στρες και ανοσοποιητικό σύστημα

Το στρες έχει άμεσες συνέπειες στο ανοσοποιητικό σύστημα μέσω των αυξημένων επιπέδων κατεχολαμινών και γλυκοκορτικοειδών. Αυτά διεγείρουν διάφορους τύπους κυττάρων, που σχετίζονται με το ανοσοποιητικό σύστημα και καταστέλλουν την παραγωγή κυτοκινών, όπως είναι ο TNF-α και οι ιντερλευκίνες IL-6, IL-8 και IL-12 (Chrousos, 2009). Οι παράγοντες αυτοί θεωρείται ότι ουσιαστικά έχουν τον ρόλο που έχει η CRH, αλλά για τους ιστούς (αφού η CRH φυσιολογικά δεν περνά στην συστηματική κυκλοφορία). Η παρατεταμένη παρουσία γλυκοκορτικοειδών καταστέλλει τα T-helper 1 λεμφοκύτταρα, ενώ συμβάλλει στην απόπτωση των ηωσινόφιλων και άλλων τύπων T-λεμφοκυττάρων (Chrousos, 1995). Γενικά, φαίνεται ότι η υπερβολική αντίδραση του ΥΥΕ άξονα σε ανοσολογικά ερεθίσματα έχει τα ίδια αποτελέσματα με την υπερκορτιζολαιμία και επομένως το άτομο είναι ευπαθές σε μολύνσεις αλλά και την ανάπτυξη όγκων και παρουσιάζει αυξημένη αντίσταση σε αυτοάνοσες παθήσεις. Αντιθέτως, άτομα με μειωμένη δραστηριότητα του ΥΥΕ άξονα παρουσιάζουν αυξημένη ευπάθεια σε αυτοάνοσα νοσήματα αλλά και μεγάλη αντίσταση στην ανάπτυξη μολύνσεων και όγκων, όπως συμβαίνει σε καταστάσεις έλλειψης γλυκοκορτικοειδών (Tsigos and Chrousos, 2002). Επίσης, οι κυτοκίνες μπορούν να δράσουν αντίστροφα, δηλαδή να επηρεάσουν τον ΥΥΕ άξονα, ενισχύοντας την δράση του (Turnbull and Rivier, 1995). Κατά την χρόνια αντίδραση στο στρες είναι δυνατόν να εκκριθούν μεγάλες ποσότητες IL-6 από τα επινεφρίδια και είναι χαρακτηριστικό ότι σε επίμυες στους οποίους αφαιρούνται τα επινεφρίδια, η πτώση των επιπέδων IL-6 μπορεί να φτάσει το 60%. Η IL-6 διεγείρει και τα τρία τμήματα του ΥΥΕ άξονα, και συμβάλλει στην έκκριση CRH, ACTH και κορτιζόλης (Girod and Brotman, 2004). Τέλος, άλλες κυτοκίνες, που αυξάνουν την CRH, μπορούν να επηρεάσουν τον ΥΥΕ άξονα και τέτοια παραδείγματα είναι τα εικοσανοειδή, ο platelet-activating factor (PAF) και ο epidermal growth factor (EGF) (Chrousos, 2007).

Στρες και ανάπτυξη όγκων

Όπως προαναφέρθηκε, η υπερδραστηριότητα του ΥΥΕ άξονα κατά την διάρκεια του χρόνιου στρες προκαλεί σημαντικές εξαλλαγές στο ανοσοποιητικό σύστημα. Οι μεταβολές στις κυτοκίνες και τους άλλους παράγοντες της φλεγμονής είναι δυνατόν να παίξουν ρόλο στην ανάπτυξη και την εξέλιξη διαφόρων τύπων καρκίνου. Οι κυτοκίνες φαίνεται να είναι σημαντικότερες για μορφές όγκων, οι οποίοι σχετίζονται με ιούς, όπως είναι ο Epstein Barr ή το σάρκωμα Kaposi, σε ασθενείς που υποφέρουν από AIDS (Reiche et al., 2004). Τα T-helper 1 (Th1) λεμφοκύτταρα εκκρίνουν κυτοκίνες οι οποίες δρουν στην μεμβράνη των καρκινικών κυττάρων, σκοτώνοντάς τα, ενώ αντίθετα τα T-helper 2 (Th2) λεμφοκύτταρα έχουν περισσότερο χυμική δράση. Το χρόνιο στρες, μέσω των κατεχολαμινών και των γλυκοκορτικοειδών, ευνοεί την παραγωγή Th2 με αποτέλεσμα τα καρκινικά κύτταρα να αποφεύγουν την αντίληψη από το ανοσοποιητικό σύστημα. Επιπρόσθετα, πρόσφατες έρευνες έχουν δείξει ότι τα γλυκοκορτικοειδή μπορούν να δράσουν απ' ευθείας σε γονίδια καρκινικών κυττάρων, προστατεύοντάς τα από την δράση των χημειοθεραπευτικών παραγόντων (Moreno-Smith et al., 2010).

Στρες και καρδιαγγειακό σύστημα

Είναι γνωστό ότι τόσο οι υποδοχείς των μινεραλοκορτικοειδών (MR) όσο και οι υποδοχείς των γλυκοκορτικοειδών (GR) εκφράζονται στο μυοκάρδιο και τα αγγεία. Επομένως η παρουσία αυξημένων επιπέδων γλυκοκορτικοειδών επηρεάζει τόσο τα τοιχώματα των αγγείων όσο και την ίδια την καρδιά (Walker, 2007). Η παρατεταμένη αντίδραση στο στρες συνδέεται στενά με την αυξημένη δραστηριότητα του συμπαθητικού αδρενεργικού συστήματος, το οποίο με τη σειρά του έχει πλείστες αρνητικές συνέπειες για το καρδιαγγειακό σύστημα και μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένο κίνδυνο για καρδιαγγειακές παθήσεις (Kyrou and Tsigos, 2009). Τα αυξημένα επίπεδα γλυκοκορτικοειδών μπορούν να προκαλέσουν μια πληθώρα μεταβολών στο καρδιαγγειακό σύστημα. Αυξάνουν την αρτηριακή πίεση και την έκφραση του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτασίνης (angiotensin converting enzyme ή ACE), των υποδοχέων της αγγειοτενσίνης (AT-1 υποδοχείς) και των α_1 -αδρενεργικών υποδοχέων. Επίσης, το στρες έχει δράση και στη λειτουργία του ενδοθηλίου, όπου τα γλυκοκορτικοειδή επηρεάζουν την παραγωγή του μονοξειδίου του αζώτου (NO) και αυξάνουν την έκφραση της ενδοθηλίνης-1. Τα γλυκοκορτικοειδή μπορούν επίσης να αυξήσουν το οξειδωτικό στρες αλλά και να επηρεάσουν την αιμόσταση μέσω των παραγόντων platelet activator inhibitor-1 (PAI-1) και Von Willebrand (Girod and

Brotman, 2004). Επιπροσθέτως, όπως προαναφέρθηκε, η παρατεταμένη αντίδραση στο στρες μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση του μεταβολικού συνδρόμου. Το μεταβολικό σύνδρομο - μεταξύ άλλων - χαρακτηρίζεται από αυξημένη αντίσταση στην ινσουλίνη, παχυσαρκία, υπέρταση, διαταραχές στην πήξη του αίματος, αυξημένα επίπεδα τριγλυκεριδίων και LDL-χοληστερόλης αλλά και μειωμένα επίπεδα της ωφέλιμης HDL-χοληστερόλης (Chrousos, 2009), συνθήκες που αυξάνουν την ανάπτυξη αθηρωματικών πλακών και γενικά τον καρδιαγγειακό κίνδυνο.

1.4. Το στρες στις μοντέρνες κοινωνίες

Μέσα στην εξελικτική πορεία, το ανθρώπινο γένος εκτέθηκε σε ένα πλήθος στρεσογόνων παραγόντων, οι οποίοι προκάλεσαν εξαλλαγές στο γονιδίωμα μέσω της "εκλεκτικής πίεσης". Έτσι, άτομα, τα οποία είχαν μεγαλύτερη ικανότητα να ξεπερνούν στρεσογόνες καταστάσεις, όπως να επιβιώνουν μετά από τραυματισμούς, να αντιστέκονται σε ακραίες συνθήκες θερμοκρασίας ή έλλειψης νερού και τροφής, να αποφεύγουν επικίνδυνες καταστάσεις κ.α., ήταν αυτά τα οποία επικράτησαν μέσα στα χιλιάδες χρόνια εξέλιξης.

Ο τρόπος ζωής του ανθρώπου στις μοντέρνες κοινωνίες έχει όμως αλλάξει δραματικά σε σχέση ακόμη και με το άμεσο παρελθόν. Κίνδυνοι, τους οποίους αντιμετώπιζε ο άνθρωπος δεν υφίστανται πια, ενώ και το προσδόκιμο ζωής έχει αυξηθεί θεαματικά. Οι άνθρωποι παρ' όλα αυτά, εκτίθενται σε νέες στρεσογόνες συνθήκες και μεγάλη μερίδα του πληθυσμού ζει μονίμως σε καταστάσεις χρονίου στρες, κάτι που επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό την καθημερινή ζωή, την υγεία, την οικονομία και την κοινωνία εν γένει (Chrousos, 2009).

2. ΗΠΑΤΙΚΟΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΚΥΤΟΧΡΩΜΑΤΑ

2.1. Γενικά περί ηπατικού μεταβολισμού ξενοβιοτικών

Ως "ξενοβιοτικό" περιγράφεται κάθε ουσία που προέρχεται από το περιβάλλον του ανθρώπου και είναι ξένη προς τον ενδιάμεσο μεταβολισμό. Χαρακτηριστικό των ξενοβιοτικών είναι ότι δεν μπορούν να ενσωματωθούν στο μεταβολισμό του κυττάρου και να συμβάλλουν στην παραγωγή ενέργειας (Μαρσέλος και Μάλαμας, 2004). Παραδείγματα ξενοβιοτικών ουσιών, αποτελούν διάφορα φάρμακα (συνταγογραφούμενα ή άλλα), προκαρκινογόνοι και καρκινογόνοι παράγοντες, φυσικές τοξικές ουσίες (π.χ. δηλητήρια), εντομοκτόνα, φυτοφάρμακα, ζιζανιοκτόνα, περιβαλλοντικοί ρύποι (φυσικοί ή συνθετικοί), συντηρητικά τροφών, καλλυντικά, καθώς και κάθε άλλος χημικός παράγοντας που μπορεί να προκαλέσει τοξικότητα (Guengerich, 2001), (Gonzalez, 2004), (Testa and Kramer, 2006). Όταν εισέλθουν οι ξενοβιοτικές ουσίες στον οργανισμό, αναγνωρίζονται ως ξένες (και πιθανώς επικίνδυνες) και έτσι ενεργοποιούνται πολύπλοκα ενζυμικά συστήματα, που έχουν ως σκοπό να αδρανοποιήσουν και να απομακρύνουν από τον οργανισμό τις ουσίες-εισβολείς (Ioannides, 2001). Η αδρανοποίηση και η απομάκρυνση των ουσιών αυτών από τον οργανισμό συνιστούν μηχανισμό άμυνας, που αναπτύχθηκε κατά την εξελικτική πορεία του ανθρώπου (Μαρσέλος και Μάλαμας, 2004).

Όταν εισέλθουν στον οργανισμό, τα ξενοβιοτικά υφίστανται μεταβολισμό (ή βιομετασχηματισμό) από μια μεγάλη ποικιλία ενζύμων, τα οποία αναφέρονται ως "ένζυμα μεταβολισμού ξενοβιοτικών" (xenobiotic-metabolizing enzymes ή XMEs). Ο βιοσχηματισμός των ξενοβιοτικών συνήθως μετασχηματίζει τα λιπόφιλα μόρια σε περισσότερο υδρόφιλους, υδατοδιαλυτούς μεταβολίτες, κάνοντας έτσι ευκολότερη την απέκκρισή τους από τον οργανισμό μέσω των νεφρών και της χολής. Παρ' όλα αυτά, ο βιοσχηματισμός είναι δυνατόν, υπό συγκεκριμένες συνθήκες, να οδηγήσει στη σύνθεση βιολογικώς πιο ενεργών παραγόντων, που μπορεί να είναι τοξικοί για τον οργανισμό και να προκαλέσουν κυτταρικό θάνατο, καρκινογένεση, τερατογένεση και τοξικές βλάβες μέσω ανοσολογικών αντιδράσεων ή μέσω του οξειδωτικού στρες (Cribb et al., 2005), (Gonzalez, 2005), (Xu et al., 2005). Όσον αφορά τα φάρμακα, υπάρχουν τρεις τρόποι με τους οποίους μπορεί να μεταβληθεί η δράση τους:

α) μεταβολισμός του φαρμάκου σε αδρανείς μεταβολίτες (το πλέον συνηθισμένο είδος βιομετασχηματισμού)

β) μεταβολισμός του φαρμάκου σε δραστικότερες ουσίες (π.χ. η διαμορφίνη / ηρωίνη η οποία μεταβολίζεται σε μορφίνη)

γ) μεταβολισμός ενός προφαρμάκου στην ενεργή μορφή του (π.χ. η L-Dopa που μεταβολίζεται σε ντοπαμίνη αφού εισέλθει στον εγκέφαλο) (Grahame-Smith and Aronson, 2002).

Το ήπαρ είναι το "χημικό εργοστάσιο" του οργανισμού και το κατ' εξοχήν όργανο στο οποίο συντελείται ο μεταβολισμός των ξενοβιοτικών. Όμως, η παρουσία των ΧΜΕs έχει αποδειχθεί σχεδόν σε όλους τους ιστούς του οργανισμού (**Πίνακας 2**), εκτός από τα οστά και τα δόντια, όπου είναι σχεδόν αδύνατον να επιβεβαιωθεί. Μικροσκοπικά, τα ένζυμα μεταβολισμού ξενοβιοτικών συναντώνται κυρίως στο εσωτερικό του κυττάρου, και ειδικότερα στη μεμβράνη του λείου ενδοπλασματικού δικτύου (π.χ. κυτοχρώματα CYP, τρανσφεράσες γλουταθειόνης), στα μιτοχόνδρια (π.χ. οξειδάσες της μονοαμίνης), στα λυσοσωμάτια (κάποιες πεπτιδάσες) και στο κυτταρόπλασμα (ορισμένες αφυδρογονάσες). Υπάρχουν πάντως και ένζυμα, τα οποία δρουν έξω από το κύτταρο, όπως οι χολινεστεράσες του πλάσματος (Testa and Kramer, 2006).

Αγγεία	Ήπαρ	Ουροδόχος κύστη
Αίμα (πλάσμα)	Θύμος αδένας	Οφθαλμοί
Αορτή	Θυροειδής αδένας	Πάγκρεας
Βρόγχοι	Καρδιά	Πλακούντας
Γλώσσα	Κόλπος	Πνεύμονες
Δέρμα	Λάρυγγας	Προστάτης
Εγκέφαλος	Λεμφαδένες	Ρινικός βλεννογόνο
Έντερο (λεπτό)	Λιπώδης ιστός	Σιελλογόνοι αδένες
Έντερο (παχύ)	Μαστοί	Σπερματοδόχος κύστη
Έντερο (χλωρίδα)	Μυελός των οστών	Σπλήνας
Ενδομήτριο	Μύες	Στομάχι
Επινεφρίδια	Νεφροί	Τραχεία
Επίφυση	Οισοφάγος	Υπόφυση
Ερυθρά αιμοσφαίρια	Όρχεις	Ωοθήκες

Πίνακας 2: Όργανα και ιστοί στους οποίους επιτελείται μεταβολισμός φαρμάκων και άλλων ξενοβιοτικών (Testa and Kramer, 2006).

Μεταβολικές αντιδράσεις

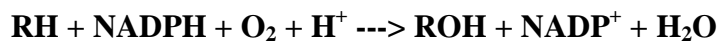
Το σημείο στο οποίο επιτελείται η πλειονότητα των μεταβολικών αντιδράσεων των ξενοβιοτικών είναι το λείο ενδοπλασματικό δίκτυο των ηπατικών κυττάρων και πιο συγκεκριμένα, τα μικροσωμάτια. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι οι μεμβράνες του λείου ενδοπλασματικού δικτύου είναι λιπόφιλες και επομένως έχουν την ιδιότητα να εγκλωβίζουν όλες τις λιποδιαλυτές ουσίες, καθώς εκείνες περνούν δια μέσου του ήπατος. Επίσης, άλλα σημεία στα οποία επιτελούνται οι μεταβολικές αυτές αντιδράσεις είναι το κυτταρόπλασμα και τα μιτοχόνδρια. Οι μεταβολικές αντιδράσεις των ξενοβιοτικών μπορούν να διακριθούν σε δύο βασικές κατηγορίες:

1. Αντιδράσεις φάσης I (οξειδωση, αναγωγή και υδρόλυση)
2. Αντιδράσεις φάσης II (σύζευξη και σύνθεση) (Μαρσέλος και Μάλαμας, 2004).

Μεταβολική φάση I: Οι αντιδράσεις της Φάσης I γενικά δρούν τροποποιητικά στο μόριο της ξενοβιοτικής ουσίας, αλλάζοντας την χημική της δομή και έτσι μετατρέπουν λιπόφιλες ενώσεις σε (πιο) υδρόφιλες. Αυτό, έχει ως αποτέλεσμα την ευκολότερη απέκκριση των μορίων του ξενοβιοτικού, μέσω της χολής ή των ούρων. Μερικές φορές, απαιτείται η δράση ενζύμων της Μεταβολικής Φάσης II για την πλήρη αδρανοποίηση και απέκκριση ενός ξενοβιοτικού (Gonzalez and Yu, 2006). Σε ορισμένες περιπτώσεις, εξάλλου, η δράση ενζύμων της Φάσης I (π.χ. CYP) έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή τοξικών ή ακόμα και καρκινογόνων μεταβολιτών (Gonzalez and Gelboin, 1994).

Για την μεταβολική Φάση I, είναι υπεύθυνη μια μεγάλη ποικιλία ενζύμων και οι αντιδράσεις, τις οποίες αυτά καταλύουν, είναι κυρίως οξειδοαναγωγής. Το σύστημα του κυτοχρώματος CYP είναι το πιο σημαντικό σύστημα της Φάσης I (Guengerich, 2006) και καταλύει κυρίως αντιδράσεις οξειδωσης ξενοβιοτικών ουσιών (Soucek and Gut, 1992). Τα CYP αποτελούν ένα σύστημα μεταφοράς ηλεκτρονίων, το οποίο εντοπίζεται στη μεμβράνη του λείου ενδοπλασματικού δικτύου. Η αιμοπρωτεΐνη (κυτόχρωμα CYP) δέχεται τελικά τα ηλεκτρόνια και οξειδώνει την ξενοβιοτική ουσία, κάνοντάς τη λιγότερο λιπόφιλη (Guengerich, 2004), (Testa and Kramer, 2007). Τα CYP συνδέονται με δύο άτομα οξυγόνου. Η αίμη του CYP συνδέεται ισχυρά με την κυστεΐνη [Cys], η οποία είναι θειολικός συνδέτης για τον σίδηρο (Fe) της αίμης και καταλύει την οξειδωση του υποστρώματος (RH). Το υπόστρωμα προσλαμβάνει ένα άτομο οξυγόνου

και τα τελικά προϊόντα είναι το οξειδωμένο υπόστρωμα (ROH) και ένα μόριο νερού (H₂O). Η γενική απλουστευμένη αντίδραση είναι η ακόλουθη:



(Zuber et al., 2002), (Iyanagi, 2007).

Ο αναλυτικός καταλυτικός κύκλος του συστήματος CYP είναι ο εξής (**Σχήμα 2**):

Στάδιο 1: Το υπόστρωμα δεσμεύεται από την αιμοπρωτεΐνη και πιο συγκεκριμένα, συνδέεται με το τμήμα όπου βρίσκεται ο τρισθενής σίδηρος (Fe⁺³) και σχηματίζεται ένα σύμπλοκο Fe⁺³-υποστρώματος. Το στάδιο αυτό είναι συνήθως πολύ γρήγορο.

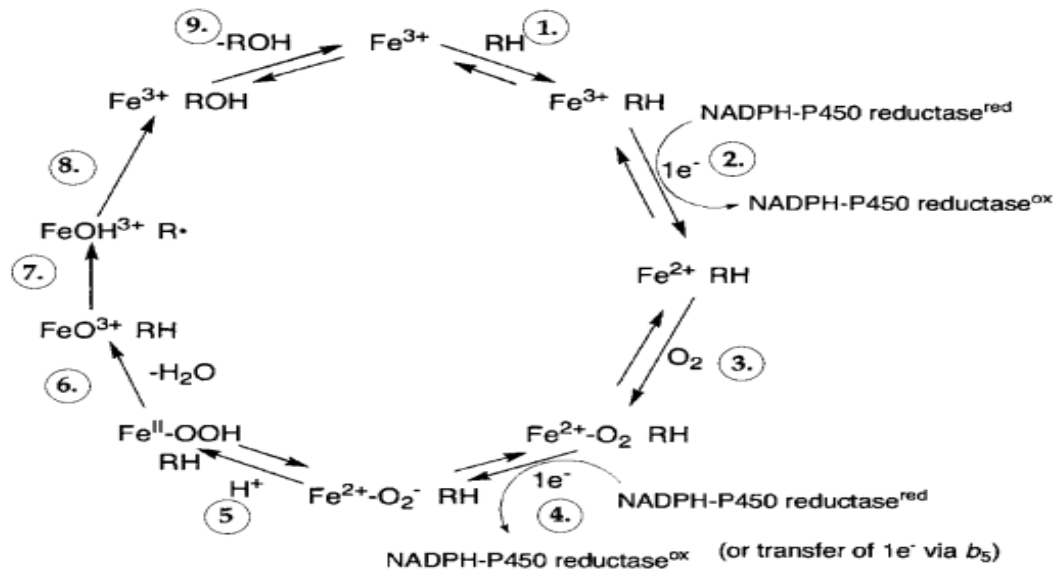
Στάδιο 2: Το σύμπλοκο υπόκειται σε αναγωγή. Αυτό γίνεται με την πρόσληψη ενός ηλεκτρονίου (e⁻) από το NADPH και έχει ως αποτέλεσμα την μετατροπή του τρισθενούς σιδήρου (Fe⁺³) σε δισθενή (Fe⁺²).

Στάδιο 3: Γίνεται οξείδωση του συμπόκου Fe⁺²-υποστρώματος και έτσι το προϊόν είναι ένα καινούριο σύμπλοκο (O²-Fe⁺²-υπόστρωμα).

Στάδιο 4: Το σύμπλοκο O²-Fe⁺²-υπόστρωμα υπόκειται σε νέα αναγωγή, προσλαμβάνοντας άλλο ένα ηλεκτρόνιο, πιθανόν μέσω της NADH-αναγωγής του κυτοχρώματος b₅ (χωρίς όμως αυτό να ισχύει πάντα).

Στάδια 5 & 6: Ένα άτομο οξυγόνου εισάγεται στο υπόστρωμα με αποτέλεσμα την παραγωγή οξειδωμένου μεταβολίτη και ενός μορίου νερού.

Στάδια 7, 8 & 9: Τελικά το σύμπλοκο αιμοπρωτεΐνης-οξειδωμένου μεταβολίτη διασπάται, απελευθερώνοντας τον μεταβολίτη, ο οποίος, συνήθως, απεκκρίνεται από τον οργανισμό και την αιμοπρωτεΐνη, η οποία μπορεί να ξαναμπει στον κύκλο για να μεταβολίσει άλλα μόρια ξενοβιοτικών (Sheweita, 2000), (Guengerich, 2004).



Σχήμα 2: Καταλυτικός κύκλος του κυτοχρώματος P450. Συντομογραφίες: Fe = άτομο σιδήρου της αίμης, RH = υπόστρωμα, ROH = (οξειδωμένο) προϊόν, NADPH-P450, reductase = NADPH-αναγωγή του κυτοχρώματος P450, red = αναχθείσα μορφή, ox=οξειδωμένη μορφή (Guengerich, 2004).

Πέραν των οξειδοαναγωγών, τα κυτοχρώματα P450 μπορούν να μεταβολίσουν τα ξενοβιοτικά μέσω άλλων μηχανισμών όπως είναι:

- α) υδροξυλίωση αλειφατικών και αρωματικών ανθράκων
- β) οξείδωση διπλού δεσμού
- γ) οξυγόνωση S-, N- ή X- και N-υδροξυλίωση
- δ) απαλκυλίωση O-, S-, N-
- ε) μεταφορά οξειδωτικού τμήματος
- στ) διάσπαση εστέρων
- ζ) αφυδρογόνωση
- η) αναγωγική αφαλογόνωση / αζω- ή νιτρο-αναγωγή
- θ) ισομερισμός (Guengerich, 2001), (Zuber et al., 2002).

Τέλος, η Μεταβολική Φάση I των ξενοβιοτικών είναι δυνατόν να έλθει εις πέρας μέσω ενζύμων, τα οποία δεν ανήκουν στην υπεροικογένεια CYP. Ορισμένα παραδείγματα τέτοιων ενζύμων είναι οι αλκοολικές αφυδρογονάσες (ADH), οι αλδεϋδικές αφυδρογονάσες (ALDH), οι αλδο-κετοαναγωγάσες (AKR), οι μονοοξυγενάσες, οι οποίες περιέχουν φλαβίνη (FMO), καθώς και άλλες μικρότερης σημασίας οικογένειες ενζύμων, όπως είναι οι αλδεϋδικές οξειδάσες (AOX), οι αμινο-οξειδάσες που περιέχουν χαλκό (AOC), οι διϋδροδιολο-αφυδρογονάσες, οι ντοπαμινο-β-μονοοξυγενάσες (DBH), οι μονοαμινο-οξειδάσες (MAO), οι μυελοπεροξειδάσες (MPO), οι συνθάσες προσταγλανδίνης-ενδοπεροξειδίου (PTGS), οι οξειδοαναγωγάσες της κινόνης (NQO) και οι αφυδρογονάσες / οξειδάσες των ξανθινών (XOR). Ορισμένες από αυτές τις οικογένειες ενζύμων έχουν τεράστια σημασία για τον μεταβολισμό αλλά και την τοξικότητα. Επί παραδείγματι, οι MPO ενεργοποιούν φαινορικά παράγωγα του βενζολίου και έχουν ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη διαφόρων μορφών καρκίνου, όπως είναι η λευχαιμία (Testa and Kramer, 2007).

Μεταβολική Φάση II: Οι αντιδράσεις της Μεταβολικής Φάσης II είναι ουσιαστικά αντιδράσεις σύζευξης, οι οποίες οδηγούν στην δημιουργία ομοιοπολικών δεσμών μεταξύ ενός ενδογενούς υποστρώματος και μιας λειτουργικής ομάδας στο ξενοβιοτικό μόριο. Η λειτουργική ομάδα είναι δυνατόν να βρίσκεται φυσιολογικά στο ξενοβιοτικό ή να έχει εισαχθεί κατά την Μεταβολική Φάση I. Επίσης, αυτές οι αντιδράσεις σύζευξης είναι χρησιμοποιήσουν ως υποστρώματα και ενδογενείς ουσίες, όπως είναι η χολερυθρίνη, τα χολικά οξέα, η θυροξίνη, οι βιογενείς αμίνες, οι λιποδιαλυτές βιταμίνες ή τα στεροειδή (Iyanagi, 2007). Παραδείγματα ενζύμων της Μεταβολικής Φάσης II είναι:

- DT-διαφοράσες, NAD(P)H:οξειδοαναγωγή της κινόνης (NQO) ή NAD(P)H: αναγωγάσες της μεναδιόνης (NMO)
- εποξειδικές υδρολάσες (EPH)
- S-τρανσφεράσες γλουταθειόνης (GST)
- N-ακετυλο-τρανσφεράσες (NAT)
- σουλφοτρανσφεράσες (SULT)
- UDP-γλυκουρονοσυλτρανσφεράσες (UGT) (Kong et al., 2001).

Όπως συμβαίνει και με τα κυτοχρώματα CYPs, τα οποία θα αναπτυχθούν στη συνέχεια, κάθε υπεροικογένεια ενζύμων της μεταβολικής Φάσης II αποτελείται από υποοικογένειες γονιδίων, τα οποία εκφράζουν συγκεκριμένες ισομορφές. Αυτές οι ισομορφές παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές, όσον αφορά την έκφρασή τους και την δράση τους (Iyanagi, 2007).

Γενικά, οι συζεύξεις της Μεταβολικής Φάσης II έχουν ως αποτέλεσμα την δημιουργία μορίων, τα οποία είναι περισσότερο πολικά, υδρόφιλα και αδρανή και επομένως η απέκκρισή τους μέσω της χολής και των ούρων είναι πολύ ευκολότερη (Xu et al., 2005), (Iyanagi, 2007). Κάποιες φορές όμως, το προϊόν των αντιδράσεων σύζευξης δεν είναι ένα αδρανές μόριο αλλά ένα ενεργοποιημένο παράγωγο, το οποίο μπορεί να προκαλέσει τοξικότητα. Χαρακτηριστικά τέτοια παραδείγματα είναι η Ο-ακετυλίωση των αρωματικών υδροξυλαμινών, η Ο-σουλφούρωση των πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων, η 6-γλουκουρονιδίωση της μορφίνης και των καρβοξυλικών οξέων κ.α. Μερικές φορές είναι δυνατόν οι αντιδράσεις της Φάσης II να οδηγήσουν σε μείωση της διαλυτότητας ενός μορίου στο νερό, όπως γίνεται π.χ. στην Ν-ακετυλοποίηση των αρωματικών αμινών. Τέλος, όπως αναφέρει ο Josephy et al., σε ορισμένες περιπτώσεις, είναι δυνατόν οι αντιδράσεις της Φάσης II να προηγηθούν εκείνων της Φάσης I (Josephy et al., 2005).

Πρέπει να αναφερθεί πως τα τελευταία χρόνια αρχίζει να επικρατεί η άποψη ότι ενώ ο κλασικός διαχωρισμός σε μεταβολική φάση I και II προσφέρει μια ευκολία στη μελέτη των ξενοβιοτικών, είναι παραπλανητικός και απαρχαιωμένος (Testa and Kramer, 2006). Η αρχική πρόθεση ήταν να δοθεί έμφαση στο ότι οι αντιδράσεις σύζευξης (Φάση II) καταλήγουν σε λιγότερο ενεργά προϊόντα, σε αντίθεση με τις αντιδράσεις της Φάσης I που μπορεί να οδηγήσουν είτε σε πιο ενεργούς είτε σε πιο ανενεργούς μεταβολίτες. Αποδείχθηκε όμως ότι οι αντιδράσεις σύζευξης μπορούν να δώσουν, σε μερικές περιπτώσεις, πιο ενεργούς μεταβολίτες (π.χ. S-σύζευξη αλοαλκανίων με γλουταθειόνη, 6-γλουκουρονοποίηση της μορφίνης κ.α.) (Josephy et al., 2005). Επομένως ίσως είναι πιο δόκιμο να χρησιμοποιείται ο όρος "αντιδράσεις λειτουργικότητας" για τις αντιδράσεις φάσης I και ο όρος "αντιδράσεις σύζευξης" για εκείνες της Φάσης II (Testa and Kramer, 2006).

Πέραν των μεταβολικών φάσεων I και II, πρέπει να σημειωθεί πως υπάρχει και μεταβολική φάση III, η οποία περιλαμβάνει την Ρ-γλυκοπρωτεΐνη (Ρ-gr), την multidrug

resistance-associated πρωτεΐνη (MRP) και το πολυπεπτίδιο μεταφοράς οργανικών ανιόντων 2 (OATP2). Αυτοί οι παράγοντες εκφράζονται στο ήπαρ, το έντερο, τους νεφρούς και τον εγκέφαλο και είναι δυνατόν να παίζουν σημαντικό ρόλο στην απορρόφηση, την κατανομή και την απέκκριση ενός φαρμάκου. Η P-gp και η MRP χρησιμοποιούν ενέργεια, η οποία προέρχεται από την υδρόλυση του ATP για να μεταφέρουν διάφορα υποστρώματα από την μια πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης στην άλλη. Τέτοια υποστρώματα μπορεί να είναι αμινοξέα, ιόντα, σάκχαρα, λιπίδια και διάφορα ξενοβιοτικά. Το OATP2 μπορεί να μεταφέρει μια πληθώρα ενδογενών και εξωγενών παραγόντων, συμπεριλαμβανομένης της συζευγμένης και μη συζευγμένης χολερυθρίνης, των συζευγμένων στεροειδών, των οργανικών κατιόντων τύπου 2, των θυρεοειδικών ορμονών T3 και T4 καθώς και των αλάτων της χολής (Xu et al., 2005).

Όπως προαναφέρθηκε, ο μεταβολισμός των ξενοβιοτικών γίνεται κυρίως μέσω των κυτοχρωμάτων CYP, η δράση και η ρύθμιση των οποίων θα αναπτυχθούν ενδελεχώς στα επόμενα Κεφάλαια. Άλλοι παράγοντες, όπως οι αλδεϋδικές αφυδρογονάσες (ALDHs) (Παππάς, 1996), (Vasiliou et al., 2000), η γλουταθειόνη (GSH) (Wang and Ballatori, 1998), (Balendiran et al., 2004), οι τρανσφεράσες της γλουταθειόνης (GSTs) (Hayes et al., 2005), (Parl, 2005) και οι κατεχολ-Ο-μεθυλτρανσφεράσες (COMT) (Zhu, 2002), παίζουν επίσης σημαίνοντα ρόλο στο μεταβολισμό των ξενοβιοτικών, η διερεύνησή τους όμως δεν είναι μέσα στο πεδίο αυτής της μελέτης.

2.2. Κυτοχρώματα CYPs

2.2.1. Γενικά

Τα κυτοχρώματα P450 (CYPs) είναι μια μεγάλη οικογένεια πρωτεϊνών, οι οποίες εντοπίζονται σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς και μεταβολίζουν μια τεράστια ποικιλία υποστρωμάτων, τόσο ενδογενών όσο και εξωγενών (ξеноβιοτικών) (Wrighton and Stevens, 1992), (Ingelman-Sundberg, 2004), (Guengerich, 2006). Τα CYPs έχουν εντοπισθεί στα θηλαστικά, τα ψάρια, τα φυτά, τα έντομα, τα βακτήρια και τους μύκητες. Στο επίπεδο του κυττάρου, τα κυτοχρώματα CYPs εντοπίζονται στα μιτοχόνδρια, την μεμβράνη του πυρήνα του κυττάρου και στα μικροσωμάτια (λείο ενδοπλασματικό δίκτυο). Στα μιτοχόνδρια, τα CYPs παίρνουν μέρος στη βιοσύνθεση ενδογενών παραγόντων, όπως είναι οι στεροειδείς ορμόνες και τα χολικά οξέα, καθώς και στο μεταβολισμό της βιταμίνης D3. Επίσης, μεταβολίζουν και ξеноβιοτικά, ειδικά προκαρκινογόνες ουσίες. Τα CYPs των μικροσωματίων διαδραματίζουν, επίσης, σημαντικό ρόλο στην βιοσύνθεση των ενδογενών στεροειδών αλλά εμπλέκονται κυρίως στο μεταβολισμό φαρμάκων και άλλων ξеноβιοτικών, ο οποίος έχει συνήθως ως αποτέλεσμα την αδρανοποίηση και απέκκριση των μορίων αυτών από τον οργανισμό (Ioannides and Parke, 1990).

Στα θηλαστικά τα ένζυμα αυτά εκφράζονται πρακτικά σε όλους τους ιστούς, με την μεγαλύτερη έκφραση να συναντάται στο ήπαρ. Επίσης, στον άνθρωπο τα κυτοχρώματα CYPs εντοπίζονται στους νεφρούς, τους πνεύμονες, το έντερο, τον εγκέφαλο, τα επινεφρίδια, τους όρχεις, τις ωοθήκες, την καρδιά, τον βλεννογόνο της μύτης και της τραχείας, το δέρμα (Sarlis and Gourgiotis, 2005), (Pelkonen et al., 2008), το ενδοθήλιο των αγγείων, τους μαστούς, τον πλακούντα, καθώς και σε κύτταρα όπως τα λεμφοκύτταρα (Pelkonen and Raunio, 1997) και τα ερυθρά αιμοσφαίρια (Zuber et al., 2002).

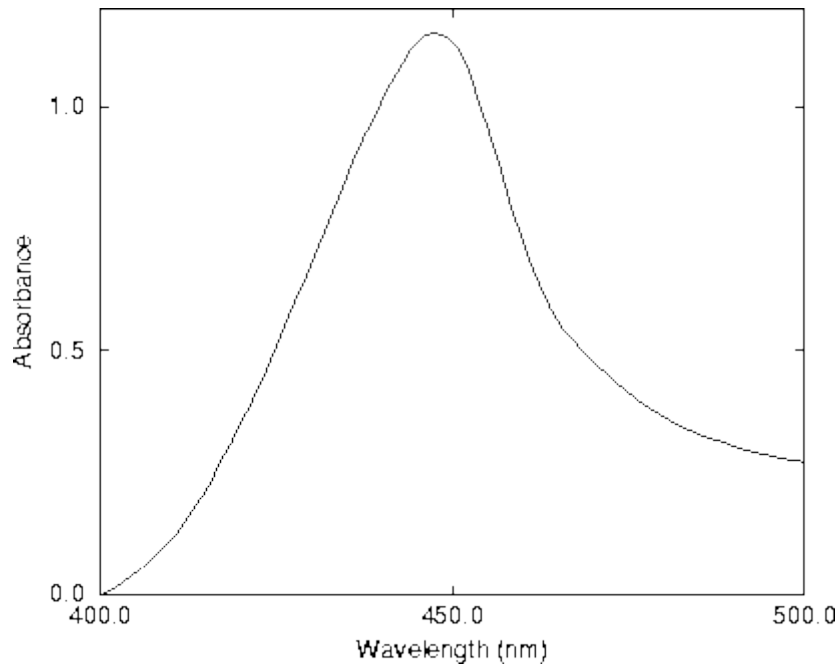
Στο ανθρώπινο γονιδίωμα έχουν ανιχνευθεί 57 λειτουργικά CYP γονίδια και 58 ψευδογονίδια (Nelson et al., 2004) (βλ. **Πίνακα 3** με τα CYP στον άνθρωπο). Από τα 57 λειτουργικά γονίδια, τα 15 μεταβολίζουν ξеноβιοτικά, τα 14 παίρνουν μέρος στο μεταβολισμό μορίων, όπως είναι τα χολικά οξέα, 9 σχετίζονται με τον μεταβολισμό λιπαρών οξέων και εικοσανοειδών, 4 μεταβολίζουν κυρίως ορμόνες, ενώ υπάρχουν άλλα 15 για τα οποία δεν υπάρχουν επαρκείς πληροφορίες (ορφανά κυτοχρώματα) (Guengerich, 2003).

<i>CYP1A1</i>	<i>CYP3A4</i>	<i>CYP8A1</i>
<i>CYP1A2</i>	<i>CYP3A5</i>	<i>CYP8B1</i>
<i>CYP1B1</i>	<i>CYP3A7</i>	<i>CYP11A1</i>
<i>CYP2A6</i>	<i>CYP3A43</i>	<i>CYP11B1</i>
<i>CYP2A7</i>	<i>CYP4A11</i>	<i>CYP11B2</i>
<i>CYP2A13</i>	<i>CYP4A22</i>	<i>CYP17A1</i>
<i>CYP2B6</i>	<i>CYP4B1</i>	<i>CYP19A1</i>
<i>CYP2C8</i>	<i>CYP4F2</i>	<i>CYP20A1</i>
<i>CYP2C9</i>	<i>CYP4F3</i>	<i>CYP21A2</i>
<i>CYP2C18</i>	<i>CYP4F8</i>	<i>CYP24A1</i>
<i>CYP2C19</i>	<i>CYP4F11</i>	<i>CYP26A1</i>
<i>CYP2D6</i>	<i>CYP4F12</i>	<i>CYP26B1</i>
<i>CYP2E1</i>	<i>CYP4F22</i>	<i>CYP26C1</i>
<i>CYP2F1</i>	<i>CYP4V2</i>	<i>CYP27A1</i>
<i>CYP2J2</i>	<i>CYP4X1</i>	<i>CYP27B1</i>
<i>CYP2R1</i>	<i>CYP4Z1</i>	<i>CYP27C1</i>
<i>CYP2S1</i>	<i>CYP5A1</i>	<i>CYP39A1</i>
<i>CYP2U1</i>	<i>CYP7A1</i>	<i>CYP46A1</i>
<i>CYP2W1</i>	<i>CYP7B1</i>	<i>CYP51A1</i>

Πίνακας 3: Λίστα με τα λειτουργικά γονίδια *CYP* του ανθρώπου (Nelson et al., 2004).

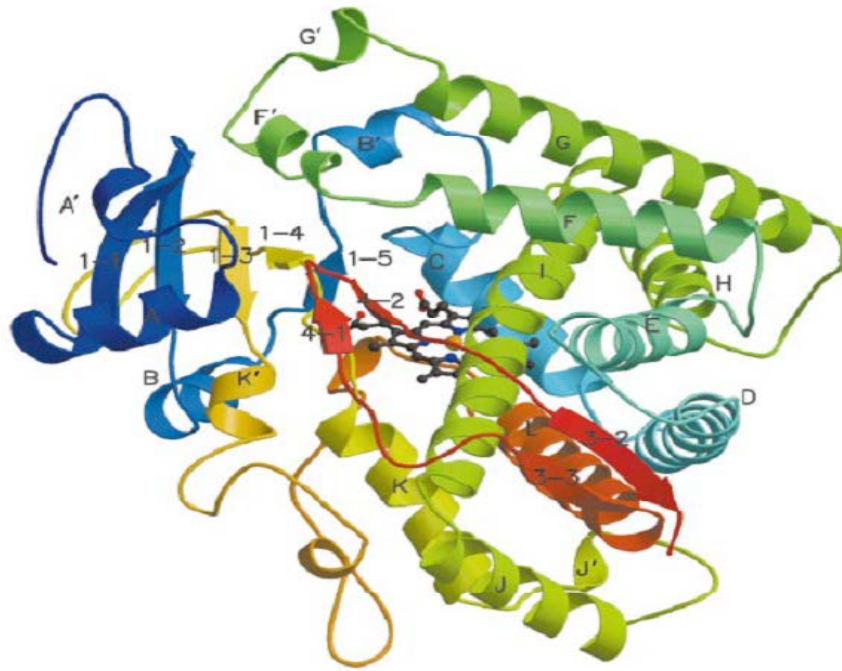
Ανακάλυψη και τρόπος δράσης

Η πρώτη αναφορά στα κυτοχρώματα *CYP* έγινε στα μέσα της δεκαετίας του '50 στις μελέτες του Axelrod, του Brodie και των συνεργατών τους, οι οποίοι ανίχνευσαν ένα ενζύμο το οποίο οξειδώνει ξενοβιοτικούς παράγοντες στο ηπατικό ενδοπλασματικό δίκτυο. Λίγα χρόνια αργότερα, δύο άλλες ερευνητικές ομάδες, των Klingenberg, Farfinkel και των συνεργατών τους, βρήκαν μια χρωστική στα ηπατικά μικροσωμάτια, η οποία βρίσκονταν συνδεδεμένη με μόρια μονοξειδίου του άνθρακα (CO) και είχε μέγιστη απορρόφηση φωτός στα 450nm (**Σχήμα 3**). Μια δεκαετία αργότερα, αυτή η χρωστική αποδείχθηκε ότι ήταν μια αιμοπρωτεΐνη (Segall, 1997) και οι Sato και Omura της έδωσαν το όνομα "P450" (Guengerich, 2001).



Σχήμα 3: Η απορρόφηση του κυτοχρώματος CYP450 (μέγιστη απορρόφηση στα 450nm) (Segall, 1997).

Οι δομές των CYP πρωτεϊνών εμφανίζουν μεγάλες ομοιότητες μεταξύ τους. Οι πρωτεΐνες διατάσσονται σε σειρές από έλικες και πτυχώσεις. Οι έλικες διαχωρίζονται σε A μέχρι L και οι έλικες I και L έρχονται σε επαφή με την αίμη, ενώ οι έλικες B, F και I είναι εκείνες που εφάπτονται με το υπόστρωμα. Το κυτόχρωμα P450 καταλαμβάνει μια τρισδιάστατη δομή στο χώρο, η οποία αποτελείται από το ενεργό κέντρο, την περιοχή αναγνώρισης και δέσμευσης του υποστρώματος και την περιοχή σύνδεσης με την αίμη (Guengerich, 2001). Στην **Εικόνα 2** παρουσιάζεται η 3D δομή του κυτοχρώματος CYP2C9.



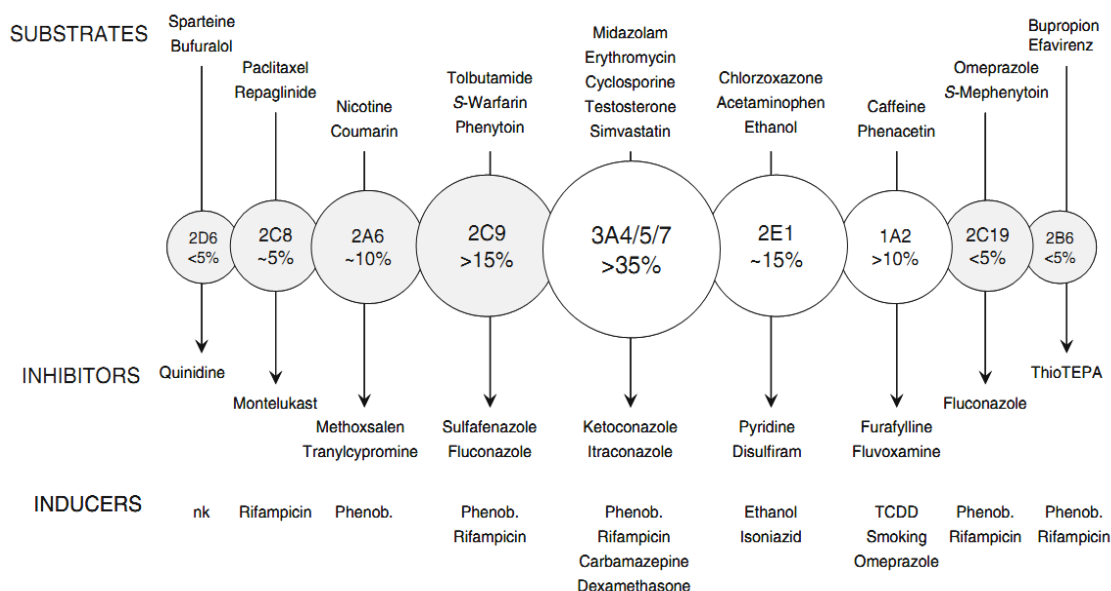
Εικόνα 2: Μοριακή δομή του ανθρώπινου κυτοχρώματος CYP2C9. Το N-άκρο της πρωτεΐνης παρουσιάζεται με μπλέ χρώμα, ενώ το C-άκρο της με κόκκινο χρώμα. Το μόριο της αίμης βρίσκεται στο κέντρο (μαύρο χρώμα) σε επαφή με τις έλικες I και L (Williams et al., 2003).

Ονοματολογία

Τα κυτοχρώματα CYP των θηλαστικών διαχωρίζονται σε 18 οικογένειες και 42 υποοικογένειες (Sarlis and Gourgiotis, 2005). Η υπεροικογένεια (superfamily) των κυτοχρωμάτων CYP χωρίζεται σε οικογένειες (families), οι οποίες καταδεικνύονται από έναν αραβικό αριθμό (π.χ. CYP1, CYP2, CYP3 κ.ο.κ.). Τα μέλη της ίδιας οικογένειας CYP έχουν τουλάχιστον 40% ίδια ομολογία αμινοξέων της πρωτοταγούς τους δομής. Τα μέλη μιας οικογένειας, τα οποία παρουσιάζουν τουλάχιστον 55% ομολογία αμινοξέων στην πρωτοταγή δομή τους αποτελούν μια υποοικογένεια (subfamily), η οποία καθορίζεται από ένα λατινικό γράμμα (π.χ. CYP1A, CYP1B κ.ο.κ.). Σε περίπτωση που ισόένζυμα μια υποοικογένειας διαφέρουν πάνω από 3% στην πρωτοταγή δομή τους, τότε αποτελούν μια ξεχωριστή ισομορφή, η οποία καταδεικνύεται με έναν

αραβικό αριθμό (π.χ. CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 κ.ο.κ.) (Zuber et al., 2002), (Ingelman-Sundberg, 2004), (Martignoni et al., 2006).

Από το σύνολο των κυτοχρωμάτων CYP του ανθρώπου, τα CYP1, CYP2, CYP3 και σε μικρότερο βαθμό το CYP4 μεταβολίζουν σχεδόν αποκλειστικά τα ξενοβιοτικά (Nebert and Russell, 2002). Η οικογένεια CYP1 εμπλέκεται κυρίως στη μεταβολική ενεργοποίηση προκαρκινογόνων σε καρκινογόνες/τοξικές ουσίες, ενώ οι οικογένειες CYP2 και CYP3 μεταβολίζουν φάρμακα και άλλα ξενοβιοτικά, σε πιο σταθερά και υδρόφιλα μόρια, τα οποία είναι εύκολο να αποβληθούν (Gonzalez and Yu, 2006). Οι πιο σημαντικές υποοικογένειες κυτοχρωμάτων είναι η CYP3A, η CYP2C και η CYP2D (Ingelman-Sundberg, 2002), οι οποίες είναι υπεύθυνες για το μεταβολισμό της πλειονότητας των πιο συχνά συνταγογραφούμενων φαρμάκων (Zhou et al., 2007) και γι' αυτό το λόγο, αποτελούν το αντικείμενο της παρούσας μελέτης. Επίσης, άλλες σημαντικές υποοικογένειες CYP είναι η CYP2A, η CYP2E (εκπροσωπούμενη από την ισομορφή CYP2E1) και τέλος οι υποοικογένειες CYP1A και η CYP2B. Στο **Σχήμα 4** παρουσιάζεται η περιεκτικότητα των διαφόρων ισομορφών των πιο σημαντικών κυτοχρωμάτων στο ήπαρ. Επίσης, παρατίθενται τα πιο γνωστά υποστρώματα, επαγωγείς ή αναστολείς της κάθε ισομορφής.



Σχήμα 4: Σχετική περιεκτικότητα των διαφόρων ισομορφών CYP στο ήπαρ και παραδείγματα υποστρωμάτων, επαγωγέων και αναστολέων. Επεξηγήσεις: Inducers, επαγωγείς; Inhibitors, αναστολείς; Substrates, υποστρώματα (Pelkonen et al., 2008).

Επαγωγή & Αναστολή

Η επαγωγή και αναστολή των κυτοχρωμάτων *CYP* παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην έκφραση τους και επομένως, εν γένει, στον μεταβολισμό των ξενοβιοτικών. Τόσο η επαγωγή όσο και η αναστολή μπορούν να οδηγήσουν σε επικίνδυνες αλληλεπιδράσεις, οι οποίες έχουν σαν αποτέλεσμα την αυξημένη βιοδιαθεσιμότητα και την ανάπτυξη τοξικών επιπέδων ενός φαρμάκου στο αίμα (μειωμένος μεταβολισμός λόγω αναστολής του *CYP*) ή αντιθέτως, την αποτυχία της φαρμακοθεραπείας (αυξημένος μεταβολισμός λόγω αναστολής του *CYP*). Για τον ακριβή ρόλο της επαγωγής και της αναστολής των *CYPs* και τις συνέπειές τους στον μεταβολισμό ξενοβιοτικών θα γίνει ξεχωριστή αναφορά στο Κεφάλαιο 3 (Pelkonen et al., 2008).

2.2.2. Υποοικογένεια CYP3A

Γενικά

Τα κυτοχρώματα της υποοικογένειας *CYP3A* είναι υπεύθυνα για το μεταβολισμό της πλειοψηφίας των πιο συχνά συνταγογραφούμενων φαρμάκων. Στα υποστρώματα της υποοικογένειας *CYP3A* περιλαμβάνονται αντικαρκινικά φάρμακα, όπως οι ταξόλες και η βινκριστίνη, ανοσοκατασταλτικά, όπως η κυκλοσπορίνη και ο τακρόλιμος, οι βενζοδιαζεπίνες, αντιβιοτικά, όπως τα μακρολίδια (π.χ. ερυθρομυκίνη), οι στατίνες κ.α. Επίσης, τα κυτοχρώματα αυτά μεταβολίζουν άλλα ξενοβιοτικά, καθώς και μεγάλη ποικιλία ενδογενών ουσιών, όπως η τεστοστερόνη, η προγεστερόνη, άλλες ορμόνες και στεροειδή, χολικά άλατα κ.α. (Zanger et al., 2008). Η υποοικογένεια *CYP3A* στον άνθρωπο, αποτελείται από τέσσερα διαφορετικά ισοένζυμα, το *CYP3A4*, *CYP3A5*, *CYP3A7* και το *CYP3A43*, που αποτελούν περίπου το 60% του συνόλου των κυτοχρωμάτων P450 (Spatzenegger and Jaeger, 1995) και επομένως η υποοικογένεια αυτή θεωρείται η πιο σημαντική για το μεταβολισμό φαρμάκων. Μεταβολές στην δραστηριότητα των *CYP3A* είναι δυνατόν να προκαλέσουν αλλαγές στο μεταβολισμό φαρμάκων, τόσο στο ήπαρ όσο και στο έντερο, καθώς και στην κάθαρση των φαρμάκων αυτών από τους νεφρούς (Liu et al., 2007).

CYP3A4

Η ισομορφή CYP3A4 είναι το πιο συχνά συναντούμενο κυτόχρωμα στο ήπαρ, αφού αντιπροσωπεύει περίπου το 30% των ολικών ηπατικών κυτοχρωμάτων (Shimada et al., 1994). Θεωρείται το πιο σημαντικό κυτόχρωμα, αφού είναι υπεύθυνο για τον μεταβολισμό πάνω από 50% των συχνά συνταγογραφούμενων φαρμάκων (Wrighton and Stevens, 1992). Το CYP3A4 στον ανθρώπινο οργανισμό εκφράζεται κυρίως στο ήπαρ, τους πνεύμονες, τους νεφρούς και το λεπτό έντερο, όπου επιτελεί την εξαιρετικά σημαντική λειτουργία της ενεργοποίηση προφαρμάκων. Επίσης, σε μικρότερο βαθμό εκφράζεται στον εγκέφαλο, το ενδοθήλιο των αγγείων, το δέρμα και τον πλακούντα (Pelkonen and Raunio, 1997). Το CYP3A4 εμπλέκεται σε αντιδράσεις κατάλυσης σημαντικότερων αντιδράσεων, όπως της βιοσύνθεσης στεροειδών, χοληστερόλης αλλά και άλλων λιπιδίων. Επίσης, όπως προαναφέρθηκε, αποτελεί την σημαντικότερη ισομορφή CYP για τον μεταβολισμό φαρμάκων και άλλων ξενοβιοτικών, αφού είναι υπεύθυνο για το μεταβολισμό περίπου 200 διαφορετικών φαρμάκων. Η ποικιλία των ουσιών που αποτελούν υποστρώματα του CYP3A4 είναι τεράστια και είναι χαρακτηριστικό ότι μπορεί να μεταβολίσει από ουσίες μικρού μοριακού βάρους (π.χ. Λιδοκαΐνη, 234 Daltons), μέχρι ουσίες με πολύ μεγάλο μοριακό βάρος (π.χ. Κυκλοσπορίνη, 1203 Daltons), κάτι που καταδεικνύει την μη-εξειδικευμένη φύση του (Zhou et al., 2007). Τα πιο σημαντικά υποστρώματα του CYP3A4 παρουσιάζονται στον **Πίνακα 4**. Αναφορά πρέπει να γίνει και στο γεγονός ότι το CYP3A4 είναι υπεύθυνο για τον μεταβολισμό της Αφλατοξίνης B1, η οποία όταν ενεργοποιηθεί μπορεί να δράσει ως καρκινογόνος παράγοντας (Shimada and Guengerich, 1989).

Αζιθρομυκίνη	μακρολίδιο (αντιβιοτικό)
Αλμπενταζόλη	αντιπαρασιτικό
Αλοπεριδόλη	αντιψυχωσικό
Αλπραζολάμη	βενζοδιαζεπίνη
Αλφεντανίλη	οπιοειδές αναλγητικό
Αμιοδαρόνη	αντιαρρυθμικό
Αμλοδιπίνη	αναστολέας διαύλων ιόντων Ca ⁺²
Αμπρεναβίρη	αναστολέας πρωτεάσης του HIV
Αριπιπραζόλη	αντιψυχωσικό / αντικαταθλιπτικό
Αταζαναβίρη	αναστολέας πρωτεάσης του HIV

Ατορβαστατίνη	αναστολέας αναγωγής του HMG-CoA
Βαρδεναφίλη	αναστολέας της PDE5
Βενλαφαξίνη	SSNRI αντικαταθλιπτικό
Βεραπαμίλη	αναστολέας διαύλων ιόντων Ca ⁺²
Βενζφεταμίνη	ανορεξιογόνο
Βηταμεθαζόνη	στεροειδές
Βινκριστίνη	αναστολέας της μίτωσης
Βινμπλαστίνη	αναστολέας της μίτωσης
Βινορελμίνη	αναστολέας της μίτωσης
Βισοπρολόλη	β ₂ -αδρενεργικός ανταγωνιστής
Βοζεντάνη	ανταγωνιστής υποδοχέα ενδοθηλίνης ET-A/B
Βορικοναζόλη	αντιμυκητιασικό
Βουδεζονίδη	κορτικοστεροειδές
Βουπιβακαΐνη	τοπικό αναισθητικό
Βουπρενορφίνη	οπιοειδές αναλγητικό
Βουσπιρόνη	ανταγωνιστής του υποδοχέα σεροτονίνης 5-HT _{1A}
Βρομοκρίπτίνη	ντοπαμινεργικός ανταγωνιστής
Βρωμαζεπάμη	βενζοδιαζεπίνη
Γαλανταμίνη	αναστολέας της ακετυλοχολινεστεράσης
Γεστοδένη	προγεστερόνη
Γρανισετρόνη	ανταγωνιστής του υποδοχέα σεροτονίνης 5-HT ₃
Δανδρολένη	μυοχαλαρωτικό
Δαψόνη	αντιλεπρωτικό
Διαζεπάμη	βενζοδιαζεπίνη
Διλτιαζέμη	αναστολέας διαύλων ιόντων Ca ⁺²
Δισοπυραμίδη	αντιαρρυθμικό
Διυδραλαζίνη	αγγειοδιασταλτικό
Διυδροεργοταμίνη	αλκαλοειδές ερυσιβώδους όλυρας
Δοσεταξέλη	αναστολέας της μίτωσης
Δοξεπίνη	τρικυκλικό αντικαταθλιπτικό
Δοξορουμπικίνη	αναστολέας της τοποϊσομεράσης III
Δοξυξυκλίνη	τετρακυκλίνη (αντιβιοτικό)
Εβαστίνη	ανταγωνιστής υποδοχέα ισταμίνης H ₁
Εθοσουξιμίδη	αντιεπιληπτικό
Εναλαπρίλη	AMEA
Επλερενόνη	ανταγωνιστής αλδοστερόνης
Εργοταμίνη	αλκαλοειδές ερυσιβώδους όλυρας
Ερυθρομυκίνη	μακρολίδιο (αντιβιοτικό)
Εσιταλοπράμη	SSRI αντικαταθλιπτικό
Εσομεπραζόλη	αναστολέας αντλίας πρωτονίων (PPI)
Ετονογεςτρέλη	αντισυλληπτικό
Ετοποσίδη	αναστολέας της τοποϊσομεράσης III
Ετορικοξίβη	αναστολέας της COX-2

Εφαβιρένζη	μη νουκλεοσιδικός αναστολέας της ανάστροφης μεταγραφάσης του HIV (NNRTI)
Ζολπιδέμη	υπνωτικό
Ζοπικλόνη	υπνωτικό
Θεοφυλλίνη	βρογχοδιασταλτικό
Ιματινίβη	αναστολέας της BCR-ABL κινάσης
Ινδιναβίρη	αναστολέας πρωτεάσης του HIV
Ισοσορβίδη	αγγειοδιασταλτικό
Ιτρακοναζόλη	αντιμυκητιασικό
Καρβαμαζεπίνη	αντιεπιληπτικό
Κεταμίνη	ανταγωνιστής υποδοχέα NMDA
Κετοκοναζόλη	αντιμυκητιασικό
Κετιαπίνη	αντιψυχωσικό
Κινιδίνη	αντιαρρυθμικό
Κινίνη	αντιελονοσιακό
Κλαριθρομυκίνη	μακρολίδιο (αντιβιοτικό)
Κλοβαζάμη	βενζοδιαζεπίνη
Κλοναζεπάμη	βενζοδιαζεπίνη
Κλοραζεπάτη	βενζοδιαζεπίνη
Κοκαΐνη	τοπικό αναισθητικό
Κολχικίνη	αναστολέας της μίτωσης
Κορτιζόλη	γλυκοκορτικοειδές
Κυκλοφωσφαμίδη	κυτταροτοξικό
Κυκλοσπορίνη	αναστολέας καλσινευρίνης
Λανσοπραζόλη	αναστολέας αντλίας πρωτονίων (PPI)
Λεβονεστρογέλη	αντισυλληπτικό
Λιδοκαΐνη	τοπικό αναισθητικό
Λοβαστατίνη	αναστολέας αναγωγάσης του HMG-CoA
Λοπιναβίρη	αναστολέας πρωτεάσης του HIV
Λοσαρτάνη	αναστολέας υποδοχέα της αγγειοτενσίνης AT ₁
Μεδροξυπρογεστερόνη	αντισυλληπτικό
Μεθαδόνη	συνθετικό οπιοειδές
Μεφλοκίνη	αντιελονοσιακό
Μιδαζολάμη	βενζοδιαζεπίνη
Μικοναζόλη	αντιμυκητιασικό
Μιρταζαπίνη	SNRI αντικαταθλιπτικό
Μιφεπριστόνη	συνθετικό στεροειδές με αντιπρογεστερονική δράση
Μοδαφινίλη	ανορεξιογόνο
Μοντελουκάστη	ανταγωνιστής υποδοχέα λευκοτριενίων D ₄
Νατεγλινίδη	μεγλιτινίδη (αντιδιαβητικό)
Νεβιραπίνη	μη νουκλεοσιδικός αναστολέας της ανάστροφης μεταγραφάσης του HIV (NNRTI)
Νελφίναβιρη	αναστολέας πρωτεάσης του HIV
Νικαρδιπίνη	αναστολέας διαύλων ιόντων Ca ⁺²

Νιφεδιπίνη	αναστολέας διαύλων ιόντων Ca^{+2}
Νοργεστρέλη	προγεστερινοειδές
Οιστραδιόλη	οιστρογόνο στεροειδές
Ολεανδομυκίνη	μακρολίδιο (αντιβιοτικό)
Ονδανσετρόνη	ανταγωνιστής του υποδοχέα σεροτονίνης 5-HT ₃
Οξαζεπάμη	βενζοδιαζεπίνη
Πακλιταξέλη	αναστολέας της μίτωσης
Περγολίδη	αλκαλοειδές ερυσιβώδους όλυρας
Πιμοζίδη	αντιψυχωσικό
Πιογλιταζόνη	αγωνιστής PPAR- γ / θειαζολιδινεδιόνη (αντιδιαβητικό)
Πριμακίνη	αντιελονοσιακό
Προγεστερόνη	στεροειδές
Ραβεπραζόλη	αναστολέας αντλίας πρωτονίων (PPI)
Ραλοξιφένη	εκλεκτικός τροποποιητής των οιστρογονικών υποδοχέων (SERM)
Ραπαμυκίνη	ανοσοκατασταλτικό
Ρεπαγλινίδη	μεγλιτινίδη (αντιδιαβητικό)
Ριτοναβίρη	αναστολέας πρωτεάσης του HIV
Ριφαμίνη	αντιφυματικός παράγοντας
Ριφαμπουτίνη	αντιφυματικός παράγοντας
Σακιναβίρη	αναστολέας πρωτεάσης του HIV
Σαλβουταμόλη	β_2 -αδρενεργικός αγωνιστής
Σιβουτραμίνη	ανορεξιογόνο
Σιλδεναφίλη	αναστολέας της PDE5
Σιμβαστατίνη	αναστολέας αναγωγάσης του HMG-CoA (στατίνη)
Σιταλοπράμη	SSRI αντικαταθλιπτικό
Σουφεντανίλη	οπιοειδές αναλγητικό
Σπιρονολακτόνη	ανταγωνιστής αλδοστερόνης
Ταδαλαφίλη	αναστολέας της PDE5
Ταμοξιφένη	εκλεκτικός τροποποιητής των οιστρογονικών υποδοχέων (SERM)
Ταμσουλοσίνη	α_1 -αδρενεργικός ανταγωνιστής
Τακρόλιμος	ανοσοκατασταλτικό
Τερφεναδίνη	ανταγωνιστής του υποδοχέα ισταμίνης H ₁
Τετρακυκλίνη	αντιβιοτικό
Τιαγκαμπίνη	αντιεπιληπτικό
Τολτεροδίνη	ανταγωνιστής του μουςκαρινικού υποδοχέα
Τραζοδόνη	SSRI αντικαταθλιπτικό
Τριαζολάμη	βενζοδιαζεπίνη
Τριμεθοπρίμη	αντιβακτηριακό
Τριμιπραμίνη	τρικυκλικό αντικαταθλιπτικό
Τρογλιταζόνη	αγωνιστής PPAR- γ / θειαζολιδινεδιόνη (αντιδιαβητικό)
Φελοδιπίνη	αναστολέας διαύλων ιόντων Ca^{+2}
Φεντανύλη	οπιοειδές αναλγητικό

Φιναστερίδη	αναστολέας της 5α-ρεδουκτάσης
Φλουνιτραζεπάμη	βενζοδιαζεπίνη
Φλουραζεπάμη	βενζοδιαζεπίνη
Φλουτικαζόνη	κορτικοστεροειδές
Χλωροδιαζεποξίδη	βενζοδιαζεπίνη
Χλωροκίνη	αντιελονοσιακό
Χλωρφενιραμίνη	ανταγωνιστής του υποδοχέα ισταμίνης H ₁

Πίνακας 4: Υποστρώματα του CYP3A4 (Zhou et al., 2007).

Η έκφραση του κυτοχρώματος CYP3A4 εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την εθνικότητα και το φύλο. Το φύλο και η παρουσία συγκεκριμένων ορμονών, είναι δυνατόν να επηρεάσουν το κυτόχρωμα αυτό. Η έκφραση στις γυναίκες είναι 1.5 με 2 φορές αυξημένη συγκριτικά με τους άνδρες (Zanger et al., 2008), ενώ η δραστηριότητα του CYP3A4 είναι μεγαλύτερη στις γυναίκες, σε ποσοστό 24% (Hunt et al., 1992). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του μεταβολισμού ξενοβιοτικών, τα οποία μεταβολίζονται από το CYP3A4, με συνέπεια μεγάλες διαφορές στην φαρμακοκινητική μεταξύ ανδρών και γυναικών (Krecic-Shepard et al., 2000), (Diczfalusy et al., 2008). Το κυτόχρωμα CYP3A4 παρουσιάζει πολυμορφισμό, η συχνότητα εμφάνισης στον πληθυσμό όμως - συγκριτικά με τα κυτοχρώματα CYP2C9/18 και CYP2D6 - είναι πολύ χαμηλότερη. Εβδομήντα οκτώ διαφορετικές αλληλουχίες του *CYP3A4* έχουν αναγνωριστεί στον άνθρωπο και μάλιστα ένα αλληλίο (*CYP3A4*1B*) φαίνεται να παίζει σημαντικότατο ρόλο στους καρκίνους του μαστού και του προστάτη (Keshava et al., 2004).

Επαγωγή

Ορισμένες φαρμακευτικές ουσίες είναι δυνατόν να προκαλέσουν επαγωγή της έκφρασης του CYP3A4. Χαρακτηριστικά παραδείγματα φαρμακευτικών ουσιών, που μπορούν να δράσουν ως επαγωγείς του κυτοχρώματος *CYP3A4* είναι η ριφαμπικίνη, η δεξαμεθαζόνη, η φαινοβαρβιτάλη, η καρβαμαζεπίνη, η φαινοτοΐνη κ.α. Η επαγωγή του *CYP3A4* από αυτά τα φάρμακα, φαίνεται να γίνεται μέσω αύξησης της μεταγραφής (transcription activation) και σε αυτή εμπλέκονται οι πυρηνικοί υποδοχείς CAR και PXR, στους οποίους θα γίνει ειδική μνεία αργότερα (βλ. υποκεφάλαιο 3.5) (Burk and

Wojnowski, 2004), (Liu et al., 2007). Η ταυτόχρονη χορήγηση ριφαμπικίνης και κυκλοσπορίνης ή στεροειδών οδηγεί σε αύξηση του μεταβολισμού των τελευταίων, με επακόλουθο την μειωμένη αποτελεσματικότητα της θεραπείας (Spatzenegger and Jaeger, 1995). Ειδικότερα, ο συνδυασμός ριφαμπικίνης και 17 α -αιθυνυλοιστραδιόλης, η οποία χρησιμοποιείται σε αντισυλληπτικά χάπια, είναι δυνατόν να οδηγήσει σε αποτυχία της αντισυλληπτικής αγωγής (Guengerich, 1988). Πρέπει να σημειωθεί ότι η μειωμένη αποτελεσματικότητα της φαρμακοθεραπείας μπορεί να έχει καταστροφικές συνέπειες σε ασθενείς που πάσχουν από καρκίνο, επιληψία, σε άτομα που έχουν κάνει μεταμόσχευση οργάνων, γυναίκες που λαμβάνουν αντισυλληπτική αγωγή κ.τ.λ. (Liu et al., 2007). Στον **Πίνακα 5** παρουσιάζονται οι πιο σημαντικοί επαγωγείς του κυτοχρώματος CYP3A4.

Αμινογλουτεθιμίδη	αναστολέας αρωματάσης
Ατορβαστατίνη	αναστολέας αναγωγάσης του HMG-CoA
Βαλπροϊκό οξύ	αντιεπιληπτικό
Βοσεντάνη	ανταγωνιστής υποδοχέα ενδοθηλίνης ET-A/B
Δαψόνη	αντιλεπρωτικό
Δεξαμεθαζόνη	γλυκοκορτικοειδές
Εφαβιρένζη	μη νουκλεοσιδικός αναστολέας της ανάστροφης μεταγραφάσης του HIV (NNRTI)
Καρβαμαζεπίνη	αντιεπιληπτικό
Κορτιζόλη	γλυκοκορτικοειδές
Λοβαστατίνη	αναστολέας αναγωγάσης του HMG-CoA
Λοπιναβίρη	αναστολέας πρωτεάσης του HIV
Νεβιραπίνη	μη νουκλεοσιδικός αναστολέας της ανάστροφης μεταγραφάσης του HIV (NNRTI)
Οξικαρβαμαζεπίνη	αντιεπιληπτικό
Πεντοβαρβιτάλη	βαρβιτουρικό
Πριμιδόνη	αντιεπιληπτικό
Ριφαμπίνη	αντιφυματικός παράγοντας
Ριφαμπουτίνη	αντιφυματικός παράγοντας
Σιμβαστατίνη	αναστολέας αναγωγάσης του HMG-CoA
Φαινοβαρβιτάλη	βαρβιτουρικό
Φαινυτοΐνη	αντιεπιληπτικό
Φλουβαστατίνη	αναστολέας αναγωγάσης του HMG-CoA

Πίνακας 5: Επαγωγείς του CYP3A4 (Zhou et al., 2007).

Αναστολή

Ένας αριθμός φαρμάκων, είναι δυνατόν να προκαλέσει αναστολή του κυτοχρώματος *CYP3A4*. Γενικά, η αναστολή του *CYP3A* θεωρείται περισσότερο επικίνδυνη σε κλινικό επίπεδο σε σύγκριση με την επαγωγή, αφού η τελευταία οδηγεί σε μειωμένα επίπεδα φαρμάκων ενώ η πρώτη σε πιθανή τοξικότητα και ανεπιθύμητες ενέργειες (Burk and Wojnowski, 2004). Οι αναστολείς του κυτοχρώματος *CYP3A4* διακρίνονται σε δύο κατηγορίες, τους χημικούς αναστολείς και τα μονοκλωνικά αντισώματα ενάντια στο *CYP3A4* (Liu et al., 2007). Όταν αυτά τα φάρμακα / αντισώματα χορηγηθούν ταυτόχρονα με άλλα φάρμακα, τα οποία μεταβολίζονται από το κυτόχρωμα *CYP3A4*, ο μεταβολισμός των τελευταίων αναστέλλεται, με αποτέλεσμα τα επίπεδα των φαρμάκων αυτών στο πλάσμα να παραμένουν υψηλά με άμεσο κίνδυνο τοξικότητας, ειδικά όταν πρόκειται για φάρμακα με χαμηλό Θεραπευτικό Δείκτη (Therapeutic Index). Τέτοια παραδείγματα είναι η αναστολή του μεταβολισμού της βαρφαρίνης, που οδηγεί σε εκτεταμένη εσωτερική αιμορραγία, ή της θεοφυλλίνης, που μπορεί να προκαλέσει επιληπτικές κρίσεις (BNF 62, 2011). Είναι χαρακτηριστικό ότι στο παρελθόν φάρμακα, τα οποία βρέθηκαν να είναι πολύ ισχυροί αναστολείς του κυτοχρώματος *CYP3A4*, αποσύρθηκαν από την αγορά ή η ανάπτυξή τους σταμάτησε πριν καν γίνουν διαθέσιμα για συνταγογράφηση (Zhou et al., 2007). Το πιο χαρακτηριστικό παράδειγμα αλληλεπίδρασης φαρμάκων στις αρχές της δεκαετίας του '90, που οδήγησε τελικά στην απόσυρση ενός φαρμάκου από την αγορά, είναι αυτό της ταυτόχρονης χρήσης της τερφεναδίνης (αντιισταμινικό) και των αντιμυκητιασικών ιμιδαζολών, της κετοκοναζόλης και ιτρακοναζόλης. Οι ιμιδαζόλες προκαλούν αναστολή του *CYP3A4*, που οδηγεί σε δραματική αύξηση των επιπέδων της τερφεναδίνης και προκαλεί επέκταση του διαστήματος QT, αρρυθμία τύπου "*Torsades de pointes*", συγκοπτικά επεισόδια και πιθανώς θανατηφόρα κοιλιακή ταχυκαρδία (Honig et al., 1993), (Pohjola-Sintonen et al., 1993). Το κυτόχρωμα *CYP3A4* είναι δυνατόν να ανασταλεί ακόμη και από ουσίες που δεν ανήκουν στην κατηγορία των συνταγογραφούμενων φαρμάκων. Επί παραδείγματι, ο χυμός γκρέϊπ-φρούτ, ο οποίος χρησιμοποιείται ευρέως για τις αντιοξειδωτική και υποχολεστερολαιμική του δράση, είναι αναστολέας του *CYP3A4*. Η κατανάλωση χυμού μπορεί να οδηγήσει ακόμη και σε μείωση της τάξης του 47% των επιπέδων του *CYP3A4* ενώ η δράση του αυτή διατηρείται ακόμη και 24 ώρες μετά την κατανάλωση. Η καταστολή αυτή του *CYP3A4* μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένο μεταβολισμό και τα φάρμακα που φαίνεται να επηρεάζονται περισσότερο είναι οι αναστολείς διαύλων Ca^{+2} και οι αναστολείς

αναγωγής του HMG-CoA (στατίνες). Επομένως, συνιστάται σε ασθενείς, που λαμβάνουν θεραπεία με συγκεκριμένα φάρμακα που μεταβολίζονται από το CYP3A4, να μην καταναλώνουν χυμό γκρέϊπ-φρούτ κατά τη διάρκεια της θεραπείας (Kiani and Imam, 2007). Τέλος, ορισμένα μονοκλωνικά αντισώματα (mAb) μπορούν να αναγνωρίσουν ένα συγκεκριμένο αντιγονικό επίτοπο στην επιφάνεια της πρωτεΐνης του CYP3A4 και να οδηγήσουν στην αναστολή της ενζυμικής της λειτουργικότητας. Τα αντισώματα αυτά λειτουργούν ως μη ανταγωνιστικοί αναστολείς (Liu et al., 2007). Ο **Πίνακας 6** περιλαμβάνει τους πιο σημαντικούς αναστολείς του κυτοχρώματος CYP3A4.

Βεραπαμίλη	αναστολέας ιόντων Ca^{+2}
Γεστοδένη	προγεστερινοειδές
Ερυθρομυκίνη	μακρολίδιο (αντιβιοτικό)
κανναβιδιόλη	κανναβιδοειδές
Κετοκοναζόλη	αντιμυκητιασικό
Κλαριθρομυκίνη	μακρολίδιο (αντιβιοτικό)
Μικοναζόλη	αντιμυκητιασικό
Νιφεδιπίνη	αναστολέας ιόντων Ca^{+2}
Οιστραδιόλη	οιστρογόνο στεροειδές
Σιμετιδίνη	ανταγωνιστής του υποδοχέα ισταμίνης H_1
Τρολεανδομυκίνη	μακρολίδιο (αντιβιοτικό)
Φλουκοναζόλη	αντιμυκητιασικό

Πίνακας 6: Αναστολείς του CYP3A4 (Spatzenegger and Jaeger, 1995), (Zhou et al., 2007).

CYP3A5

Το ισοένζυμο CYP3A5 είναι το δεύτερο πιο σημαντικό κυτόχρωμα της υποοικογένειας CYP3A και εκφράζεται στο ήπαρ, αλλά επίσης και στο λεπτό έντερο, τους νεφρούς, τον προστάτη και τα επινεφρίδια (Koch et al., 2002), ενώ είναι το σημαντικότερο κυτόχρωμα στους πνεύμονες (Hukkanen et al., 2003). Η ιδιαιτερότητα του ηπατικού CYP3A5 έγκειται στο γεγονός ότι ανιχνεύεται μόνο στο 30% των ενηλίκων, όπου μπορεί να κυμαίνεται από 6 μέχρι 68% των συνολικών CYP3A (Wrighton et al., 1990). Επίσης, είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι εμφανίζει

πολυμορφισμό και ότι η έκφραση του CYP3A5 είναι πολύ πιο συχνή σε Αφροαμερικανούς (60%), σε σύγκριση με τους Καυκάσιους (33%) (Kuehl et al., 2001). Η ισομορφή CYP3A5 μοιράζεται μέχρι και 90% ομολογία αμινοξέων με την ισομορφή CYP3A4 και επομένως, είναι πολύ δύσκολο να τεκμηριωθεί η ακριβής συνεισφορά του καθενός στο μεταβολισμό των υποστρωμάτων τους (Xie et al., 2004), (Liu et al., 2007). Παρ' όλα αυτά, υπάρχουν διαφορές μεταξύ των δύο αυτών ισομορφών. Πιο συγκεκριμένα, έχει αποδειχθεί ότι η επλερενόνη (εκλεκτικός ανταγωνιστής της αλδοστερόνης) μεταβολίζεται σχεδόν αποκλειστικά από το CYP3A4 και ελάχιστα από το CYP3A5 (Cook et al., 2002). Επίσης, το CYP3A5 φαίνεται να είναι πιο ανθεκτικό στην ανασταλτική δράση της κετοκοναζόλης, σε σύγκριση με το CYP3A4 (Gibbs et al., 1999).

CYP3A7

Οι μελέτες μιας Ιαπωνικής ομάδας, ήταν οι πρώτες που επιβεβαίωσαν την ύπαρξη αυτής της CYP3A7 ισομορφής, η οποία εκφράζεται στο ήπαρ μόνο κατά την εμβρυϊκή ζωή. Επίσης, εκφράζεται στους νεφρούς, τα επινεφρίδια και τους πνεύμονες του εμβρύου (Kitada et al., 1985). Αργότερα, άλλες ομάδες επιβεβαίωσαν ότι τα επίπεδα έκφρασης του CYP3A7 είναι πολύ υψηλά κατά την εμβρυϊκή ζωή και πέφτουν δραματικά μέσα στην πρώτη εβδομάδα από την γέννηση (de Wildt et al., 1999). Το CYP3A7 φαίνεται να έχει τα ίδια υποστρώματα με τα CYP3A4 και CYP3A5 (Gillam et al., 1997), αν και οι ρυθμοί μεταβολισμού τους από το CYP3A7 είναι πολύ χαμηλότεροι σε σύγκριση με τους αντίστοιχους ρυθμούς μεταβολισμού από τις ισομορφές που συναντώνται στους ενήλικες (Williams et al., 2002).

CYP3A43

Η ισομορφή CYP3A43 ανακαλύφθηκε σχετικά πρόσφατα και φαίνεται να εκφράζεται κυρίως στον προστάτη, το ήπαρ, τους νεφρούς και το πάγκρεας. Η αλληλουχία των αμινοξέων του CYP3A43 είναι ίδια κατά 71-76% με τις υπόλοιπες ισομορφές της υποοικογένειας CYP3A, αλλά το κυτόχρωμα αυτό αποτελεί ένα απειροελάχιστο ποσοστό των συνολικών κυτοχρωμάτων του ήπατος και επομένως η σημασία του δεν είναι μεγάλη (Gellner et al., 2001).

Ισομορφές στον επίμυ

Στον επίμυ (*rattus norvegicus*) έχει αναφερθεί η παρουσία πέντε ισομορφών (CYP3A1, -3A2, -3A9, 3A18 και -3A62). Η έκφρασή τους εξαρτάται από το είδος του ιστού, με τις ισομορφές CYP3A1/2 να απαντώνται αποκλειστικά στο ήπαρ του επίμυ, τα CYP3A9/18 στο ήπαρ και το έντερο και την ισομορφή CYP3A62 να εκφράζεται μόνο στο έντερο. Πρέπει να αναφερθεί ότι και το φύλο παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην έκφραση ορισμένων ισομορφών, αφού τα CYP3A2 και CYP3A18 εκφράζονται μόνο στους αρσενικούς επίμυες ενώ η ισομορφή CYP3A9 συναντάται σε θηλυκούς επίμυες (Martignoni et al., 2006).

2.2.3. Υποοικογένεια CYP2C

Η υποοικογένεια CYP2C είναι, πιθανότατα, η πιο πολύπλοκη υποοικογένεια κυτοχρωμάτων CYPs, τόσο στον άνθρωπο, όσο και στα υπόλοιπα θηλαστικά, αφού διαθέτει μεγάλο αριθμό ισομορφών αλλά και εμφανίζει υψηλή συχνότητα πολυμορφισμού. Στον άνθρωπο, η υποοικογένεια αυτή είναι εξαιρετικά σημαντική για το μεταβολισμό ξενοβιοτικών, αφού μεταβολίζει το 30% περίπου των πιο συχνά συνταγογραφούμενων φαρμάκων (βλ. **Πίνακα 7**). Η υποοικογένεια CYP2C στον άνθρωπο περιλαμβάνει τέσσερις ισομορφές, τα CYP2C8, -2C9, -2C18 και -2C19. Αυτές - πλην του CYP2C18 - εκφράζονται κυρίως στο ήπαρ και μάλιστα αποτελούν το 20% των συνολικών κυτοχρωμάτων CYPs του ήπατος (Totah and Rettie, 2005). Ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα αυτής της υποοικογένειας είναι ότι οι τέσσερις ισομορφές CYP2C8, -2C9, -2C18 και -2C19 είναι κατά 82% ίδιες σε αλληλουχία αμινοξέων, παρ' όλα αυτά παρουσιάζουν αρκετές διαφορές όσον αφορά τα υποστρώματα, τα οποία μεταβολίζουν (Zhou et al., 2009b). Τέλος, όλες οι ισομορφές της υποοικογένειας CYP2C εμφανίζουν πολυμορφισμό, ο οποίος διαφέρει από ισομορφή σε ισομορφή, αλλά και μεταξύ των διάφορων πληθυσμών. Επομένως, είναι απαραίτητο να λαμβάνονται υπ' όψιν τόσο το γενετικό υπόβαθρο του κάθε ασθενούς, όσο και η φυλή του πριν την έναρξη θεραπείας με φάρμακα που μεταβολίζονται από την υποοικογένεια CYP2C.

Αζελαστίνη	αντιϊσταμινικό
Ακεκλοφενάκη	ΜΣΑΦ
Ακενοκουμαρόλη	αντιπηκτικό
Αλοπεριδόλη	αντιψυχωσικό
Αλπραζολάμη	βενζοδιαζεπίνη
Αμινοπυρίνη	αναλγητικό
Αμιοδαρόνη	αντιαρρυθμικό
Αμιτριπτυλίνη	τρικυκλικό αντικαταθλιπτικό
Αντιπυρίνη	αναλγητικό
Βαλδεκοξίβη	COX-2 αναστολέας
Βαλπροϊκό Οξύ	αντιεπιληπτικό
Βαλσαρτάνη	αναστολέας υποδοχέα της αγγειοτενσίνης AT ₁
Βαρφαρίνη	αντιπηκτικό
Βενλαφαξίνη	SSNRI αντικαταθλιπτικό
Βεραπαμίλη	αναστολέας διαύλων ιόντων Ca ⁺²
Βοζεντάνη	ανταγωνιστής υποδοχέων ενδοθηλίνης
Βορικοναζόλη	αντιμυκητιασικό
Βορτεζομίβη	αντικαρκινικό
Βουπρενορφίνη	οπιοειδές
Γλικλαζίδη	σουλφονουλουρία (αντιδιαβητικό)
Γλιμεπιρίδη	σουλφονουλουρία (αντιδιαβητικό)
Γλιπενκλαμίδη	σουλφονουλουρία (αντιδιαβητικό)
Γλιπιζίδη	σουλφονουλουρία (αντιδιαβητικό)
Δαψόνη	αντιβακτηριακό
Διαζεπάμη	βενζοδιαζεπίνη
Δικλοφενάκη	ΜΣΑΦ
Διφενυδραμίνη	αντιϊσταμινικό
Δονεπεξίλη	αναστολέας της ακετυλοχολινεστεράσης
Ελετριπτάνη	τριπτάνη
Εξοβαρβιτάλη	βαρβιτουρικό
Ετοδολάκη	ΜΣΑΦ
Ετορικοξίβη	COX-2 αναστολέας
Ζαφιρλουκάστη	ανταγωνιστής υποδοχέα λευκοτριενίων D4
Ζιλευτόνη	αναστολέας της 5-λιποξυγενάσης (αντιασθματικό)
Ζολπιδέμη	υπνωτικό
Ζοπικλόνη	υπνωτικό
Θαλιδομίδη	αντικαρκινικό / χρήση σε αυτοάνοσα νοσήματα
Ιβουπροφένη	ΜΣΑΦ
Ιματινίβη	αντικαρκινικό
Ινδομεθακίνη	ΜΣΑΦ
Ιρβεσαρτάνη	αναστολέας υποδοχέα της αγγειοτενσίνης AT ₁

Ισοφωσφαμίδη	αντικαρκινικό
Καντεσартάνη	αναστολέας υποδοχέα της αγγειοτενσίνης AT ₁
Καρβαμαζεπίνη	αντιεπιληπτικό
Καρβεδιλόλη	β-αδρενεργικός ανταγωνιστής
Κεταμίνη	αναισθητικό
Κιναριζίνη	αντιϊσταμινικό
Κλοζαπίνη	αντιψυχωσικό
Κλοπιδογρέλη	αντιθρομβωτικό
Κυκλοφωσφαμίδη	αντικαρκινικό
Λανσοπραζόλη	αναστολέας αντλίας πρωτονίων (PPI)
Λεφλουνομίδη	ανοσοκατασταλτικό
Λοσαρτάνη	αναστολέας υποδοχέα της αγγειοτενσίνης AT ₁
Λουμιρακοξίβη	COX-2 αναστολέας
Μεθαδόνη	οπιοειδές
Μεφαιντοΐνη	αντιεπιληπτικό
Μοντελουκάστη	ανταγωνιστής υποδοχέα λευκοτριενίων D4
Ναπροκένη	ΜΣΑΦ
Νατεγλινίδη	μεγλιτινίδη (αντιδιαβητικό)
Νεβιραπίνη	μη νουκλεοσιδικός αναστολέας της ανάστροφης μεταγραφάσης του HIV (NNRTI)
Νορτριπτιλύνη	τρικυκλικό αντικαταθλιπτικό
Ομεπραζόλη	αναστολέας αντλίας πρωτονίων (PPI)
Οξικάμες	ΜΣΑΦ
Πιογλιταζόνη	αγωνιστής PPAR-γ / θειαζολιδινεδιόνη (αντιδιαβητικό)
Πρασουγρέλη	αντιθρομβωτικό
Προγεστερόνη	στεροειδές
Προμαζίνη	αντιψυχωσικό
Προποφόλη	αναισθητικό
Προπρανολόλη	β-αδρενεργικός ανταγωνιστής
Ροζιγλιταζόνη	αγωνιστής PPAR-γ / θειαζολιδινεδιόνη (αντιδιαβητικό)
Ροζουβαστατίνη	αναστολέας αναγωγής του HMG-CoA
Ροφεκοξίβη	COX-2 αναστολέας
Σελεκοξίβη	COX-2 αναστολέας
Σιλденаφίλη	αναστολέας της PDE5
Σιταλοπράμη	SSRI αντικαταθλιπτικό
Σουλφομεθοξαζόλη	αντιβακτηριακό
Ταμοξιφένη	αντικαρκινικό
Δ9-Τετραϋδροκανναβινόλη	κανναβινοειδές
Τερμπιναφίνη	αντιμυκητιασικό
Τεστοστερόνη	στεροειδές
Τικλοπιδίνη	αντιθρομβωτικό
Τολβουταμίδη	σουλφονουλουρία (αντιδιαβητικό)
Τορασεμίδη	διουρητικό

Υδρομορφόνη	οπιοειδές
Φενοφαρβιτάλη	βαρβιτουρικό
Φαινυτοΐνη	αντιεπιληπτικό
Φλουβαστατίνη	αναστολέας αναγωγής του HMG-CoA
Φλουναριζίνη	αντιϊσταμινικό
Φλουοξετίνη	SSRI αντικαταθλιπτικό
Χλωροπροπραμίδη	σουλφονουλουρία (αντιδιαβητικό)

Πίνακας 7: Υποστρώματα των κυτοχρωμάτων της υποοικογένειας CYP2C στον άνθρωπο (Zuber et al., 2002), (Zhou et al., 2009b).

Ισομορφές στον άνθρωπο

CYP2C8

Είναι πολύ σημαντική ισομορφή, αφού αποτελεί ποσοστό 35% της υποοικογένειας CYP2C (Martignoni et al., 2006) και αντιπροσωπεύει περίπου το 7% των συνολικών ηπατικών CYPs (Shimada et al., 1994). Η έκφρασή του στο ήπαρ δεν είναι πολύ μεγάλη, αλλά ανιχνεύεται σε υψηλά ποσοστά στους νεφρούς, τα επινεφρίδια, την μήτρα και τις ωοθήκες, τους μαστούς, τον εγκέφαλο (Dai et al., 2001) και το δωδεκαδάκτυλο (Klose et al., 1999) (βλ. **Πίνακα 8**). Το CYP2C8 είναι υπεύθυνο για τον μεταβολισμό τόσο ξενοβιοτικών, όσο και ενδογενών παραγόντων (π.χ. ρετινόλη, αραχιδονικό οξύ) (Martignoni et al., 2006). Είναι σημαντικό να αναφερθεί πως η ισομορφή CYP2C8 είναι υπεύθυνη για το μεταβολισμό πληθώρας συνταγογραφούμενων φαρμάκων, συμπεριλαμβανομένων των θειαζολιδινεδιονών (π.χ. πιογλιταζόνη), του αντικαρκινικού πακλιταξέλη, των στατινών, των οπιοειδών ναρκωτικών, του αντιελονοσιακού χλωροκίνη κ.α. (Zhou et al., 2009a).

Το CYP2C8 εμφανίζει πολυμορφισμό και μάλιστα έχουν επιβεβαιωθεί τουλάχιστον 13 αλληλίες του, χωρίς να είναι όλα όμως σημαντικά σε κλινικό επίπεδο (Zhou et al., 2009a). Επί παραδείγματι, η πρωτεΐνη του πολυμορφικού αλληλίου CYP2C8*2 έχει μόνο το 15% της ενζυμικής δραστηριότητας του φυσικού τύπου (wild type) σε *in vitro* πειράματα (Dai et al., 2001). Η πρωτεΐνη του CYP2C8*3 έχει τη μισή δραστηριότητα ενώ το αλληλίο CYP2C8*5 παράγει μόνο το 1/3 της πρωτεΐνης σε σύγκριση με τον φυσικό τύπο και επομένως, είναι πρακτικά ανενεργό (Soyama et al.,

2001). Ο πολυμορφισμός του *CYP2C8* συνδέεται σε μεγάλο βαθμό με την καταγωγή. Έτσι, το αλληλίο *CYP2C8*2* είναι σπάνιο στους Καυκάσιους (κάτω από 1%) (Bahadur et al., 2002) αλλά κυμαίνεται γύρω στο 18% στους Αφρικανούς (Dai et al., 2001). Αντιθέτως, το αλληλίο *CYP2C8*3* συναντάται στο 13% των Καυκάσιων (Solus et al., 2004), αλλά μόνο στο 2% των Αφρικανών και καθόλου σε πληθυσμούς Ιαπώνων (Dai et al., 2001).

CYP2C9

Το *CYP2C9* είναι η ισομορφή, που εκφράζεται περισσότερο (60% των συνολικών *CYP2C*) και συναντάται στο ήπαρ αλλά και σε πληθώρα άλλων ιστών (βλ. **Πίνακα 8**). Η σημασία του είναι τεράστια αφού αποτελεί το 20% των συνολικών ηπατικών *CYPs* (Xie et al., 2002) και μεταβολίζει περίπου το 15% των πιο συχνά συνταγογραφούμενων φαρμάκων και ειδικά αυτών με χαμηλό Θεραπευτικό Δείκτη (Miners and Birkett, 1998). Το *CYP2C9* είναι υπεύθυνο για το μεταβολισμό του αντιεπιληπτικού φαινυτοΐνη, του S-εναντιομερούς της βαρφαρίνης, διαφόρων μη-στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων (ΜΣΑΦ) αλλά και των εκλεκτικών αναστολέων της COX-2 (π.χ. σελεκοξίβη), των ανταγωνιστών των υποδοχέων αγγειοτενσίνης AT1 (π.χ. λοσαρτάνη), των αντικαρκινικών κυκλοφωσφαμίδη και ταμοξιφένη κ.α. (Martignoni et al., 2006). Αναστολή της έκφρασης του *CYP2C9* μεταβάλλει το μεταβολισμό φαρμάκων και μπορεί να οδηγήσει σε τοξικότητα. Τυπικό παράδειγμα είναι η αναστολή του *CYP2C9*, η οποία μπορεί να μειώσει δραματικά τον μεταβολισμό και την απέκκριση της βαρφαρίνης, και να οδηγήσει σε θανατηφόρα εσωτερική αιμορραγία (βλ. **Πίνακα 9** για αναστολείς του *CYP2C*). Επιπροσθέτως, το *CYP2C9* παίζει σημαίνοντα ρόλο και στο μεταβολισμό ενδογενών παραγόντων, όπως τα στεροειδή, τα ρετινοειδή, το αραχιδονικό οξύ κ.α.. Η ρύθμιση της επαγωγής του βρίσκεται υπό τον έλεγχο των υποδοχέων CAR, PXR, GR (Zhou et al., 2009b) αλλά και του HNF4 (Ibeanu et al., 1998).

Το χαρακτηριστικό του κυτοχρώματος *CYP2C9* είναι πως εμφανίζει πολύ μεγάλης έκτασης πολυμορφισμό, η κλινική σημασία του οποίου είναι τεράστια. Μέχρι στιγμής έχουν ανακαλυφθεί 33 διαφορετικά αλληλία του *CYP2C9*, το καθένα εκ των οποίων έχει διαφορετικό προφίλ μεταβολισμού (Zhou et al., 2009a). Το αλληλίο *CYP2C9*2* είναι το πιο συχνά εμφανιζόμενο και έχει ως αποτέλεσμα την μειωμένη

ενζυμική δραστηριότητα με την βαρφαρίνη ως υπόστρωμα (Rettie et al., 1994). Αυξημένη τοξικότητα από τη βαρφαρίνη, είναι δυνατόν να προκληθεί και λόγω του αλληλίου *CYP2C9*3* (Steward et al., 1997). Η πρωτεΐνη του *CYP2C9*3* έχει μειωμένη δραστηριότητα με διάφορα ΜΣΑΦ ως υποστρώματα (κίνδυνος γαστρορραγίας και ανεπιθύμητων ενεργειών στους νεφρούς) (Wei et al., 2007), ενώ η πρωτεΐνη του *CYP2C9*6* έχει μηδενική ενζυμική δραστηριότητα (Allabi et al., 2005). Η φυλή παίζει τεράστιο ρόλο στον πολυμορφισμό του *CYP2C9*. Για το αλληλίο *CYP2C9*2*, οι Καυκάσιοι περιγράφεται ως ετεροζυγώτες σε ποσοστό 22%, ενώ το 1% είναι ομοζυγώτες (Sullivan-Klose et al., 1996). Η συχνότητα εμφάνισης του αλληλίου *CYP2C9*3* είναι λίγο πιο χαμηλή με 0.4% συχνότητα για ομοζυγώτες και 15% για τους ετεροζυγώτες (Kamali and Pirmohamed, 2006). Μια Ελληνική μελέτη περιγράφει ότι η συχνότητα του αλληλίου *CYP2C9*2* σε ομοζυγωτία είναι 4% και σε ετεροζυγωτία 22% στον Ελληνικό πληθυσμό, ενώ αντίστοιχα για το αλληλίο *CYP2C9*3* δεν βρέθηκαν ομοζυγώτες και οι ετεροζυγώτες ήταν 13% (Arvanitidis et al., 2007). Αυτά τα ποσοστά γενικά συμφωνούν με αυτά που ανευρίσκονται συνήθως στους Καυκάσιους.

CYP2C18

Η ισομορφή *CYP2C18* εκφράζεται κυρίως στο δέρμα, αλλά και σε μικρό ποσοστό στο ήπαρ (Zaphiropoulos, 1999). Η χαμηλή έκφρασή του στο ήπαρ σημαίνει ότι η σημασία του στον γενικό μεταβολισμό φαρμάκων είναι πιθανόν μικρή. Το *CYP2C18* είναι επίσης, πολυμορφικό και ο πολυμορφισμός του φαίνεται να συνδέεται με εκείνον του *CYP2C19* (βλ. στη συνέχεια) (Kubota et al., 1998).

CYP2C19

Η ισομορφή *CYP2C19* εκφράζεται κυρίως στο ήπαρ και σε μικρότερο βαθμό στο δωδεκαδάκτυλο και είναι εξίσου σημαντική, αφού μεταβολίζει περίπου το 10% των πιο συχνά συνταγογραφούμενων φαρμάκων. Μερικά παραδείγματα αυτών είναι οι ανταγωνιστές της αντλίας πρωτονίων (π.χ. ομεπραζόλη), τα αντικαταθλιπτικά τύπου SSRI (π.χ. φλουοξετίνη) αλλά και τα τρικυκλικά (π.χ. αμιτριπτυλίνη), τα βαρβιτουρικά (π.χ. φαινοβαρβιτάλη) και οι βενζοδιαζεπίνες (π.χ. διαζεπάμη), η φαινοτοΐνη κ.α. (Zhou et al., 2009a). Κάποιες φαρμακευτικές ουσίες είναι δυνατόν να δράσουν ως επαγωγείς

του *CYP2C19* και επομένως, να οδηγήσουν σε αυξημένο μεταβολισμό των φαρμάκων που μεταβολίζονται από την συγκεκριμένη ισομορφή. Οι πυρηνικοί υποδοχείς CAR και PXR φαίνεται να εμπλέκονται στην επαγωγή του *CYP2C19*, όπως και σε αυτήν του κυτοχρώματος *CYP3A4* και το πιο χαρακτηριστικό παράδειγμα επαγωγέα είναι η ριφαμπικίνη. Επίσης, αρκετά φάρμακα μπορεί να αναστείλλουν τη δράση της ισομορφής αυτής και χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι οι ανταγωνιστές της αντλίας πρωτονίων, τα SSRI αντικαταθλιπτικά, η ισονιαζίδη, η σιμετιδίνη κ.α. (Desta et al., 2002).

Το *CYP2C19* παρουσιάζει εκτεταμένο πολυμορφισμό και είναι χαρακτηριστικό ότι έχει τουλάχιστον 24 αλληλία (Zhou et al., 2009a). Τα αλληλία *CYP2C19*2* και *CYP2C19*3* (De Morais et al., 1994), καθώς και τα *CYP2C19*4*, *CYP2C19*6* και *CYP2C19*7* (Ibeanu et al., 1998) κωδικοποιούν πρωτεΐνες που δεν διαθέτουν ενζυμική δραστηριότητα και επομένως, τα άτομα, τα οποία τα φέρουν έχουν τον Poor Metabolizer (PM) φαινότυπο. Επίσης, οι πρωτεΐνες των αλληλίων *CYP2C19*5* και *CYP2C19*8* παρουσιάζουν μειωμένη δραστηριότητα, με αποτέλεσμα τον μειωμένο μεταβολισμό φαρμάκων. Αντιθέτως, η πρωτεΐνη του αλληλίου *CYP2C19*17* έχει αυξημένη δραστηριότητα και επομένως, οι φορείς του είναι Ultrarapid Metabolizers (UM). Υψηλή συχνότητα εμφάνισης αυτού του αλληλίου έχει επιβεβαιωθεί σε Σουηδούς, καθώς και σε Αιθίοπες, ενώ η συχνότητά του στους Κινέζους είναι πολύ χαμηλή (4%). Τα αλληλία *CYP2C19*4*, *-*5*, *-*6*, *-*7* και *-*8* είναι αρκετά σπάνια, οπότε δεν υπάρχουν σοβαρές συνέπειες σε κλινικό επίπεδο. Από την άλλη, τα *CYP2C19*2* και *CYP2C19*3* είναι τα πιο συχνά εμφανιζόμενα και είναι χαρακτηριστικό ότι στους Κινέζους το ποσοστό του *CYP2C19*2* ανέρχεται ακόμη και στο 1/3 του πληθυσμού, ενώ στους Καυκάσιους στο 15% και στους Αφρο-αμερικανούς στο 17%. Επομένως, το συνολικό ποσοστό των Poor Metabolizers φαίνεται να είναι πολύ υψηλότερο στους Ασιάτες (12-23%) σε σχέση με τους Καυκάσιους (1-6%) ή τους Αφρο-αμερικανούς (1-7.5%) (Desta et al., 2002).

Ισομορφή	% της υποοικογένειας CYP2C	Έκφραση
CYP2C8	35	ήπαρ νεφροί επινεφρίδια εγκέφαλος μήτρα ωοθήκες μαστός δωδεκαδάκτυλο
CYP2C9	60	ήπαρ νεφροί επινεφρίδια όρχεις προστάτης ωοθήκες δωδεκαδάκτυλο
CYP2C18	4	δέρμα
CYP2C19	1	ήπαρ δωδεκαδάκτυλο

Πίνακας 8: Διαφορές στην έκφραση των ισομορφών της υποοικογένειας CYP2C στον άνθρωπο (Martignoni et al., 2006).

Αμιοδαρόνη	αντιαρρυθμικό
Αρτεμισινίνη	αντιπαρασιτικό
Βαλσαρτάνη	αναστολέας υποδοχέα της αγγειοτενσίνης AT ₁
Βαρφαρίνη	αντιπηκτικό
Γεμφιμπροζίλη	φιμπράτη
Δελαβιρδίνη	μη νουκλεοσιδικός αναστολέας ανάστροφης τρανσκριπτάσης του HIV
Εσομεπραζόλη	αναστολέας αντλίας πρωτονίων (PPI)
Θειαπενταζόλη	αντιπαρασιτικό
Ιρβεσαρτάνη	αναστολέας υποδοχέα της αγγειοτενσίνης AT ₁
Καντεσαρτάνη	αναστολέας υποδοχέα της αγγειοτενσίνης AT ₁
Κλοτριμαζόλη	αντιμυκητιασικό
Λανσοπραζόλη	αναστολέας αντλίας πρωτονίων (PPI)
Λοβαστατίνη	αναστολέας αναγωγής του HMG-CoA
Λοσαρτάνη	αναστολέας υποδοχέα της αγγειοτενσίνης AT ₁
Μικοναζόλη	αντιμυκητιασικό
Νικλοσαμίδη	αντιπαρασιτικό
Ομεπραζόλη	αναστολέας αντλίας πρωτονίων (PPI)
Παντοπραζόλη	αναστολέας αντλίας πρωτονίων (PPI)
Πραβαστατίνη	αναστολέας αναγωγής του HMG-CoA
Πριμακίνη	αντιπαρασιτικό
Ραμπεπραζόλη	αναστολέας αντλίας πρωτονίων (PPI)
Σιμβαστατίνη	αναστολέας αναγωγής του HMG-CoA
Σουλφομεθοξαζόλη	αντιβακτηριακό
Σιμετιδίνη	ανταγωνιστής υποδοχέα ισταμίνης H ₂
Τζίνγκο μπιλόμπα	φυτικό σκεύασμα
Τζίνσενγκ	φυτικό σκεύασμα
Υπερφορίνη	αντικαταθλιπτικό (φυτικής προέλευσης)
Φλουβαστατίνη	αναστολέας αναγωγής του HMG-CoA
Φλουκοναζόλη	αντιμυκητιασικό

Πίνακας 9: Αναστολείς των ισομορφών της υποοικογένειας CYP2C στον άνθρωπο (Zhou et al., 2009b).

Ισομορφές στον επίμυ

Η υποοικογένεια CYP2C είναι αυτή που εκφράζεται περισσότερο από όλες τις άλλες στο ήπαρ του επίμυ. Φαίνεται μάλιστα ότι η υποοικογένεια CYP2C στον επίμυ ουσιαστικά παίζει το ρόλο της υποοικογένειας CYP3A στον άνθρωπο, εφόσον μεταβολίζει τις διϋδροπυριδίνες, διάφορα στεροειδή καθώς και την αφλατοξίνη B1 (Nedelcheva and Gut, 1994). Μέχρι στιγμής έχουν αναγνωριστεί 7 ισομορφές του CYP2C στον επίμυ: CYP2C6, -2C7, -2C11, -2C12, -2C13, -2C22 και -2C23 (Martignoni et al., 2006). Το χαρακτηριστικό των ισομορφών της υποοικογένειας CYP2C του επίμυ είναι ότι η έκφραση τους συνδέεται στενά με το φύλο και ότι η αυξητική ορμόνη (GH) παίζει καθοριστικό ρόλο (Waxman and O'Connor, 2006). Οι ισομορφές CYP2C7 και CYP2C12 εκφράζονται, ως επί το πλείστον, στους θηλυκούς επίμυες, ενώ τα CYP2C11 και CYP2C13 σχεδόν αποκλειστικά στους αρσενικούς. Το CYP2C11 είναι το πιο σημαντικό ηπατικό κυτόχρωμα CYP στον επίμυ (50% του συνόλου των CYPs στο ήπαρ) ενώ εκφράζεται επίσης στους νεφρούς και στο έντερο (Martignoni et al., 2006).

2.2.4. Υποοικογένεια CYP2D

Γενικά

Στον άνθρωπο εκφράζεται μόνο ένα κυτόχρωμα της υποοικογένειας CYP2D, το CYP2D6. Έχει επιβεβαιωθεί η ύπαρξη άλλων δύο γονιδίων, *CYP2D7p* και *CYP2D8p*, αλλά αυτά είναι ψευδογονίδια και επομένως, δεν παρουσιάζουν ενδιαφέρον (Nelson et al., 2004). Το κυτόχρωμα αυτό είναι εξαιρετικά σημαντικό αφού εμπλέκεται στο μεταβολισμό του 30% περίπου των πιο συχνά συνταγογραφούμενων φαρμάκων, παρόλο το γεγονός ότι αποτελεί μόνο το 4% (κατά προσέγγιση) των συνολικών CYPs (Zuber et al., 2002). Το CYP2D6 εκτός από το ήπαρ, εκφράζεται στους πνεύμονες, τους νεφρούς, το λεπτό έντερο, τον πλακούντα, τον εγκέφαλο και τους μαστούς (Niznik et al., 1990).

Το CYP2D6 μεταβολίζει πληθώρα σημαντικών φαρμάκων (>150), συμπεριλαμβανομένων των περισσότερων αντιψυχωσικών, αντικαταθλιπτικών, ορισμένων οπιοειδών, αντιρετροϊκών αλλά και φαρμάκων που χρησιμοποιούνται σε παθήσεις του καρδιαγγειακού, όπως τα αντιαρρυθμικά, οι β-αδρενεργικοί αποκλειστές και οι αποκλειστές διαύλων Ca^{+2} κ.α. (Rendic, 2002). Επίσης, το CYP2D6 μεταβολίζει

ορισμένες ενδογενείς ουσίες. Έτσι, μεταβολίζει την 5-μεθοξυτροπταμίνη προς τον νευροδιαβιβαστή 5-υδροξυτροπταμίνη (5-HT ή σεροτονίνη), τις p-τυραμίνη και m-τυραμίνη σε ντοπαμίνη, διάφορα οιστρογόνα και προγεστερόνες, αλλά και την ανανταμίδη που είναι το ενδογενές υπόστρωμα για τους κανναβινοειδείς υποδοχείς. Τέλος, το CYP2D6 εμπλέκεται στο μεταβολισμό ορισμένων νευροτοξικών (π.χ. ΜΡΤΡ, β-καρβολίνες, οι οποίες χρησιμοποιούνται για την πειραματική πρόκληση νόσου του Πάρκινσον) αλλά και πιθανώς καρκινογόνων ουσιών, όπως επί παραδείγματι το ζιζανιοκτόνο diuron (Wang et al., 2009). Μια πλήρης λίστα των πιο σημαντικών ξενοβιοτικών υποστρωμάτων του CYP2D6 παρουσιάζεται στον **Πίνακα 10**.

Αζελαστίνη	αντιϊσταμινικό (ανταγωνιστής H ₁ -υποδοχέων)
7-αιθοξυ-κουμαρίνη	αντιπηκτικό
Αλοθάνιο	γενικό αναισθητικό
Αλοπεριδόλη	αντιψυχωσικό
Αμινοπυρίνη	ΜΣΑΦ
Αμιοδαρόνη	αντιαρρυθμικό
Αμιτριπτυλίνη	τρικυκλικό αντικαταθλιπτικό
Αμπρεναβίρη	αναστολέας πρωτεάσης του HIV
Αμφεταμίνη	κεντρικός δρών συμπαθομιμητικό
Βενλαφαξίνη	SSNRI αντικαταθλιπτικό
Βισοπρολόλη	β-αδρενεργικός ανταγωνιστής
Βουπιβακαΐνη	τοπικό αναισθητικό
Βουπρανολόλη	β-αδρενεργικός ανταγωνιστής
Γαλανταμίνη	ανταγωνιστής ακετυλοχολινεστεράσης
Δελαβιρδίνη	μη νουκλεοσιδικός αναστολέας της ανάστροφης μεταγραφάσης του HIV (NNRTI)
Δεξτρομεθορφάνη	οπιοειδές
Δεσιπραμίνη	τρικυκλικό αντικαταθλιπτικό
Δερβρισοκίνη	αδρενεργικός νευρικός αποκλειστής
Διλτιαζέμη	αναστολέας διαύλων ιόντων Ca ⁺²
Διπραφενόνη	αντιαρρυθμικό
Διϋδροκωδεΐνη	οπιοειδές
Δονεπεξίλη	ανταγωνιστής ακετυλοχολινεστεράσης
Δολασετρόνη	ανταγωνιστής του υποδοχέα σεροτονίνης 5-HT ₃
Δοξεπίνη	τρικυκλικό αντικαταθλιπτικό
DPPE	αντικαρκινικό
Ζολπιδέμη	αγχολυτικό / υπνωτικό
Ζοτεπίνη	αντιψυχωσικό
Ζουκλοπενθιξόλη	αντιψυχωσικό

Θεοφυλλίνη	ξανθίνη (βρογχοδιασταλτικό)
Ιμιπραμίνη	τρικυκλικό αντικαταθλιπτικό
Ινδιναβίρη	αναστολέας πρωτεάσης του HIV
Ινδοραμίνη	α ₁ -αδρενεργικός ανταγωνιστής
Καπτοπρίλη	β-αδρενεργικός ανταγωνιστής
Καρβεδιλόλη	β-αδρενεργικός ανταγωνιστής
Καρτεολόλη	β-αδρενεργικός ανταγωνιστής
Κιναριζίνη	αντιισταμινικό (ανταγωνιστής H ₁ -υποδοχέων)
Κλοζαπίνη	αντιψυχωσικό
Κλομιπραμίνη	τρικυκλικό αντικαταθλιπτικό
Κουετιαπίνη	αντιψυχωσικό
Κωδεΐνη	οπιοειδές
Λιδοκαΐνη	τοπικό αναισθητικό
Λισουρίδη	ανταγωνιστής του D ₂ -ντοπαμινεργικού υποδοχέα
Λοραταδίνη	αντιισταμινικό (ανταγωνιστής H ₁ -υποδοχέων)
Μεθαδόνη	οπιοειδές
Μεθαμφεταμίνη	κεντρικώς δρών συμπαθομιμητικό
Μεξιλετίνη	αντιαρρυθμικό
Μετοπρολόλη	β-αδρενεργικός ανταγωνιστής
Μιανσερίνη	τετρακυκλικό αντικαταθλιπτικό
Μιρταζαπίνη	α ₂ -αδρενεργικός ανταγωνιστής
Μπουφουραλόλη	β-αδρενεργικός ανταγωνιστής
Νεβιραπίνη	μη νουκλεοσιδικός αναστολέας της ανάστροφης μεταγραφάσης του HIV (NNRTI)
Νελφίναβίρη	αναστολέας πρωτεάσης του HIV
Νικαρδιπίνη	αναστολέας διαύλων ιόντων Ca ⁺²
Νιφεδιπίνη	αναστολέας διαύλων ιόντων Ca ⁺²
NMDA (ectacy)	παραισθησιογόνο
Νορτριπυλίνη	τρικυκλικό αντικαταθλιπτικό
17α-οιστραδιόλη	οιστρογόνο
Ολανζαπίνη	αντιψυχωσικό
Ομεπραζόλη	ανταγωνιστής αντλίας πρωτονίων (PPI)
Ονδασετρόνη	ανταγωνιστής του υποδοχέα σεροτονίνης 5-HT ₃
Οξυκοδόνη	οπιοειδές
Παρακεταμόλη	αναλγητικό
Παροξετίνη	SSRI αντικαταθλιπτικό
Περφεναζίνη	αντιψυχωσικό
Πρεγνενολόνη	προγεστερόνη
Προκαναμίδη	αντιαρρυθμικό
Προμεθαζίνη	αντιισταμινικό (ανταγωνιστής H ₁ -υποδοχέων)
Προπαφενόνη	αντιαρρυθμικό
Προποφόλη	γενικό αναισθητικό
Προπρανολόλη	β-αδρενεργικός ανταγωνιστής

Ρανιτιδίνη	αντιϊσταμινικό (ανταγωνιστής H ₂ -υποδοχέων)
Ρισπεριδόνη	αντιψυχωσικό
Ριτοναβίρη	αναστολέας πρωτεάσης του HIV
Ροπιβακαΐνη	τοπικό αναισθητικό
Σακιναβίρη	αναστολέας πρωτεάσης του HIV
Σελεγιλίνη	SSRI αντικαταθλιπτικό
Σερτραλίνη	SSRI αντικαταθλιπτικό
Σιλδεναφίλη	αναστολέας της PDE5
Σιλισταζόλη	αντιαμοπεταλιακό
Σιταλοπράμη	SSRI αντικαταθλιπτικό
Ταμοξιφένη	αντικαρκινικό
Ταμσουλοσίνη	α ₁ -αδρενεργικός ανταγωνιστής
Ταυρομυστίνη	αντικαρκινικό
Τερφεναδίνη	αντιϊσταμινικό (ανταγωνιστής H ₁ -υποδοχέων)
Τιμολόλη	β-αδρενεργικός ανταγωνιστής
Τολτεροδίνη	αντιμουςκαρινικό
Τραμαδόλη	οπιοειδές
Τριμιπραμίνη	τρικυκλικό αντικαταθλιπτικό
Τροπισετρόνη	ανταγωνιστής του υποδοχέα σεροτονίνης 5-HT ₃
Τριφλουπεριδόλη	αντιψυχωσικό
Υδροκοδόνη	οπιοειδές
Φαινακετίνη	αναλγητικό
Φελοδιπίνη	αναστολέας διαύλων ιόντων Ca ⁺²
Φλεκανίδη	αντιαρρυθμικό
Φλουβαστατίνη	αναστολέας αναγωγής του HMG-CoA (στατίνη)
Φλουβοξαμίνη	SSRI αντικαταθλιπτικό
Φλουναριζίνη	αντιϊσταμινικό (ανταγωνιστής H ₁ -υποδοχέων)
Φλουξετίνη	SSRI αντικαταθλιπτικό
Φλουφенаζίνη	αντιψυχωσικό
Χλωροπρομαζίνη	αντιψυχωσικό
Χλωροφενιραμίνη	αντιϊσταμινικό (ανταγωνιστής H ₁ -υποδοχέων)

Πίνακας 10: Υποστρώματα του CYP2D6 (Rendic, 2002), (Zanger et al., 2004).

Γενικά, το κυτόχρωμα CYP2D6 δεν φαίνεται να επηρεάζεται σε επίπεδο επαγωγής (Martignoni et al., 2006), αν και ο HNF4α είναι πιθανόν να παίζει κάποιο ρόλο στην ρύθμιση της έκφρασής του (Corchero et al., 2001), (Lee et al., 2008). Παρ' όλα αυτά, η αναστολή του κυτοχρώματος 2D6 είναι πολύ σημαντική σε κλινικό επίπεδο, αφού οδηγεί σε μειωμένο μεταβολισμό και έτσι σε υψηλότερα του

φυσιολογικού επίπεδα των φαρμάκων που μεταβολίζονται από το κυτόχρωμα αυτό. Είναι χαρακτηριστικό ότι πολλά φάρμακα που αποτελούν υποστρώματα του CYP2D6 δρουν επίσης και ως αναστολείς, κάνοντας ακόμη πιο πολύπλοκη την μελέτη του μεταβολισμού φαρμάκων. Στον **Πίνακα 11** παρουσιάζεται λίστα με τους πιο σημαντικούς αναστολείς του κυτοχρώματος CYP2D6.

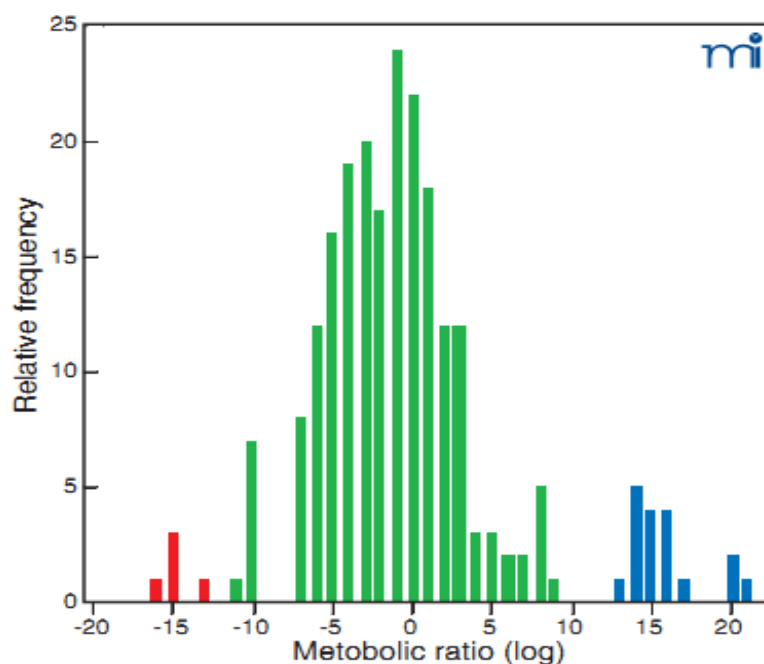
Αζελαστίνη	αντιϊσταμινικό (H ₁ -ισταμινικός ανταγωνιστής)
Αλοπεριδόλη	αντιψυχωσικό
Αμιοδαρόνη	αναστολέας διαύλων ιόντων Ca ⁺²
Αμιτριπτυλίνη	τρικυκλικό αντικαταθλιπτικό
Αμλοδιπίνη	αναστολέας διαύλων ιόντων Ca ⁺²
Αμφεταμίνη	κεντρικός δρων συμπαθομιμητικό
Βενλαφαξίνη	SSNRI αντικαταθλιπτικό
Βεραπαμίλη	αναστολέας διαύλων ιόντων Ca ⁺²
Βινμπλαστίνη	αντικαρκινικό
Γιοχιμπίνη	α ₂ -αδρενεργικός ανταγωνιστής
Δεξμεντετομιδίνη	α ₂ -αδρενεργικός ανταγωνιστής
Δεξτρομεθορφάνη	οπιοειδές
Διλτιαζέμη	αναστολέας διαύλων ιόντων Ca ⁺²
Δοξεπίνη	τρικυκλικό αντικαταθλιπτικό
Δοξορουμπικίνη	αντικαρκινικό
Εφαβιρένζη	μη νουκλεοσιδικός αναστολέας της ανάστροφης μεταγραφάσης του HIV (NNRTI)
Ζαφιλουκάστη	ανταγωνιστής υποδοχέα λευκοτριενίων D4
Ιμιπραμίνη	τρικυκλικό αντικαταθλιπτικό
Ινδιναβίρη	αναστολέας πρωτεάσης του HIV
Ισονιαζίδη	αντιφυματικό
Κανναβιδιόλη	μεταβολίτης κανναβινοειδών
Κινιδίνη	αντιαρρυθμικό
Κλεμαστίνη	αντιϊσταμινικό (H ₁ -ισταμινικός ανταγωνιστής)
Κλοζαπίνη	αντιψυχωσικό
Κοκαΐνη	τοπικό αναισθητικό / συμπαθομιμητικό
Κωδεΐνη	οπιοειδές
Λανσοπραζόλη	ανταγωνιστής αντλίας πρωτονίων (PPI)
Λιδοκαΐνη	τοπικό αναισθητικό
Λοβαστατίνη	αναστολέας αναγωγής του HMG-CoA (στατίνη)
Λομουστίνη	αντικαρκινικό
Μεθαδόνη	οπιοειδές
Μεθαμφεταμίνη	κεντρικός δρων συμπαθομιμητικό
Μεπιραμίνη	αντιϊσταμινικό (H ₁ -ισταμινικός ανταγωνιστής)
Μετοπρολόλη	β-αδρενεργικός ανταγωνιστής

Μιρταζαπίνη	α ₂ -αδρενεργικός ανταγωνιστής
Μιφεπριστόνη	αντι-προγεστερόνη
Μοκλοβεμίδη	αντικαταθλιπτικό (αναστολέας MAO)
Μπουφουραλόλη	β-αδρενεργικός ανταγωνιστής
Νελφίναβιρη	αναστολέας πρωτεάσης του HIV
Νικαρδιπίνη	αναστολέας διαύλων ιόντων Ca ⁺²
Νιφεδιπίνη	αναστολέας διαύλων ιόντων Ca ⁺²
Νοτριπτιλύνη	τρικυκλικό αντικαταθλιπτικό
Ομεπραζόλη	ανταγωνιστής αντλίας πρωτονίων (PPI)
Ονδανσετρόνη	ανταγωνιστής του σεροτονεργικού υποδοχέα 5-HT ₃
Οξυβουτινίνη	αντιμουσκουρινικό
Παροξετίνη	SSRI αντικαταθλιπτικό
Περγαμοντίνη	(χυμός γκρέϊπ-φρούτ)
Περγολίδη	αγωνιστής του D ₂ -ντοπαμινεργικού υποδοχέα (αντι-παρκινσονικό)
Πιμοζίδη	αγγολυτικό / υπνωτικό
Πινδολόλη	β-αδρενεργικός ανταγωνιστής
Πραβαστατίνη	αναστολέας αναγωγής του HMG-CoA (στατίνη)
Προμεθαζίνη	αντιϊσταμινικό (H ₁ -ισταμινικός ανταγωνιστής)
Προπαφενόνη	αντιαρρυθμικό
Προποφόλη	γενικό αναισθητικό
Προπρανολόλη	β-αδρενεργικός ανταγωνιστής
Ροπινιρόλη	αγωνιστής του D ₂ -ντοπαμινεργικού υποδοχέα (αντι-παρκινσονικό)
Ρισπεριδόνη	αντιψυχωσικό
Ριτοναβίρη	αναστολέας πρωτεάσης του HIV
Σακιναβίρη	αναστολέας πρωτεάσης του HIV
Σιμβαστατίνη	αναστολέας αναγωγής του HMG-CoA (στατίνη)
Σιμετιδίνη	αντιϊσταμινικό (H ₂ -ισταμινικός ανταγωνιστής)
Σιταλοπράμη	SSRI αντικαταθλιπτικό
Τερβιναφίνη	αντικυκητιασικό
Τερφεναδίνη	αντιϊσταμινικό (H ₁ -ισταμινικός ανταγωνιστής)
Τικλοπιδίνη	αντιαιμοπεταλιακό
Τροπισετρόνη	ανταγωνιστής του σεροτονεργικού υποδοχέα 5-HT ₃
Υδροκινιδίνη	αντιαρρυθμικό
Υδροξυζίνη	αντιϊσταμινικό (H ₁ -ισταμινικός ανταγωνιστής)
Φελοδιπίνη	αναστολέας διαύλων ιόντων Ca ⁺²
Φλεκαινίδη	αντιαρρυθμικό
Φλουβαστατίνη	αναστολέας αναγωγής του HMG-CoA (στατίνη)
Φλουοξετίνη	SSRI αντικαταθλιπτικό
Χλωροπρομαζίνη	αντιψυχωσικό

Πίνακας 11: Αναστολείς του CYP2D6 (Rendic, 2002), (Zanger et al., 2004).

Πολυμορφισμός

Το συγκεκριμένο κυτόχρωμα εμφανίζει τεράστια ποικιλότητα στην δραστικότητα του και αυτό οφείλεται στον εκτεταμένο πολυμορφισμό του. Σύμφωνα με τον Ingelman-Sundberg, ο πολυμορφισμός του κυτοχρώματος CYP2D6 είναι ο πιο σημαντικός όλων των κυτοχρωμάτων, που λαμβάνουν μέρος στις Φάσεις I και II του μεταβολισμού φαρμάκων (Ingelman-Sundberg, 2005). Στο **Σχήμα 5** παρουσιάζονται διαφορετικοί ρυθμοί δραστικότητας του CYP2D6 αναλογα με το γενετικό προφίλ των ατόμων ενός πληθυσμού Καυκασίων.



Σχήμα 5: Σχετικοί ρυθμοί δραστικότητας του CYP2D6 (μεταβολισμός της δεβρισκοίνης σε 4-υδροξυ-δεβρισκοίνη) σε πληθυσμούς Καυκάσιων. Οι μπάρες με κόκκινο χρώμα αντιπροσωπεύουν τους ultrarapid metabolizers, αυτές με πράσινο χρώμα τους extensive metabolizers και εκείνες με μπλέ χρώμα τους poor metabolizers. Επεξηγήσεις: Metabolic ratio (log), μεταβολικό ποσοστό σε λογαριθμική κλίμακα; Relative frequency, σχετική συχνότητα (Woolhouse et al., 1979).

Το κυτόχρωμα CYP2D6 ήταν το πρώτο στο οποίο παρατηρήθηκε πολυμορφισμός και είναι το περισσότερο μελετημένο από όλα τα κυτοχρώματα CYPs. Στον άνθρωπο έχουν ανιχνευτεί πάνω από 80 διαφορετικά αλλήλια και περισσότεροι από 130 πολυμορφισμοί μονού νουκλεοτιδίου (single nucleotide polymorphisms ή

"SNPs") (http://www.imm.ki.se/CYPalleles/cyp2d6_and.htm), αλλά δεν έχουν όλοι κλινική σημασία. Η ενζυμική δραστηριότητα του κυτοχρώματος CYP2D6 επηρεάζεται ευθέως από τους πολυμορφισμούς στο γονίδιο *CYP2D6* και αυτό έχει ως αποτέλεσμα τέσσερις διαφορετικούς φαινότυπους:

α) ομοζυγωτία ελαττωματικού αλληλίου που οδηγεί σε απουσία ενζυμικής δραστηριότητας (φαινότυπος "Poor Metabolizer" ή "PM")

β) ετεροζυγωτία ελαττωματικού αλληλίου που προκαλεί μειωμένη ενζυμική δραστηριότητα (φαινότυπος "Intermediate Metabolizer" ή "IM")

γ) φυσιολογική λειτουργικότητα του γονιδίου και έκφραση του ενζύμου (φαινότυπος "Extensive Metabolizer" ή "EM")

δ) έκφραση πολλαπλών αντιγράφων ενός αλληλίου που οδηγεί σε αυξημένη ενζυμική δραστηριότητα (φαινότυπος "Ultrarapid Metabolizer" ή "UM") (Arvanitidis et al., 2007).

Τα πιο σημαντικά αλλήλια είναι: το *CYP2D6*1* (φυσιολογικό - άγριος τύπος), τα *CYP2D6*10* και **41* (ενδιάμεσης έκφρασης και δραστηριότητας), τα *CYP2D6*3*, **4*, **5* και **6* (απουσία έκφρασης άρα και δραστηριότητας) και το *CYP2D6*2* (αυξημένης έκφρασης και δραστηριότητας). Μελέτες σε Καυκάσιους έχουν δείξει ότι το 70% περίπου εκφράζουν το φυσιολογικό αλλήλιο *CYP2D6*1* και επομένως θεωρούνται EM. Οι Καυκάσιοι εμφανίζουν ποσοστά 20-30% στο αλλήλιο **4* και 2-3% στο αλλήλιο **5* (Neafsey et al., 2009). και γενικά το ποσοστό PM κυμαίνεται γύρω στο 5-10% (Wrighton and Stevens, 1992). Μια μελέτη σε ελληνικό πληθυσμό έδειξε ότι το 3% είναι ομόζυγοι για το *CYP2D6*4* (επομένως PM) ενώ το 27% του πληθυσμού παρουσιάζει ετεροζυγωτία για το αλλήλιο *CYP2D6*4* και το 3.5% ετεροζυγωτία για το *CYP2D6*3* και έτσι έχουν φαινότυπο IM (Arvanitidis et al., 2007). Οι Ασιάτες εμφανίζουν πολύ υψηλά ποσοστά του φαινοτύπου IM, εξαιτίας της παρουσίας του αλληλίου *CYP2D6*10* (εκφράζεται σε πάνω από το 50% των Ασιατών), γεγονός το οποίο έχει ως αποτέλεσμα την έκφραση ασταθούς ενζύμου (Ingelman-Sundberg, 2005).

Τυπικό παράδειγμα επηρεασμού της θεραπευτικής δράσης ενός φαρμάκου λόγω πολυμορφισμού του *CYP2D6* είναι η περίπτωση της ταμοξιφένης. Το CYP2D6 μεταβολίζει την ταμοξιφένη σε ενεργούς μεταβολίτες (όπως π.χ. η 4-υδροξυ-ταμοξιφένη και η ενδοξιφένη) και φαίνεται πως αυτοί οι μεταβολίτες είναι υπεύθυνοι για την αντιοιστρογονική δράση της ουσίας. Άτομα τα οποία είναι PM εμφανίζονται να έχουν πολύ

χαμηλά επίπεδα των ενεργών μεταβολιτών και σε κλινικό επίπεδο παρουσιάζουν πιο συχνές υποτροπές καρκίνου του μαστού σε σύγκριση με άτομα με φυσιολογική λειτουργικότητα του CYP2D6 (Zanger et al., 2008).

Πέρα από τα αλληλία που οδηγούν στην έκφραση πρωτεϊνών του CYP2D6 με μειωμένη δραστηριότητα, υπάρχει και η περίπτωση του αλληλίου *CYP2D6*2* που οδηγεί στην παραγωγή έως και 13 αντιτύπων και επομένως, ο φαινότυπος σε αυτή την περίπτωση χαρακτηρίζεται ως UM (Johansson et al., 1993). Αυτός ο φαινότυπος παρουσιάζει υπερβολικά αυξημένη μεταβολική δραστηριότητα και επομένως, ασθενείς αυτού του φαινοτύπου απαιτούν πολύ υψηλότερες δόσεις φαρμάκων για σωστή και επαρκή φαρμακοθεραπεία. Υπολογίζεται ότι περίπου το 5.45% των φυλών της Δυτικής Ευρώπης είναι UM. Πιο συγκεκριμένα, οι μεσογειακοί λαοί έχουν αρκετά υψηλά ποσοστά του φαινοτύπου αυτού (Ισπανοί/Ιταλοί/Τούρκοι 10%), ενώ οι Βορειοευρωπαίοι έχουν αρκετά χαμηλότερα ποσοστά (1-2%) (Ingelman-Sundberg, 2005). Οι Έλληνες φαίνεται να εμφανίζουν τον φαινότυπο UM σε ποσοστό περίπου 6% (Arvanitidis et al., 2007) άρα να είναι πιο κοντά στον μεσογειακό μέσο όρο. Από την άλλη, στους Αιθίοπες το ποσοστό αυτό φτάνει το 29% του συνολικού πληθυσμού, κάτι που επιβεβαιώνει την θεωρία για μειούμενο ποσοστό UM φαινοτύπου όσο απομακρυνόμαστε από την Μεσόγειο και πλησιάζουμε προς την Βόρεια Ευρώπη (Ingelman-Sundberg, 2005). Κρίνεται επομένως πολύ σημαντικό σε πληθυσμούς που υπάρχει μεγάλη πιθανότητα φαινοτύπων UM, IM ή PM να γίνονται τεστ ώστε να αποκαλύπτεται το φαινοτυπικό προφίλ τους και να αποφεύγονται προβλήματα με την φαρμακοθεραπεία. Ορισμένες τέτοιες μέθοδοι είναι το τεστ με κοκτέιλ φαρμάκων (cocktail test) (Christensen et al., 2003) αλλά και τα τεστ που χρησιμοποιούν τη μέθοδο PCR (Dorado et al., 2005).

Τέλος, πολλές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί με σκοπό να καταδείξουν πιθανή σύνδεση ορισμένων μορφών καρκίνου με το CYP2D6. Θεωρητικά, η ενεργοποίηση προκαρκινογόνων από πολυμορφικά αλληλία του *CYP2D6* θα μπορούσε να αυξήσει τον κίνδυνο για ανάπτυξη όγκων. Μελέτες πάνω στον καρκίνο του πνεύμονα, της ουροδόχου κύστης, του προστάτη, του μαστού και του λάρυγγα έχουν δώσει μέχρι στιγμής συγκεκριμένα αποτελέσματα και επομένως, δεν είναι δυνατή ακόμη η σύνδεση των καρκίνου αυτών με τον πολυμορφισμό του *CYP2D6* (Neafsey et al., 2009).

Ισομορφές στον επίμυ

Στον επίμυ, έχουν ταυτοποιηθεί 6 ισομορφές της υποοικογένειας CYP2D, τα CYP2D1, -2D2, -2D3, -2D4, -2D5 και -2D18 (Nelson et al., 1996) και είναι χαρακτηριστικό ότι όλες οι ισομορφές αυτές - καθώς και η ισομορφή CYP2D6 του ανθρώπου - έχουν κοινή αλληλουχία αμινοξέων κατά 70% (Venhorst et al., 2003). Οι ισομορφές CYP2D1 και -2D5 εκφράζονται σε διάφορους ιστούς, ενώ η έκφραση των CYP2D2 και -2D3 έχει ανιχνευτεί στο ήπαρ, τους νεφρούς και το λεπτό έντερο. Τέλος, οι ισομορφές CYP2D4 και CYP2D18 ανιχνεύονται στο ήπαρ, τους νεφρούς, το λεπτό έντερο, τον εγκέφαλο, τα επινεφρίδια, τις ωοθήκες και τους όρχεις (Hellmold et al., 1995). Το γεγονός ότι οι διάφορες ισομορφές εντοπίζονται σε συγκεκριμένους ιστούς, πιθανόν να σημαίνει ότι η κάθε ισομορφή είναι εξειδικευμένη και έχει καθορισμένες ιδιότητες, οι οποίες σχετίζονται με την λειτουργία του κάθε ιστού (Hiroi et al., 2002).

Όσον αφορά την ρύθμιση των ισομορφών της υποοικογένειας CYP2D στον επίμυ, δεν φαίνεται να παίζει κάποιο ρόλο το φύλο κατά την ανάπτυξη του επίμυ (Chow et al., 1999). Παρ' όλα αυτά, ο Zendulka και οι συνεργάτες του απέδειξαν ότι η δραστηριότητα του CYP2D2 επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από το φύλο και μάλιστα οι αρσενικοί επίμυες έχουν υψηλότερους ρυθμούς μεταβολισμού (Zendulka et al., 2009).

2.2.5. Υποοικογένεια CYP2A

Στον άνθρωπο έχει επιβεβαιωθεί η έκφραση τριών ισομορφών της υποοικογένειας CYP2A: του CYP2A6, CYP2A7 και CYP2A13. Η ισομορφή CYP2A7 εκφράζεται στο ήπαρ, ενώ η ισομορφή CYP2A13 εκφράζεται κυρίως στους πνεύμονες (Hukkanen, 2000) και το ρινικό επιθήλιο. Και οι δύο όμως θεωρούνται ανενεργές ισομορφές, επομένως δεν έχουν κλινικό ενδιαφέρον (Pelkonen et al., 2000).

Ισομορφές στον άνθρωπο

CYP2A6

Η ισομορφή αυτή είναι η σημαντικότερη της υποοικογένειας CYP2A. Αποτελεί περίπου το 1-10% των συνολικών κυτοχρωμάτων του ήπατος (Pelkonen et al., 2000), αλλά εκφράζεται επίσης σε χαμηλά ποσοστά και στο επιθήλιο της μύτης, τον οισοφάγο, το δέρμα, το ρινικό επιθήλιο, την τραχεία και τους πνεύμονες (Arpiainen, 2007). Το

CYP2A6 δε φαίνεται να εμπλέκεται στον μεταβολισμό ενδογενών παραγόντων, αλλά μεταβολίζει την κουμαρίνη σε 7-OH-κουμαρίνη (Miles et al., 1990) και τη νικοτίνη σε κοτίνη (Nakajima et al., 1996). Επίσης παίρνει μέρος στο μεταβολισμό πληθώρας παραγόντων, οι οποίοι θεωρούνται προκαρκινικοί. Τέτοιοι είναι η αφλατοξίνη B1, οι νιτροζαμίνες (NNK, NNAL, NDEA και NNN), το 1,3-βουταδιένιο, το 2,6-διχλωροβενζονιτρίλιο κ.α. (Oscarson, 2001). Ειδικότερα, η νιτροζαμίνη NNK φαίνεται να σχετίζεται με τον καρκίνο του πνεύμονα (Gonzalez and Gelboin, 1994).

Η ισομορφή CYP2A6 επάγεται από μια περιορισμένη λίστα φαρμάκων όπως είναι η φαινοβαρβιτάλη, η ριφαμπικίνη, η σιμετιδίνη, καθώς και από την αιθανόλη, το κάπνισμα (Pelkonen et al., 2000) και την κοκαΐνη (Konstandi and Lang, 1996). Η επαγωγή του CYP2A6 ελέγχεται σε επίπεδο μεταγραφής. Ο μεταγραφικός παράγοντας PXR παίζει σημαντικό ρόλο στην επαγωγή του, ενώ ο CAR δεν φαίνεται να είναι τόσο σημαντικός (Itoh et al., 2006). Περαιτέρω *in vitro* μελέτες με ανθρώπινα ηπατοκύτταρα HepG2 κατέδειξαν ότι μειωμένη έκφραση του HNF4α οδηγεί σε μειωμένα επίπεδα mRNA του *CYP2D6* (Jover et al., 1998). Η σχέση του HNF4α με την υποοικογένεια CYP2A επιβεβαιώθηκε και από μελέτες με το γονίδιο *Cyp2a5* σε ποντικούς, ενισχύοντας την θεωρία ότι ο μεταγραφικός παράγοντας HNF4α παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην έκφραση του κυτοχρώματος CYP2A6 (Agraiainen, 2007).

Έχουν αναγνωριστεί 16 διαφορετικά αλλήλια του *CYP2A6*. Το αλλήλιο *CYP2A6*2* οδηγεί στην έκφραση ενζύμου χωρίς λειτουργική αίμη και επομένως είναι ανενεργό, ενώ το *CYP2A6*3* φέρει κάποια τμήματα της αλληλουχίας του *CYP2A7*. Φαίνεται ότι και το *CYP2A6* εμφανίζει μεγάλες φυλετικές διαφορές όσον αφορά την έκφραση του. Έτσι, το αλλήλιο *CYP2A6*4* εκφράζεται σε αμελητέα ποσοστά σε Ευρωπαίους αλλά ανιχνεύεται σε περίπου 10-20% των Ασιατών. Τα αλλήλια *CYP2A6*7* και **9* έχουν επίσης υψηλά ποσοστά στην Άπω Ανατολή με 16% των Γιαπωνέζων να είναι φορείς του **7* και 15% των Κινέζων να φέρουν το **9* αλλήλιο, ενώ τα αντίστοιχα ποσοστά των Ευρωπαίων είναι πολύ χαμηλά (Nagata and Yamazoe, 2002). Ο Oscarson et al. αναφέρει υψηλά ποσοστά ελαττωματικών γονιδίων *CYP2A6* στους Ιάπωνες, κάτι που τους κατηγοριοποιεί στον φαινότυπο PM (Oscarson et al., 1999).

Ο πολυμορφισμός του *CYP2A* φαίνεται να συνδέεται με τον κίνδυνο για εμφάνιση διαφόρων μορφών καρκίνου και ειδικά του καρκίνου του πνεύμονα. Ποντίκια με πολυμορφικά *Cyp2a5* γονίδια εμφάνισαν ελάττωση των επιπέδων της

ενεργοποιημένης νιτροζαμίνης NNK (Hollander et al., 2011). Σε μια Ιαπωνική μελέτη, άτομα που είναι ομοζυγώτες για το *CYP2A6**4 αλληλίο παρουσιάζουν μηδενικά ποσοστά squamous cell carcinoma ή small cell carcinoma στους πνεύμονες αλλά και φαίνεται να ελαττώνουν πιο εύκολα το κάπνισμα από άτομα που φέρουν άλλα αλληλία. Επομένως, τα άτομα που έχουν μειωμένη μεταβολική δραστηριότητα του *CYP2A6*, είναι πιθανόν να έχουν μειωμένη ενεργοποίηση καρκινογόνων αλλά και ελαττωμένο μεταβολισμό νικοτίνης, κάτι που οδηγεί σε λιγότερους όγκους και ευκολότερη διακοπή του καπνίσματος (Ariyoshi et al., 2002).

Έκφραση στον επίμυ

Στους επίμυες, εκφράζονται τρεις ισομορφές, η *CYP2A1* και η *CYP2A2* (οι οποίες εκφράζονται κυρίως στο ήπαρ) αλλά και η ισομορφή *CYP2A3* (εκφράζεται στους πνεύμονες, το ρινικό επιθήλιο και το έντερο). Η *CYP2A1* ισομορφή μεταβολίζει την τεστοστερόνη στη θέση 7α- ενώ οι ισομορφές *CYP2A2/3* μεταβολίζουν την τεστοστερόνη σε 15α-OH-τεστοστερόνη. Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι η υποοικογένεια *CYP2A* του ανθρώπου δεν μπορεί να μεταβολίσει την τεστοστερόνη στις θέσεις 7α- και 15α- (Ariainen, 2007). Τέλος, το φύλο παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην έκφραση των ισομορφών *CYP2A1* και *CYP2A2* (Ariainen, 2007). Το *CYP2A1* είναι κυρίαρχο στους θηλυκούς επίμυες και εκφράζεται υπό την επιρροή συνεχούς έκκρισης GH, ενώ το *CYP2A2* εκφράζεται σχεδόν αποκλειστικά σε αρσενικούς επίμυες και η ρύθμισή του υπόκειται στον έλεγχο της διακεκομμένης (παλμικής) παραγωγής GH (Pampori and Shapiro, 1999), (Agrawal and Shapiro, 2000).

3. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΟΧΡΩΜΑΤΩΝ CYPs

3.1. Γενικά

Η έκφραση των κυτοχρωμάτων CYPs, ρυθμίζεται άμεσα ή έμμεσα από διάφορους παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων φυσιολογικών (π.χ. ορμόνες), γενετικών (π.χ. πολυμορφισμός), παθολογικών (π.χ. διάφορες ασθένειες του ήπατος) και περιβαλλοντικών (π.χ. ξενοβιοτικά). Η ρύθμιση των CYPs από έναν πολύ μεγάλο αριθμό παραγόντων έχει ως αποτέλεσμα το κάθε άτομο / οργανισμός να εμφανίζει διαφορετική μεταβολική δραστηριότητα και επομένως, και διαφορετική ικανότητα να μεταβολίζει ενδοβιοτικές και ξενοβιοτικές ουσίες. Αυτή η διαφορετικότητα κάθε οργανισμού καλείται "*δια-ατομική διακύμανση*" (interindividual variability ή variance) (Snawder and Lipscomb, 2000), (Lin and Lu, 2001), (Pelkonen et al., 2008). Ο σκοπός αυτού του κεφαλαίου είναι να παρουσιάσει τους σημαντικότερους παράγοντες, που επηρεάζουν την έκφραση ή την δραστηριότητα των CYPs.

Η δράση αυτών των παραγόντων οδηγεί είτε σε επαγωγή, είτε σε αναστολή της έκφρασης των CYPs. Η επαγωγή των CYPs είναι εξαιρετικά σημαντική, αφού επηρεάζει καταλυτικά την έκφραση και την δραστηριότητα τους και μάλιστα θεωρείται ένας από τους αμυντικούς μηχανισμούς του οργανισμού. Η **επαγωγή** των CYPs μπορεί να έχει τόσο θετικά, όσο και αρνητικά αποτελέσματα. Όταν γίνεται εις απάντηση της αυξημένης παρουσίας π.χ. ενός ξενοβιοτικού, η επαγωγή συμβάλλει στην ταχύτερη απενεργοποίηση και απομάκρυνση του ξενοβιοτικού από τον οργανισμό. Από την άλλη, η επαγωγή είναι δυνατόν να έχει καταστροφικά αποτελέσματα. Ειδικότερα, σε περίπτωση που ένα κυτόχρωμα μεταβολίζει ένα προκαρκινογόνο στην ενεργή μορφή της καρκινογόνου ουσίας, η κίνδυνος καρκινογένεσης αυξάνεται. Αύξηση του μεταβολισμού ενός συνταγογραφούμενου φαρμάκου σημαίνει ότι θα υπάρχουν χαμηλότερα επίπεδά του στο πλάσμα από το φυσιολογικό και επομένως, ο ασθενής δεν θα ωφεληθεί από την φαρμακοθεραπεία (Hollenberg, 2002), (Pelkonen et al., 2008). Πολλές φορές ο επαγωγέας προκαλεί την αύξηση της μετάφρασης ενός γονιδίου σε πρωτεΐνη CYP (Hollenberg, 2002). Η αύξηση αυτή σχετίζεται με τους πυρηνικούς υποδοχείς CAR, PXR κτλ, για τους οποίους θα γίνει ειδική αναφορά παρακάτω. Οι υποδοχείς αυτοί δρουν ως "αισθητήρες", αναγνωρίζουν την παρουσία ξενοβιοτικών και αυξάνουν την μεταγραφή των CYPs, ούτως ώστε να κινητοποιήσουν την γρήγορη

απενεργοποίηση και απέκκριση του ξενοβιοτικού. Αξίζει να αναφερθεί ότι η αύξηση στη μεταγραφή ενός γονιδίου από την δράση ενός επαγωγέα είναι μια αργή διαδικασία (φτάνει έναν μέγιστο ρυθμό 10-12 ώρες μετά) και μπορεί να χρειαστούν ημέρες ή ακόμα και εβδομάδες για να δράσει πλήρως (Hollenberg, 2002).

Η αναστολή των *CYPs* είναι η πιο κοινή αιτία πρόκλησης αλληλεπιδράσεων κατά την συγχορήγηση φαρμάκων και στο παρελθόν έχει οδηγήσει στην απόσυρση από την αγορά φαρμακευτικών ουσιών, με πιο σημαντικό το παράδειγμα της τερφεναδίνης (Friedman et al., 1999). Η μείωση της έκφρασης ενός *CYP* οδηγεί στην αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας της φαρμακευτικής ουσίας ή στην μειωμένη της απέκκριση. Και στις δύο αυτές περιπτώσεις οι συνέπειες για τον ασθενή μπορεί να είναι σημαντικές, αφού λόγω των αυξημένων επιπέδων του φαρμάκου στο πλάσμα, αυξάνεται και η πιθανότητα για πρόκληση τοξικών εκδηλώσεων (Pelkonen et al., 2008). Αυτό έχει ιδιαίτερη βαρύτητα, όταν πρόκειται για φάρμακα με χαμηλό Θεραπευτικό Δείκτη, όπως είναι η βαρφαρίνη, η θεοφυλλίνη, το λίθιο κτλ. Επίσης, η αναστολή των *CYPs* μπορεί να έχει ως συνέπεια την αδυναμία μετατροπής ενός προφαρμάκου στην ενεργή φαρμακευτική ουσία, όπως συμβαίνει π.χ. με διάφορα αντικαρκινικά φάρμακα (Rooseboom et al., 2004). Σε αυτή την περίπτωση, παράγεται μειωμένη ενεργός μορφή του φαρμάκου και αυξάνονται οι πιθανότητες για αποτυχία της φαρμακοθεραπείας, με δραματικές συνέπειες για έναν ασθενή με καρκίνο (Pelkonen et al., 2008). Υπάρχουν δύο κατηγορίες αναστολής, η αναστρέψιμη και η μη-αναστρέψιμη. Η *μη-αναστρέψιμη* απαιτεί τον μεταβολισμό του παράγοντα που προκαλεί την αναστολή του *CYP* και μπορεί να περιλαμβάνει τον σχηματισμό ενός συμπλόκου ή την δημιουργία ισχυρών ομοιοπολικών δεσμών μεταξύ ενός ενδιάμεσου προϊόντος και της πρωτεΐνης ή της αίμης του *CYP*. Σε αυτή την περίπτωση το αποτέλεσμα δε μπορεί να αναστραφεί παρά μόνον με την σύνθεση νέου ενζύμου (μετάφραση της πρωτεΐνης), γεγονός το οποίο απαιτεί ώρες ή και ημέρες για να ολοκληρωθεί. Από την άλλη πλευρά, η *αναστρέψιμη* αναστολή περιλαμβάνει λιγότερο ισχυρούς δεσμούς, οι οποίοι δημιουργούνται γρήγορα αλλά και μπορούν να σπάσουν εύκολα και επομένως, οι αναστολείς δρουν πολύ γρήγορα αλλά δε μπορούν να προκαλέσουν μόνιμη αναστολή στο *CYP*. Η αναστρέψιμη αναστολή διακρίνεται σε συναγωνιστική (competitive), μη-συναγωνιστική (non-competitive) και στη μεικτού τύπου αναστολή. Στη συναγωνιστική αναστολή, ο αναστολέας και το υπόστρωμα (φάρμακο) συναγωνίζονται για την ίδια ενεργή θέση του ενζύμου, επομένως, πολλές φορές ο αναστολέας είναι επίσης και υπόστρωμα ενός *CYP* (αλλά όχι

πάντα). Στη μη-συναγωνιστική αναστολή, ο αναστολέας συνδέεται σε θέση διαφορετική από την ενεργή του ενζύμου, το υπόστρωμα μπορεί να συνδεθεί στο ένζυμο, αλλά το σύμπλοκο αναστολέα-ενζύμου-υποστρώματος δεν είναι λειτουργικό (Hollenberg, 2002), (Pelkonen et al., 2008).

Η ηλικία είναι ένας φυσιολογικός παράγοντας, ο οποίος ρυθμίζει την έκφραση των CYPs. Μελέτες, τόσο σε πειραματόζωα, όσο και στον άνθρωπο, έχουν δείξει ότι η δραστηριότητα των ενζύμων που μεταβολίζουν φάρμακα είναι πολύ χαμηλή κατά τη γέννηση, αυξάνονται ταχέως μετά από αυτή και μειώνονται κατά την γήρανση. Τα επίπεδα των CYPs είναι υψηλότερα σε νεαρούς οργανισμούς και ελαττώνονται στα ηλικιωμένα άτομα (Yun et al., 2010), τόσο σε βασικό επίπεδο όσο και σε συνθήκες επαγωγής, π.χ. με φαινοβαρβιτάλη (Ioannides and Parke, 1990). Είναι γεγονός ότι ο ηπατικός μεταβολισμός σε ηλικιωμένα άτομα είναι μειωμένος σε σχέση με νεαρά άτομα. Έχει επιβεβαιωθεί ότι ο μεταβολισμός φαρμάκων, όπως η αμιτριπτυλίνη, η βεραπαμίλη, η διλτιαζέμη, η θεοφυλλίνη, η ιμιπραμίνη, η ιβουπροφένη, η λιδοκαΐνη, τα οπιοειδή, μορφίνη και πεθιδίνη και η προπρανολόλη, μειώνεται σημαντικά στους ηλικιωμένους (Le Couteur and McLean, 1998) και αυτό οφείλεται στη μειωμένη αιμάτωση (επομένως και οξυγόνωση) του ήπατος (μείωση κατά 40% της ροής στους ενήλικες), όσο και στη μείωση της μάζας του ήπατος (κατά 30%). Εξαιρέσεις σε κυτταρικό επίπεδο στο ήπαρ, όπως η ίνωση του ενδοθηλίου και η απώλεια των πόρων, που φυσιολογικά επιτρέπουν την είσοδο ξενοβιοτικών στο εσωτερικό των ηπατοκυττάρων, θεωρούνται καθοριστικής σημασίας για την μειωμένη ηπατική κάθαρση κατά τη γήρανση (McLean and Le Couteur, 2004). Τα άτομα μεγάλης ηλικίας είναι οι κύριοι χρήστες των συνταγογραφούμενων φαρμάκων λόγω των χρόνιων παθήσεων και της αυξημένης ευαισθησίας σε ασθένειες όσο αυξάνεται η ηλικία. Εξάλλου, το φαινόμενο της πολυφαρμακείας είναι συχνό στους ηλικιωμένους λόγω της συνύπαρξης διαφόρων νόσων, με αποτέλεσμα οι ασθενείς να κινδυνεύουν και από αλληλεπιδράσεις φαρμάκων. Επομένως, η ηλικία καθίσταται πολύ σημαντική στον μεταβολισμό των φαρμάκων. Είναι κοινή πρακτική η μείωση της δόσης των φαρμάκων, που μεταβολίζονται από ένζυμα της Φάσης I, περίπου κατά 40% σε ηλικιωμένους ασθενείς (Hilmer et al., 2005). Τέλος, η ηλικία παίζει σημαντικό ρόλο και στην εμφάνιση συγκεκριμένων φαινοτύπων. Επί παραδείγματι, ο άνθρωπος κατά την εμβρυϊκή ζωή εκφράζει την ισομορφή CYP3A7 και όχι την CYP3A4, αλλά τα επίπεδα

της πρώτης ισομορφής πέφτουν δραματικά κατά την πρώτη εβδομάδα από τη γέννηση (de Wildt et al., 1999).

Το φύλο παίζει εξίσου σημαντικό ρόλο στην έκφραση των κυτοχρωμάτων *CYPs*. Τόσο *in vivo*, όσο και *in vitro* μελέτες που έχουν λάβει χώρα την τελευταία πεντηκονταετία, έχουν αποδείξει ότι υπάρχουν μεγάλες διαφορές μεταξύ αρσενικών και θηλυκών επιμύων και μάλιστα οι αρσενικοί φαίνεται να μεταβολίζουν μια σειρά υποστρωμάτων πολύ πιο γρήγορα από τους θηλυκούς επίμυες. Οι θηλυκοί επίμυες εκφράζουν 10-30% χαμηλότερα ποσοστά συνολικών *CYPs* συγκριτικά με τους αρσενικούς (Ioannides and Parke, 1990). Σύμφωνα με ένα review των Mugford and Kedderis, οι ισομορφές CYP2A1, CYP2C7, CYP2C12 και CYP2C19 εκφράζονται κυρίως στους θηλυκούς επίμυες, ενώ οι ισομορφές CYP2A2, CYP2C11, CYP2C13, CYP2C18 και CYP3A2 εκφράζονται κυρίως στους αρσενικούς (Mugford and Kedderis, 1998). Ο κύριος παράγοντας για τις διαφορές που εμφανίζονται στην έκφραση των *CYPs* ανάμεσα στα δύο φύλα είναι η δράση του μεταγραφικού παράγοντα STAT5b, η οποία ελέγχεται πλήρως από την συνεχή (στα θηλυκά) ή παλμική (στα αρσενικά) έκκριση της αυξητικής ορμόνης (GH) (Waxman and O'Connor, 2006), (Waxman and Holloway, 2009). Η επίδραση της GH και του STAT5b θα αναπτυχθεί εκτενέστερα παρακάτω.

Ο γενετικός παράγοντας παίζει σημαντικό ρόλο στην έκφραση όλων των γονιδίων και επομένως και στην έκφραση των *CYPs*. Ο πολυμορφισμός των κυτοχρωμάτων οφείλεται στις μεταλλάξεις γονιδίων, που ελέγχουν την έκφραση συγκεκριμένων ισοενζύμων, με αποτέλεσμα την εμφάνιση αλληλόμορφων γονιδίων, τα οποία κωδικοποιούν μη-φυσιολογικά ένζυμα. Ο γενετικός πολυμορφισμός επηρεάζει τον μεταβολισμό των φαρμάκων, προκαλώντας αυξημένη ή μειωμένη ευαισθησία στις τοξικές δράσεις ενός φαρμάκου ή αυξημένη / μειωμένη αποτελεσματικότητα της φαρμακοθεραπείας (Zhou et al., 2009), ενώ παράλληλα συνδέεται και με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου (Gonzalez and Kimura, 2001). Οι ισομορφές, οι οποίες σχετίζονται περισσότερο με τον πολυμορφισμό είναι οι CYP2A6, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19 και CYP2D6 (Zhou et al., 2009a), (Johansson and Ingelman-Sundberg, 2011). Για τον πολυμορφισμό των πιο σημαντικών κυτοχρωμάτων *CYPs*, τα οποία αποτελούν το επίκεντρο της παρούσας μελέτης, έχει γίνει ξεχωριστή αναφορά στο Κεφάλαιο 2. **Η φυλή** είναι ένας πολύ σημαντικός παράγοντας της δια-ατομικής διακύμανσης και συγκεκριμένα αλληλόμορφα γονίδια τείνουν να εμφανίζονται σε

συγκεκριμένες φυλές (Ingelman-Sundberg et al., 2007), (Zhou et al., 2009a). Όπως προαναφέρθηκε, ο πολυμορφισμός ενός γονιδίου *CYP* επηρεάζει την ενζυμική δραστηριότητα του αντίστοιχου κυτοχρώματος *CYP* με αποτέλεσμα την ύπαρξη τεσσάρων φαινοτύπων. Των *poor metabolizers* (PM), οι οποίοι παρουσιάζουν σχεδόν μηδενική ενζυμική δραστηριότητα, των *intermediate metabolizers* (IM), οι οποίοι έχουν ένα ενεργό και ένα μη-ενεργό αλληλίο με αποτέλεσμα να παρουσιάζουν μειωμένη ενζυμική δραστηριότητα, των *extensive metabolizers* (EM), οι οποίοι διαθέτουν δύο ενεργά αλληλίου και παρουσιάζουν φυσιολογική ενζυμική λειτουργία και τέλος, των *ultrarapid metabolizers* (UM), οι οποίοι διαθέτουν αλληλόμορφα αντίγραφα ενός αλληλίου και έτσι παρουσιάζουν αυξημένη ενζυμική λειτουργία (Johansson and Ingelman-Sundberg, 2011). Στο μέλλον, θεωρείται σίγουρη η ευρεία χρήση γενετικών τεστ, τα οποία θα φανερώνουν τα άτομα τα οποία είναι ευαίσθητα σε παρενέργειες, αλλά και εκείνα που θα χρειάζονται μεταβολές στις δόσεις φαρμάκων για να επιτευχθεί ένα συγκεκριμένο φαρμακολογικό αποτέλεσμα (Wijnen et al., 2007), (Zhou et al., 2009a).

Διάφορες **παθολογικές καταστάσεις**, είναι δυνατόν να επηρεάσουν τον μεταβολισμό φαρμάκων μέσω των ενζύμων *CYPs*. Ορισμένες ασθένειες, όπως η κίρρωση του ήπατος, ο καρκίνος, ο σακχαρώδης διαβήτης και άλλες, είναι δυνατόν να οδηγήσουν σε δραστικές μεταβολές στην έκφραση των ηπατικών *CYPs* (Sheweita, 2000). Η κίρρωση του ήπατος επηρεάζει άμεσα την γενική λειτουργικότητα του ήπατος και επομένως και του ηπατικού μεταβολισμού φαρμάκων. Η επικρατούσα θεωρία, όσον αφορά στην εξήγηση αυτού του φαινομένου, βασίζεται στις βλάβες των επιθηλιακών κυττάρων και την συσσώρευση συνδετικού ιστού μεταξύ των ηπατοκυττάρων. Ο συνδετικός ιστός δημιουργεί αναστομώσεις και εμποδίζει την ομαλή κυκλοφορία του αίματος δια μέσου της πυλαίας φλέβας, των ηπατικών φλεβών και της ηπατικής αρτηρίας. Έτσι, η αιματική ροή προς τα ηπατοκύτταρα ελαττώνεται, με συνέπεια να μειώνεται ο μεταβολικός ρυθμός (Parkinson et al., 2004). Ο σακχαρώδης διαβήτης επίσης, προκαλεί σημαντικές μεταβολές στην έκφραση διαφόρων ηπατικών ενζύμων, συμπεριλαμβανομένων των *CYPs*. Οδηγεί στην επαγωγή της έκφρασης των *CYP1A1*, *CYP2B*, *CYP3A*, *CYP4A* και *CYP2E1*, ενώ η έκφραση του *CYP2C11* φαίνεται να μειώνεται. Παρόμοιες μεταβολές αναφέρονται και σε άτομα, τα οποία ακολουθούν δραστικές δίαιτες ή βρίσκονται σε ασιτία. Τόσο ο σακχαρώδης διαβήτης, όσο και η ασιτία, προκαλούν δραστικές μεταβολές στην έκκριση διαφόρων ορμονών (ινσουλίνη,

γλυκαγόνη, αυξητική ορμόνη κ.α.), οι οποίες ρυθμίζουν την έκφραση των *CYPs*. Η χορήγηση ινσουλίνης ή αυξητικής ορμόνης σε διαβητικούς επίμυες, επαναφέρει ταχέως την έκφραση των κυτοχρωμάτων *CYPs* σε φυσιολογικά επίπεδα (Kim and Novak, 2007). Τέλος, διάφοροι τύποι καρκίνου είναι δυνατόν να επηρεάσουν σε μεγάλο βαθμό την έκφραση και δραστηριότητα πλήθους ισομορφών κυτοχρωμάτων *CYP* και επομένως, η παρουσία όγκων πρέπει πάντα να λαμβάνεται υπόψιν στη φαρμακοθεραπεία (Rendic and Guengerich, 2010). Παράδειγμα, είναι η αναστολή του *CYP3A4* σε ασθενείς με όγκους, κάτι που φαίνεται να σχετίζεται με τη δράση διαφόρων μεσολαβητών της φλεγμονής (Kacevska et al., 2008).

Οι μολύνσεις, οι καρκινικοί όγκοι και διάφοροι παράγοντες, που οδηγούν σε φλεγμονώδεις καταστάσεις είναι δυνατόν να προκαλέσουν δραστικές εξαλλαγές σε μοριακό και κυτταρικό επίπεδο. **Οι κυτοκίνες** είναι πρωτεΐνες ή γλυκοπρωτεΐνες, οι οποίες απελευθερώνονται από πληθώρα κυττάρων και αποτελούν σημαντικότερους ρυθμιστές της ανοσολογικής απάντησης. Ο όρος "κυτοκίνη" περιλαμβάνει μια τεράστια γκάμα ανοσορρυθμιστικών παραγόντων, όπως είναι οι Ιντερλευκίνες (Interleukins; ILs), οι Ιντερφερόνες (Interferons; IFNs) και ο α-ογκονεκρωτικός παράγοντας (Tumor necrosis factor- α ; TNF- α) (Μαρσέλος και Μάλαμας, 2004). Η δράση των κυτοκινών είναι δυνατόν να επηρεάσει τον ηπατικό (και εξω-ηπατικό) μεταβολισμό και πιο συγκεκριμένα, διάφορες ισομορφές *CYPs*. Μελέτες τόσο σε ανθρώπους, όσο και σε πειραματόζωα, έχουν αποδείξει ότι η φλεγμονή συνδέεται με την καταστολή της έκφρασης των ηπατικών κυτοχρωμάτων *CYPs* (Morgan, 1997), (Aitken et al., 2006) και μάλιστα η καταστολή αυτή φαίνεται να γίνεται σε επίπεδο μεταγραφής (Morgan, 2001), (Kacevska et al., 2008). Η αναστολή των *CYPs* μπορεί να οδηγήσει σε υψηλά επίπεδα φαρμάκων και τελικά, σε τοξικές παρενέργειες, ειδικά όταν πρόκειται για φάρμακα με χαμηλό Θεραπευτικό Δείκτη (π.χ. θεοφυλλίνη, βαρφαρίνη, λίθιο κτλ) (Morgan, 1997). Όταν αναπτυχθεί μια φλεγμονώδης κατάσταση σε έναν ασθενή, ο οποίος λαμβάνει φαρμακευτική αγωγή, οι κυτοκίνες (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IFN- γ) προκαλούν καταστολή της έκφρασης των *CYPs*, με αποτέλεσμα τον μειωμένο ρυθμό μεταβολισμού του φαρμάκου που λαμβάνει ο ασθενής και επομένως, την αύξηση των επιπέδων του στο πλάσμα. Αντιθέτως, υπάρχει η περίπτωση ένας ασθενής με προϋπάρχουσα φλεγμονώδη κατάσταση να λάβει ένα φάρμακο, το οποίο να δρα ως αναστολέας των κυτοκινών. Η μειωμένη απελευθέρωση κυτοκινών προκαλεί αύξηση της έκφρασης των *CYPs* και του μεταβολισμού του φαρμάκου, με αποτέλεσμα την ελάττωση των επιπέδων του

τελευταίου στο πλάσμα (Morgan, 2009). Ένα πλήθος κυτοκινών φαίνεται να επηρεάζει την έκφραση και τα πρωτεϊνικά επίπεδα διαφόρων κυτοχρωμάτων CYP. Η αναφορά θα περιοριστεί μόνο στα κυτοχρώματα CYPs, που είναι αντικείμενο της παρούσας μελέτης. Ο TNF- α μείωσε τα πρωτεϊνικά επίπεδα των CYP3A2 και CYP2C11 σε *in vivo* πειράματα με επίμυες (Nadin et al., 1995). Οι Ιντερλευκίνες IL-6 και IL-1 β επίσης, προκάλεσαν μείωση των επιπέδων πρωτεΐνης των CYP3A2 και CYP2C11 σε καλλιέργειες ηπατοκυττάρων επίμυων (Carlson and Billings, 1996). Επιπροσθέτως, η IL-6 φαίνεται να παίζει κατασταλτικό ρόλο στο CYP3A4 στον άνθρωπο (Jover et al., 2002), ενώ η IL-1 β μειώνει την έκφραση τόσο του CYP3A4 όσο και του CYP2C9 σε καλλιέργειες ανθρώπινων ηπατοκυττάρων (Assenat et al., 2004). Μια μελέτη από τον Vuprugalla et al. έδειξε πως όταν συνδυαστούν TNF- α με IL-6, προκαλείται καταστολή των ολικών κυτοχρωμάτων P450, μείωση των επιπέδων πρωτεΐνης των CYP3A2 και CYP2C11, καθώς και μείωση της δραστηριότητας του CYP3A2 σε μικροσωμάτια προερχόμενα από ήπαρ επίμυων (Vuprugalla et al., 2003). Η IL-2 έχει κατασταλτική δράση στο mRNA και τα πρωτεϊνικά επίπεδα των CYP3A1 και CYP2C11 σε *in vitro* πειράματα με ηπατοκύτταρα από επίμυες (Tinel et al., 1999). Η IL-10 αναστέλλει το CYP3A στους ανθρώπους, χωρίς όμως να μεταβάλλει το CYP2D6 (Gorski et al., 2000). Τέλος, σημαντική καταστολή των επιπέδων mRNA του CYP3A και των επιπέδων αποπρωτεΐνης του CYP2C11 παρατηρήθηκε, όταν επώαστηκαν ηπατοκύτταρα επίμυος με IFN- γ (Tarpner et al., 1996). Γίνεται αντιληπτό ότι ανάλογα με το είδος της φλεγμονώδους κατάστασης, ενεργοποιούνται διαφορετικές κυτοκίνες και αυτές επηρεάζουν με διαφορετικό τρόπο το κάθε κυτόχρωμα CYP (Morgan, 1997). Ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο οι κυτοκίνες επηρεάζουν το κυτόχρωμα CYP παραμένει αδιευκρίνιστος. Μια πιθανή εξήγηση είναι η συμμετοχή του μονοξειδίου του αζώτου (nitric oxide - NO) στην καταστολή των κυτοχρωμάτων. Αυτό φαίνεται να γίνεται μέσω της σύνδεσης του μορίου της αίμης του CYP με το NO, κάτι που έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό ενός ασταθούς συμπλόκου NO/CYP, το οποίο οδηγεί στην απενεργοποίηση του κυτοχρώματος (Ebel et al., 1975). Μια πρόσφατη μελέτη από τον Aitken et al. έδειξε ότι κάποια κυτοχρώματα (CYP2B6) καταστέλλονται από τις κυτοκίνες και το NO έχει βασικό ρόλο σε αυτή την καταστολή, ενώ αντίθετα η αναστολή του CYP3A4 δε φαίνεται να εξαρτάται από το NO (Aitken et al., 2008). Επίσης, οι δύο Ιντερλευκίνες IL-1 β και IL-6, που όπως προαναφέρθηκε έχουν ανασταλτική δράση στα κυτοχρώματα CYP3A2 και CYP2C11 του επίμυ, δρούν μέσω διαφορετικών μηχανισμών: η κατασταλτική δράση της IL-1 β είναι εξαρτώμενη από το

NO, ενώ η δράση της IL-6 είναι παντελώς ανεξάρτητη από το NO (Carlson and Billings, 1996).

Πληθώρα **περιβαλλοντικών παραγόντων** είναι δυνατόν να επηρεάσουν την έκφραση των *CYPs*. Η χορήγηση φαρμάκων, το οξειδωτικό στρες, η έκθεση στον καπνό του τσιγάρου, διάφοροι χημικοί ρυπαντές, η έκθεση σε βαρέα μέταλλα (π.χ. κάδμιο [Cd], μόλυβδος [Pb]) (Pelkonen et al., 2008), (Rendic and Guengerich, 2010) και εντομοκτόνα (Hodgson and Rose, 2008) και διάφοροι άλλοι παράγοντες μπορούν να οδηγήσουν σε επαγωγή ή αναστολή των *CYPs*.

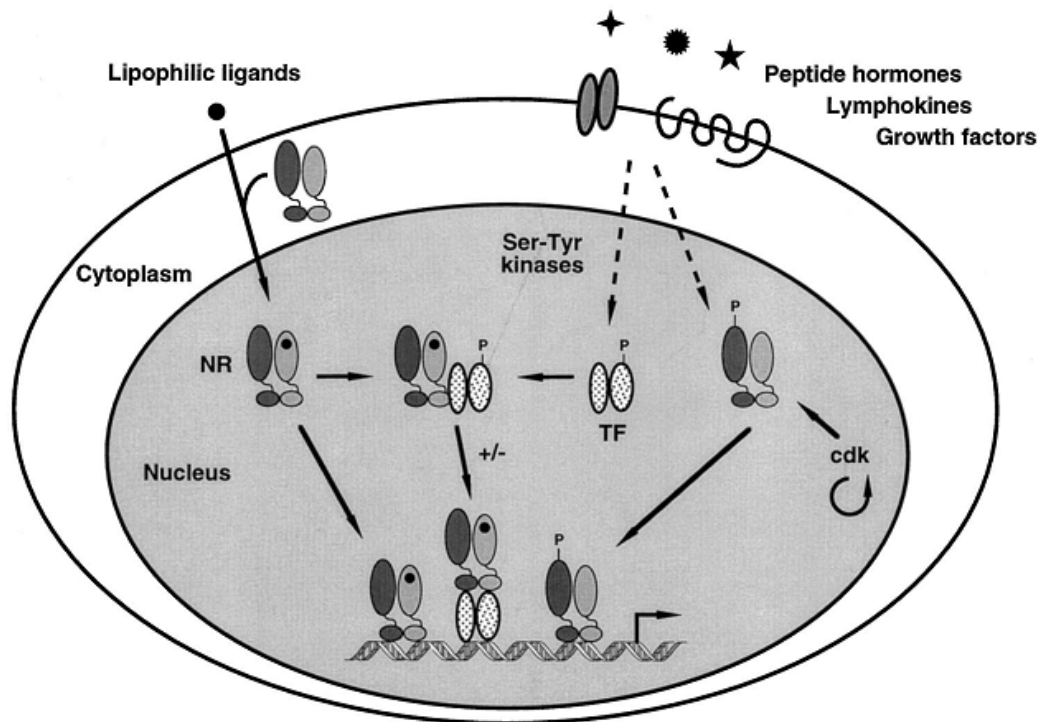
Η δράση διαφόρων ορμονών, ο ρόλος του στρες, των γλυκοκορτικοειδών και των πυρηνικών υποδοχέων, καθώς και διαφόρων μονοπατιών μεταγωγής σήματος (π.χ. MAPK, cAMP/PKA) στη ρύθμιση των κυτοχρωμάτων *CYPs* αποτέλεσαν πεδία διερεύνησης αυτής της μελέτης και θα αναπτυχθούν σε ξεχωριστά υποκεφάλαια.

3.2. Πυρηνικοί μεταγραφικοί παράγοντες, που εμπλέκονται στην ρύθμιση των *CYPs*

Όπως προαναφέρθηκε, η επαγωγή των κυτοχρωμάτων *CYPs* μπορεί να οδηγήσει σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ φαρμάκων και σε δραματικές αλλαγές του μεταβολισμού των ξενοβιοτικών. Η πιο συνηθισμένη συνέπεια της επαγωγής των *CYPs* είναι η αύξηση του μεταβολισμού ξενοβιοτικών, κάτι που οδηγεί σε μειωμένα επίπεδα των συνταγογραφούμενων φαρμάκων, με ενδεχόμενη αποτυχία της φαρμακοθεραπείας, γεγονός που μπορεί να έχει τραγικές συνέπειες σε ορισμένες παθολογικές καταστάσεις (π.χ. αντικαρκινική ή αντιρετροϊκή θεραπεία) (Pelkonen et al., 2008). Τα πιο σημαντικά ηπατικά *CYPs* ελέγχονται από πυρηνικούς μεταγραφικούς παράγοντες, οι οποίοι στην άρχη ονομάστηκαν "ορφανοί πυρηνικοί υποδοχείς". Η ρύθμιση αυτή γίνεται, είτε απ' ευθείας, είτε μέσω cross-talk μηχανισμών με άλλους πυρηνικούς μεταγραφικούς παράγοντες. Ο constitutive androstane receptor (CAR), ο pregnane X receptor (PXR), ο retinoic X receptor α (RXR α), ο hepatocyte nuclear factor 1 α (HNF1 α) και 4 α (HNF4 α), ο signal transducer and transcriptional activator (STAT5b), καθώς και διάφοροι άλλοι όπως ο glucocorticoid receptor (GR - στον οποίο θα γίνει ξεχωριστή αναφορά στο υποκεφάλαιο 3.3.2.), ο vitamin D receptor (VDR), ο retinoic acid receptor α (RAR α), ο

liver X receptor (LXR), ο farnesyl X receptor (FXR), ο aryl hydrocarbon receptor (AhR), ο peroxisome-proliferator activated receptor $\alpha/\beta/\gamma$ (PPAR $\alpha/\beta/\gamma$) και άλλοι, είναι μέλη αυτής της μεγάλης ομάδας μεταγραφικών παραγόντων (Liddle et al., 1998), (Pascussi et al., 2003), (Tirona et al., 2003), (Wiwi and Waxman, 2004), (Brtko and Dvorak, 2011). Ο ρόλος του κάθε πυρηνικού μεταγραφικού παράγοντα είναι πολύ συγκεκριμένος, εξαρτάται από την υποοικογένεια *CYP* και καθορίζει σε πολύ μεγάλο βαθμό τις διαφορές που συναντώνται στην επαγωγή κυτοχρωμάτων μεταξύ διαφορετικών ειδών (Xie et al., 2000), όπως π.χ. στην ικανότητα της ριφαμπικίνης να επάγει ανθρώπινα *CYPs*, όχι όμως και τα αντίστοιχα των τρωκτικών.

Μέσω των πυρηνικών μεταγραφικών παραγόντων, καθίσταται δυνατός ο έλεγχος της έκφρασης διαφόρων γονιδίων, ως απάντηση σε διάφορα ερεθίσματα που δέχεται το κύτταρο. Η έκφραση των γονιδίων μπορεί να γίνει με τρεις διαφορετικούς τρόπους, οι οποίοι είναι δυνατόν να δρουν ανεξάρτητα ή σε συνδυασμούς δύο ή τριών μηχανισμών. Πρώτον, μέσω της πρόσδεσης μικρών λιπόφιλων μορίων απ' ευθείας στους πυρηνικούς υποδοχείς ή σε συνδυασμούς ετεροδιμερών πυρηνικών υποδοχέων με άλλους παράγοντες. Δεύτερον, μέσω ομοιοπολικών δεσμών και φωσφορυλίωσης και τρίτον, μέσω αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης και άλλων πυρηνικών μεταγραφικών παραγόντων (βλ. **Σχήμα 6**) (Giguere, 1999).



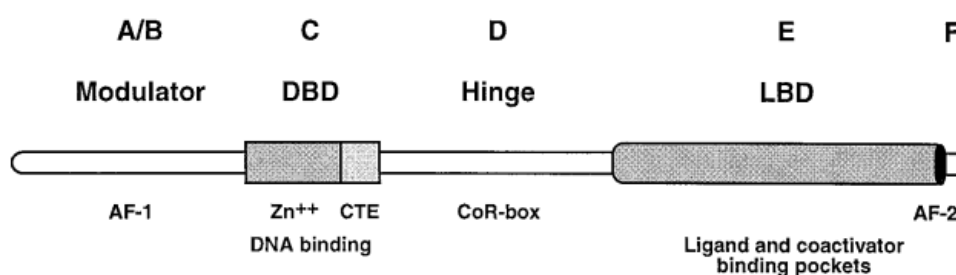
Σχήμα 6: Τα διάφορα μονοπάτια σηματοδότησης που ελέγχουν την έκφραση γονιδίων μέσω των πυρηνικών υποδοχέων. Οι πυρηνικοί υποδοχείς μπορούν να ενεργοποιηθούν μέσω τριών οδών: από μικρά λιπόφιλα μόρια, αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης και άλλων μεταγραφικών παραγόντων, ή από φωσφορυλίωση μετά από την διέγερση μεμβρανικών υποδοχέων ή από τις CDKs). Επεξηγήσεις: CDKs, κυκλινο-εξαρτώμενες κινάσες; Cytoplasm, κυτταρόπλασμα; Growth factors, αυξητικοί παράγοντες; Lipophilic ligands, λιπόφιλα υποστρώματα; Lymphokines, λεμφοκίνες; NR, Πυρηνικοί υποδοχείς; Nucleus, πυρήνας; Peptide hormones, πεπτιδικές ορμόνες; Ser/Thr kinases, Κινάσες Σερίνης/Θρεονίνης; TF, μεταγραφικοί παράγοντες (Giguere, 1999).

Μορφολογικά, οι πυρηνικοί μεταγραφικοί παράγοντες αποτελούνται από πέντε τμήματα. Σε αυτά περιλαμβάνονται:

- η περιοχή του διαμορφωτή (modulator domain), η οποία παίζει ρόλο έναρξης της μεταγραφής (AF-1)
- η περιοχή πρόσδεσης με το DNA (DNA-binding domain ή DBD), η οποία συνδέει τον υποδοχέα με τις ειδικές περιοχές προαγωγού (promoter region) του κάθε γονιδίου.

Αυτές οι περιοχές ονομάζονται hormone response elements (HRE) ή xenobiotic response elements (XRE) (Wang and LeCluyse, 2003)

- η εύκαμπτη περιοχή άρθρωσης (hinge region), που συνδέει τον DBD και τον LBD
- η περιοχή πρόσδεσης με τον συνδέτη ligand-binding domain (LBD) και
- η περιοχή του AF-2, η οποία είναι σημαντική για την δράση των συν-ενεργοποιητών (coactivators) (βλ. **Σχήμα 7**) (Giguere, 1999).



Σχήμα 7 : Τα διάφορα τμήματα από τα οποία αποτελούνται οι πυρηνικοί μεταγραφικοί παράγοντες. A/B. περιοχή του διαμορφωτή (modulator) - AF-1, C. περιοχή πρόσδεσης με το DNA (DNA-binding domain ή DBD), D. περιοχή άρθρωσης (hinge region), E. περιοχή πρόσδεσης με τον συνδέτη (ligand-binding domain ή LBD), F. περιοχή AF-2 (Giguere, 1999), (Wang and LeCluyse, 2003).

Γενικά, όταν δεν υπάρχει κάποιος συνδέτης για να ενεργοποιήσει τους πυρηνικούς υποδοχείς, αυτοί βρίσκονται στον πυρήνα του κυττάρου, συνδεδεμένοι με το DNA και ουσιαστικά δρουν ως αναστολείς της έκφρασης γονιδίων (repressors of genes) (Chen and Evans, 1995). Παρουσία του συνδέτη, ο υποδοχέας απελευθερώνεται και αλληλεπιδρά με συν-ενεργοποιητές και με τον συνδέτη. Η σύνδεση των τριών αυτών παραγόντων οδηγεί σε μεταβολές της χρωματίνης και τελικά σε αύξηση της μεταγραφής. Εξάλλου, κάποιοι πυρηνικοί μεταγραφικοί παράγοντες δρουν με πλάγιους τρόπους, όπως π.χ. αλληλεπιδρώντας με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες, οι οποίοι εν συνεχεία συνδέονται με το DNA και μεταβάλλουν την μεταγραφή του γονιδίου (π.χ. ο GR) (Giguere, 1999).

Η Διδακτορική αυτή Διατριβή εστιάστηκε στη μελέτη των CAR, PXR, RXR α και HNFs, οπότε γι' αυτούς θα γίνει ξεχωριστή αναφορά παρακάτω.

3.2.1. CAR

Ο πυρηνικός υποδοχέας constitutive androstane receptor (CAR ή NR1I-3) παίζει σημαντικότατο ρόλο στον μεταβολισμό ξενοβιοτικών και ενδογενών ουσιών. Η παρουσία του CAR έχει επιβεβαιωθεί στο ήπαρ, τους νεφρούς, αλλά και σε μικρότερο βαθμό στην καρδιά και το γαστρεντερικό σύστημα του ποντικού και στον εγκέφαλο του ανθρώπου. Σε κατάσταση "ηρεμίας", ο CAR βρίσκεται συνδεδεμένος με την CAR Retention Protein (CCRP) και την Heat Shock Protein 90 (HSP90) (Timsit and Negishi, 2007). Όταν υπάρξει διέγερση του συστήματος (π.χ. από τον επαγωγέα φαινοβαρβιτάλη), ο CAR αποχωρίζεται από τις CCRP και HSP90 και μετατοπίζεται (translocation) στον πυρήνα. Εκεί, συνδέεται ως ετεροδιμερές με τον retinoid X receptor α (RXR α) και ενεργοποιεί το Phenobarbital-Responsive Enhancer Module (PBREM), με αποτέλεσμα να επηρεάζει άμεσα την έκφραση γονιδίων διαφόρων *CYPs* (Honkakoski et al., 1998).

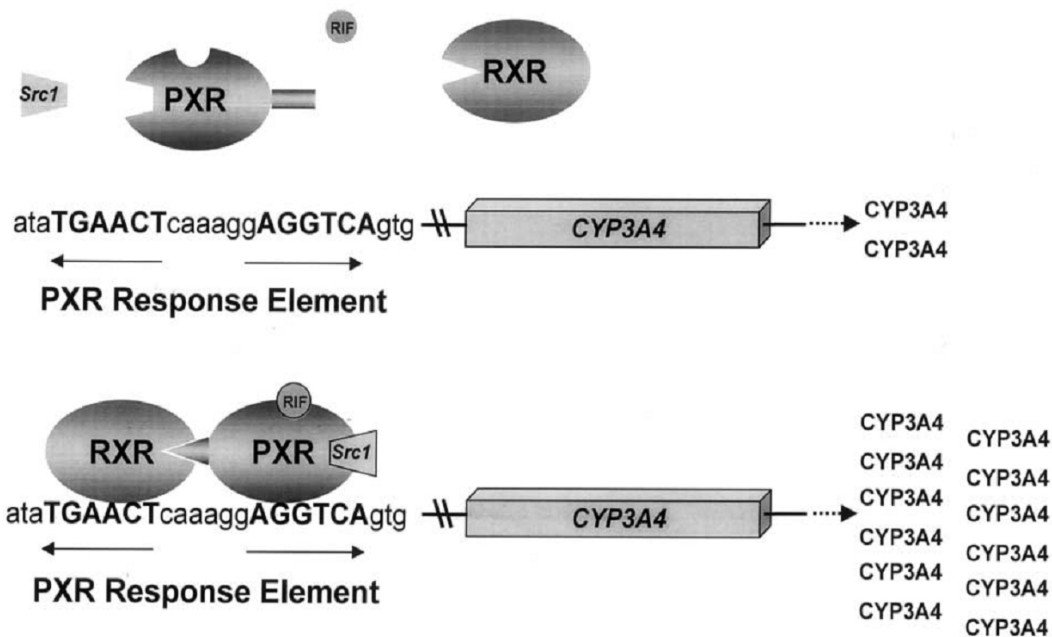
Ο CAR είναι ο μεταγραφικός παράγοντας που είναι υπεύθυνος για την επαγωγή των κυτοχρωμάτων CYP3A4, CYP2C9 και CYP2B6 (Pascussi et al., 2003) από την φαινοβαρβιτάλη και παρεμφερείς ουσίες (Zelko and Negishi, 2000), τόσο στον άνθρωπο όσο και στα τρωκτικά (Pascussi et al., 2003). Όσον αφορά το CYP3A4, η δράση του CAR είναι αρκετά πολύπλοκη, αφού φαίνεται να ενεργοποιεί επίσης και τμήματα του γονιδίου *CYP3A4*, τα οποία είναι στοιχεία απόκρισης (response elements) για τον PXR. Αυτό φανερώνει ότι ο CAR και ο PXR βρίσκονται σε στενή αλληλεπίδραση μεταξύ τους (Wei et al., 2002).

Αξίζει να σημειωθεί ότι η σημασία του CAR είναι μεγάλη και για το μεταβολισμό ενδογενών παραγόντων, όπως είναι τα λίπη και η χοληστερόλη, η γλυκόζη, η χολή κ.α. (Wada et al., 2009). Τέλος, φαίνεται να παίζει ρόλο στην ρύθμιση των επιπέδων των θυρεοειδικών ορμονών (Timsit and Negishi, 2007), οι οποίες ως γνωστόν επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό την έκφραση των *CYPs* (Ram and Waxman, 1991), (Liddle et al., 1998).

3.2.2. PXR

Ο πυρηνικός υποδοχέας pregnane X receptor (PXR ή αλλιώς NR1I-2) έχει επίσης, αποδειχθεί ότι σχετίζεται με τον μεταβολισμό, τόσο ενδογενών ουσιών, όσο και ξενοβιοτικών, ενώ επηρεάζει τον ενεργειακό μεταβολισμό. Ο PXR εκφράζεται κυρίως στο ήπαρ, το έντερο, το κόλον και τους όρχεις στον άνθρωπο, ενώ στον ποντικό βρίσκεται στο ήπαρ και σε ιστούς του γαστρεντερικού συστήματος (κυρίως στο έντερο) (Pascussi et al., 2003), (Timsit and Negishi, 2007). Η σημασία του για τον μεταβολισμό των ξενοβιοτικών είναι τεράστια - όπως και του CAR - αφού ουσιαστικά αποτελεί έναν ευαίσθητο "αισθητήρα", ο οποίος αναγνωρίζει την παρουσία τοξικών υποπροϊόντων του μεταβολισμού και δρα ώστε να αυξήσει τον ρυθμό απενεργοποίησης και αποβολής τους από τον οργανισμό (Pascussi et al., 2003). Ο PXR είναι υπεύθυνος για την επαγωγή των *CYP3A4/7*, *CYP2B6* και *CYP2C8/9* (Pascussi et al., 2003).

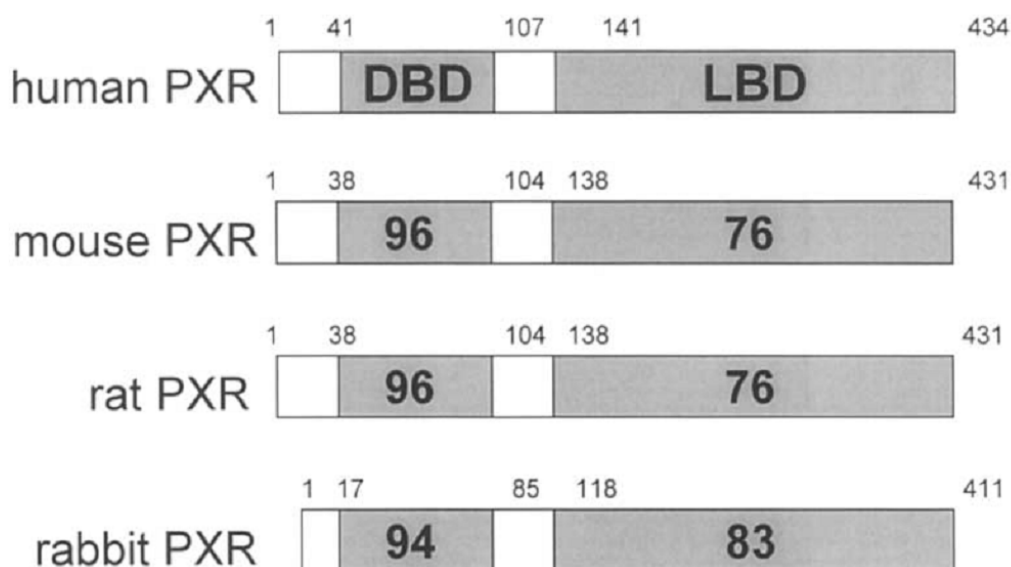
Όπως και ο CAR, ο PXR υπό φυσιολογικές συνθήκες βρίσκεται απομονωμένος στο κυτταρόπλασμα, συνδεδεμένος με τις CCRP και HSP90 (Timsit and Negishi, 2007). Σε αδρανή κατάσταση, ο PXR δρα κατασταλτικά στην έκφραση του γονιδίου *CYP3A4* (LeCluyse, 2001). Μετά την επίδραση ενός συνδέτη, όπως π.χ. του συνθετικού στεροειδούς, pregnenolone 16 α -carbonitrile (PCN) ή της ριφαμπικίνης, ο PXR μετατοπίζεται στον πυρήνα και συνδέεται με τον RXR α (δημιουργώντας ένα ετεροδιμερές) (Timsit and Negishi, 2007). Στο σύμπλεγμα αυτό προσδένεται επίσης και ο συν-ενεργοποιητής του υποδοχέα των στεροειδών (steroid receptor co-activator 1, SRC1). Το νέο σύμπλεγμα συνδέεται σε μια ειδική περιοχή απάντησης, η οποία βρίσκεται πάνω στο γονίδιο *CYP3A4* (PXR Response Element) και έτσι δίνεται η εντολή για αυξημένη μεταγραφή και έκφραση του γονιδίου και τελικά αυξημένη μετάφραση της αποπρωτεΐνης *CYP3A4* (LeCluyse, 2001), (Timsit and Negishi, 2007) (βλ. **Σχήμα 8**). Το χαρακτηριστικό του PXR είναι ότι το mRNA του εκφράζεται ακριβώς στους ίδιους ιστούς και σε παρόμοια ποσοστά με το *CYP3A4*, φανερώνοντας ότι δεν είναι μόνο σημαντικός παράγοντας για την επαγωγή του *CYP3A4* αλλά και για την βασική του έκφραση (LeCluyse, 2001).



Σχήμα 8: Σύντομη απεικόνιση του μηχανισμού ενεργοποίησης και δράσης του πυρηνικού υποδοχέα PXR. Επεξηγήσεις: PXR Response Element, στοιχείο απόκκρισης του PXR; RIF, ριφαμικίνη; Src1, συν-ενεργοποιητής του στεροειδικού υποδοχέα 1 (LeCluyse, 2001).

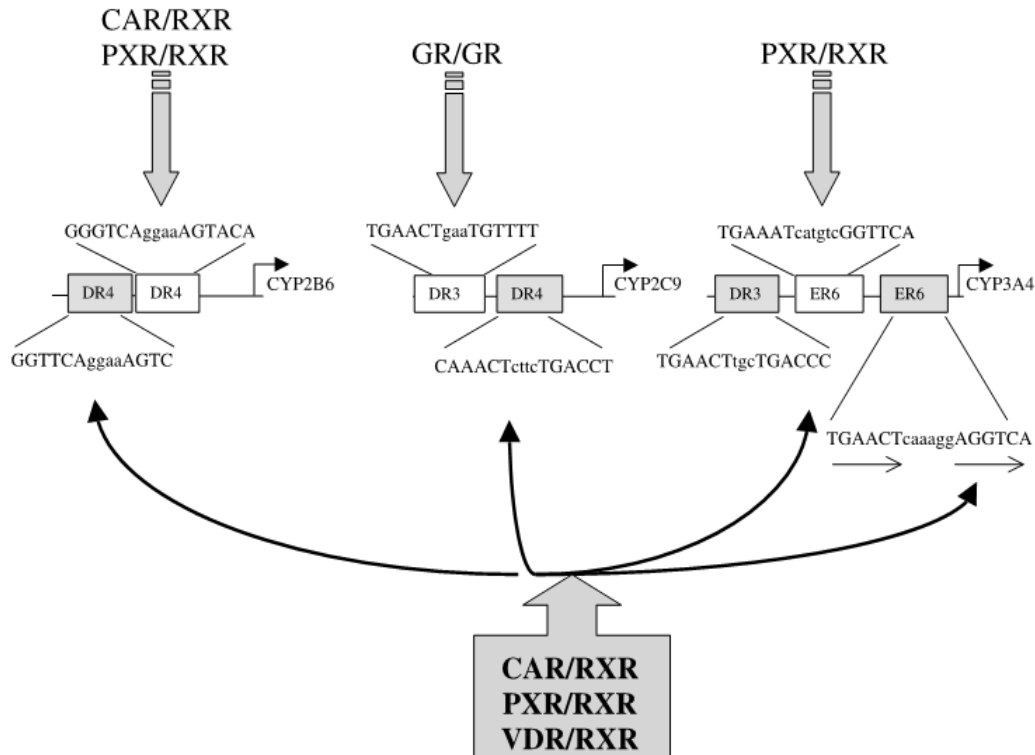
Ο PXR δεν είναι απλά ο σημαντικότερος παράγοντας ρύθμισης της έκφρασης του *CYP3A4*, αλλά επιπροσθέτως, θεωρείται ότι είναι υπεύθυνος για τα διαφορετικά επίπεδα επαγωγικής ικανότητας διαφόρων ουσιών, ανάλογα με το είδος υπό μελέτη. Η ερευνητική ομάδα του Kocarek παρατήρησε ότι η ριφαμικίνη προκαλεί μεγαλύτερη επαγωγή της υποοικογένειας *CYP3A* στο κουνέλι, σε σύγκριση με τον επίμυ. Αντιθέτως, το PCN θεωρείται ισχυρότατος επαγωγέας για το *CYP3A* του επίμυ, ενώ στο κουνέλι δεν προκαλεί καμία μεταβολή. Οι ερευνητές απέδειξαν ότι παρόμοιο προφίλ ενεργοποίησης δείχνει και ο PXR. Έτσι, η ριφαμικίνη προκαλεί ισχυρή ενεργοποίηση του PXR στο κουνέλι αλλά όχι στον επίμυ, ενώ αντίθετα, το PCN ενισχύει σε πολύ μεγαλύτερο βαθμό τον PXR του επίμυ, παρά τον PXR στο κουνέλι. Επιπροσθέτως, η ριφαμικίνη έχει ισχυρή επαγωγική δράση στον άνθρωπο, αλλά αυτή η ιδιότητα στα τρωκτικά είναι πολύ περιορισμένη (Kocarek et al., 1995). Οι διαφορές αυτές ανάλογα με το είδος μπορούν να εξηγηθούν με βάση τον PXR. Η ομοιότητα της αλληλουχίας αμινοξέων των τμημάτων DBD και LBD μεταξύ του ανθρώπου, του

ποντικού, του επίμου και του κουνελιού, είναι υψηλή αλλά όχι πανομοιότυπη. Η μεν ομοιότητα στις αλληλουχίες του DBD είναι εξαιρετικά υψηλή (94-96%), παρ' όλα αυτά, στο τμήμα LBD είναι αρκετά χαμηλότερη (76-83%). Επομένως, το τμήμα LBD πιθανόν να είναι υπεύθυνο για τις διαφορές που παρατηρούνται από είδος σε είδος (LeCluyse, 2001) (βλ. **Σχήμα 9**).



Σχήμα 9: Συγκριτική απεικόνιση της ομολογίας αμινοξέων των τμημάτων DBD (DNA-binding domain) και LBD (ligand-binding domain) του PXR, ανάμεσα στον άνθρωπο, τον ποντικό, τον επίμου και το κουνέλι (LeCluyse, 2001).

Τέλος, αξίζει να γίνει αναφορά στους cross-talk μηχανισμούς που υπάρχουν μεταξύ του CAR, του PXR, αλλά και άλλων πυρηνικών υποδοχέων (RXR, GR, VDR) και παίζουν ρόλο στη ρύθμιση των κυτοχρωμάτων. Οι ανωτέρω υποδοχείς ελέγχουν την έκφραση των γονιδίων *CYP3A4*, *CYP2C9* και *CYP2B6*, είτε άμεσα, είτε έμμεσα (μέσω συνδυασμών), με αποτέλεσμα η πολυπλοκότητα του συστήματος να αυξάνεται. Στο **Σχήμα 10** φαίνεται η συνδυασμένη δράση διαφόρων υποδοχέων στη ρύθμιση της έκφρασης των *CYPs*.



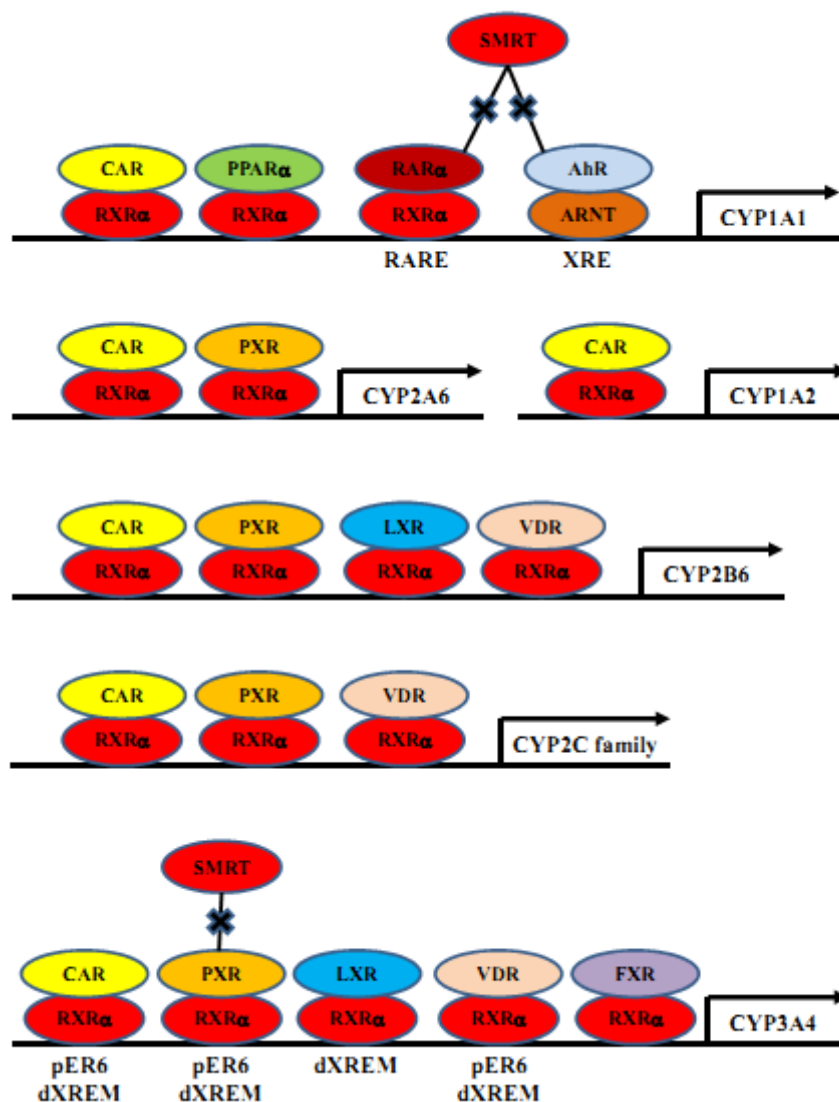
Σχήμα 10: Η συνδυασμένη δράση διαφόρων πυρηνικών υποδοχέων για την ρύθμιση της έκφρασης των κυτοχρωμάτων *CYP2B6*, *CYP2C9* και *CYP3A4* (Pascussi et al., 2003).

3.2.3. RXR

Οι retinoid X receptors (RXR) ανήκουν στα ρετινοειδή, τα οποία είναι παράγωγα της βιταμίνης A και παίζουν ρυθμιστικό ρόλο στην επαγωγή των *CYPs* από διάφορους ξενοβιοτικούς παράγοντες. Οι RXR συναντώνται σε τρεις μορφές, την α, β και γ, εκ των οποίων η πρώτη είναι η πιο σημαντική (Szanto et al., 2004). Το χαρακτηριστικό του RXR είναι ότι έχει την δυνατότητα να δημιουργεί ετεροδιμερή με μια μεγάλη ποικιλία πυρηνικών υποδοχέων. Έτσι, ο RXR μπορεί να δημιουργήσει ετεροδιμερή με τους CAR, PXR, RARα, FXR, LXR, VDR, PPAR, TR κ.α. (Szanto et al., 2004) και αυτοί οι συνδυασμοί παίρνουν μέρος στη ρύθμιση της έκφρασης πολλών σημαντικών κυτοχρωμάτων *CYPs*, όπως είναι τα *CYP1A1* και *CYP1A2*, *CYP2A6*, *CYP2B6*, τα κυτοχρώματα της υποοικογένειας *CYP2C* και το *CYP3A4* (Brtko and Dvorak, 2011) (βλ. **Σχήμα 11**).

Τα γλυκοκορτικοειδή, μέσω των υποδοχέων τους (GR), ρυθμίζουν τόσο τους CAR/PXR, όσο και τον RXR και επομένως, μπορούν να ρυθμίσουν την έκφραση του

CYP3A4 (και άλλων) σε ανθρώπινα ηπατοκύτταρα (Pascussi et al., 2000a), (Pascussi et al., 2000b). Επίσης, η ομάδα του Cai μελέτησε ποντικούς, οι οποίοι ήταν knockout για τον RXRα (*RXRα^{-/-}*) των ηπατοκυττάρων. Η μελέτη κατέδειξε ότι τα βασικά επίπεδα έκφρασης mRNA των *Cyp2a5*, *Cyp2b10* και *Cyp3a1* μεταβάλλονται δραματικά στους διαγονιδιακούς ποντικούς, σε σχέση με τον φυσικό τύπο (wild type) και επομένως, ο RXRα παίζει στρατηγικής σημασίας ρόλο στην έκφραση των γονιδίων αυτών των κυτοχρωμάτων. Το ίδιο δεν φαίνεται να συμβαίνει για τα *Cyp2e1* και *Cyp2d6*, τα επίπεδα mRNA των οποίων δεν μεταβλήθηκαν στους διαγονιδιακούς ποντικούς, επομένως ο RXRα δεν ελέγχει την έκφραση τους (Cai et al., 2002). Σε μια άλλη έρευνα με πειραματόζωα knockout για τον RXRα, αποδείχθηκε ότι και τα δύο μονοπάτια CAR/RXR και PXR/RXR καταστέλλονται, πληροφορία που φανερώνει ότι ο RXRα είναι πολύ πιο σημαντικός από τις άλλες δύο ισομορφές (RXRβ/γ) (Wan et al., 2000). Σύμφωνα με την ομάδα του Gerbal-Chaloin και η υποοικογένεια των CYP2C (*CYP2C8/9*) ρυθμίζεται από τον RXRα (Gerbal-Chaloin et al., 2001), (Gerbal-Chaloin et al., 2002). Τέλος, η δυνατότητα του RXR να δημιουργεί ετεροδιμερή και με τους θυρεοειδικούς υποδοχείς (TRα και TRβ) (Pascussi et al., 2008), αυξάνει την πολυπλοκότητα της ρύθμισης ορισμένων κυτοχρωμάτων, αφού οι θυρεοειδικές ορμόνες (TH) είναι γνωστοί ρυθμιστές της έκφρασης των *CYPs* (Ram and Waxman, 1991).



Σχήμα 11: Απεικόνιση της πολυπλοκότητας των συνδυασμών του RXRα υποδοχέα με διάφορους άλλους πυρηνικούς υποδοχείς στη μεταγραφική ρύθμιση των κυτοχρωμάτων *CYP1A1/2*, *CYP2A6*, *CYP2B6*, *CYP2C* και *CYP3A4* (Brtko and Dvorak, 2011).

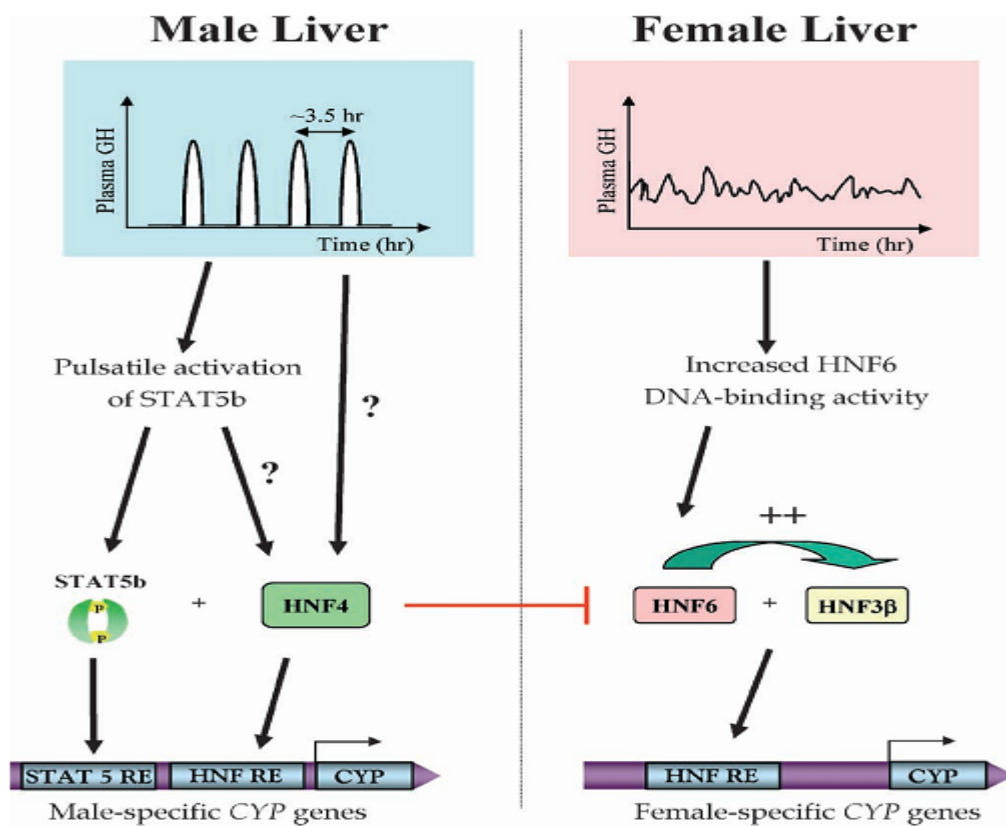
3.2.4. HNF

Οι ηπατοκυτταρικοί πυρηνικοί παράγοντες (hepatocyte nuclear factors, HNFs) είναι πυρηνικοί μεταγραφικοί παράγοντες μεγάλης σημασίας για τον έλεγχο της έκφρασης των κυτοχρωμάτων *CYPs*. Οι HNF διακρίνονται σε διάφορους τύπους, όπως είναι ο HNF1, HNF3, HNF4, HNF6 (Cheung et al., 2003). Από αυτούς, οι δύο πιο σημαντικές και περισσότερο μελετημένες ισομορφές είναι ο HNF4α και ο HNF1α.

Ο HNF4α (ή NR2A1) ανήκει στην υπεροικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων, διαθέτει όμως ορισμένες πολύ ξεχωριστές ιδιότητες. Εκφράζεται κυρίως στο ήπαρ αλλά και το έντερο, το κόλον, τους νεφρούς και τα παγκρεατικά β-κύτταρα (Gonzalez, 2008). Εν αντιθέσει με τους CAR, PXR και RXR, οι οποίοι συνήθως σχηματίζουν ετεροδιμερή, ο HNF4α συνδέεται σε ομοδιμερή στο σημείο πρόσδεσης του DNA (Hwang-Verslues and Sladek, 2010) και ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων *CYPs* αλλά και άλλων που σχετίζονται με τον μεταβολισμό της γλυκόζης, των λιπαρών οξέων, της χοληστερόλης κ.α. (Stoffel and Duncan, 1997), (Hayhurst et al., 2001).

Ο ρόλος του HNF4α είναι τεράστιος στην ρύθμιση διαφόρων γονιδίων *CYP*, όπως είναι του *CYP2C* (Chen et al., 2005), (Ferguson et al., 2005), του *CYP3A4* (Gonzalez, 2008) και του *CYP2D6* (Corchero et al., 2001), (Kamiyama et al., 2007). Ο HNF4α ρυθμίζει σε μεγάλο βαθμό την ενεργοποίηση του ρυθμιστικού παράγοντα (gene promoter) του γονιδίου *CYP3A4* από τους CAR και PXR. Αυτό γίνεται μέσω επαγωγής των δύο αυτών μεταγραφικών παραγόντων (Gonzalez, 2008). Όπως φαίνεται στο **Σχήμα 12**, ο HNF4α παίζει ρυθμιστικό ρόλο στην έκφραση γονιδίων, τόσο της Φάσης I (*CYPs*), όσο και της Φάσης II (*UGT1A6*, *UGT1A9*, *FMO1* κτλ). Η ρύθμισή του, και κατ' επέκταση, η ρύθμιση της έκφρασης αυτών των γονιδίων γίνεται από μια πληθώρα παραγόντων, όπως είναι ο CAR, ο PXR, ο RXR, ο VDR, ο FXR, ο GR, ο HNF1, ο C/EBPα, ο Oct1 κ.α. (Hwang-Verslues and Sladek, 2010).

μεταγραφικός παράγοντας αλλά και εμμέσως, επηρεάζοντας την έκφραση του HNF4α, αν και ο ακριβής μηχανισμός δεν είναι γνωστός. Ο HNF4α δε φαίνεται να λαμβάνει μέρος στον απ' ευθείας έλεγχο της έκφρασης γονιδίων *CYPs* στις θήλειες, όπου η GH παράγεται με σταθερό ρυθμό καθ'όλη την διάρκεια της ημέρας. Στη ρύθμιση των γονιδίων *CYPs* στο θηλυκό φύλο, σημαντικό ρόλο παίζουν οι παράγοντες HNF3 και HNF6. Αντιθέτως, ο HNF4α έχει ανασταλτική δράση για τους HNF3β/6 στους αρρηνες, κάτι που μπορεί να συμβάλλει στην καταστολή των "θηλυκών" *CYP* στους αρσενικούς επίμυες (Wiwi and Waxman, 2004). Στο **Σχήμα 13**, παρουσιάζονται τα μονοπάτια ελέγχου των γονιδίων *CYP* από τους HNF, στο ήπαρ των δύο φύλων.



Σχήμα 13: Η διαφορετική ρύθμιση των γονιδίων *CYPs* από τους μεταγραφικούς παράγοντες HNF, στο άρρεν και το θήλυ φύλο. Επεξηγήσεις: Male liver, ήπαρ αρσενικών επίμυων; Female liver, ήπαρ θηλυκών επίμυων; Plasma GH, επίπεδα GH στο πλάσμα; Pulsatile activation of STAT5b, παλμική ενεργοποίηση του STAT5b; Increased HNF6 DNA-binding activity, αυξημένη ικανότητα του HNF6 να συνδέεται με το DNA; Male/female-specific *CYP* genes, αρσενικά/θηλυκά *CYP* γονίδια (Wiwi and Waxman, 2004).

Ο HNF1α είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας, ο οποίος εκφράζεται στο ήπαρ, το στομάχι, το πάγκρεας, τους νεφρούς και το έντερο. Ο παράγοντας αυτός παίζει σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση της μεταγραφής διαφόρων γονιδίων, όπως της αλβουμίνης, της φαινυλαλανίνης, της α₁-αντιτρυψίνης, της liver fatty acid binding protein, του ινοδωγόνου, διαφόρων παραγόντων της πήξης του αίματος κ.α.. Ο HNF1α, επίσης, παίρνει μέρος στην ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων που ελέγχουν ένζυμα, τα οποία μεταβολίζουν ξενοβιοτικές ουσίες, όπως το *CYP1A2*, *CYP2E1* κ.α. Μελέτη με knockout ποντικούς για τον *HNF1α* έδειξε ότι η έκφραση των *Cyp1a2* και *Cyp2e1* καταστέλλεται σε σύγκριση με τον φυσικό τύπο (wild type). Αντίθετα, η έκφραση των *Cyp2a5* και *Cyp2b10* αυξήθηκε στα knockout πειραματόζωα (Cheung et al., 2003), αποδεικνύοντας την μεγάλη πολυπλοκότητα της δράσης των πυρηνικών μεταγραφικών παραγόντων.

3.3. Γλυκοκορτικοειδή και στρες

3.3.1. Γλυκοκορτικοειδή και *CYPs*

Τα γλυκοκορτικοειδή είναι στεροειδείς ορμόνες, οι οποίες παράγονται στον φλοιό των επινεφριδίων, κάτω από τον έλεγχο του ΥΥΕ άξονα. Τα ενδογενή γλυκοκορτικοειδή παίρνουν μέρος σχεδόν σε κάθε κυτταρικό, μοριακό και φυσιολογικό μονοπάτι ενός οργανισμού και διαδραματίζουν στρατηγικής σημασίας ρόλους στην ανάπτυξη, την αναπαραγωγή, το μεταβολισμό, το ανοσοποιητικό σύστημα αλλά και σε ζωτικές λειτουργίες του ΚΝΣ και του καρδιαγγειακού συστήματος (Nicolaidis et al., 2010). Η φυσιολογική έκκριση των γλυκοκορτικοειδών στον άνθρωπο ακολουθεί αυστηρά τον κίρκαδιανό ρυθμό και είναι υψηλότερη νωρίς το πρωί και χαμηλότερη περίπου τα μεσάνυχτα. Αντιθέτως, η έκκριση τους αυξάνεται σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις, όπως είναι η κατάθλιψη, οι μολύνσεις, αλλά φυσικά και κατά τη διάρκεια της έκθεσης σε ψυχολογικό στρες (Dvorak and Pavek, 2010).

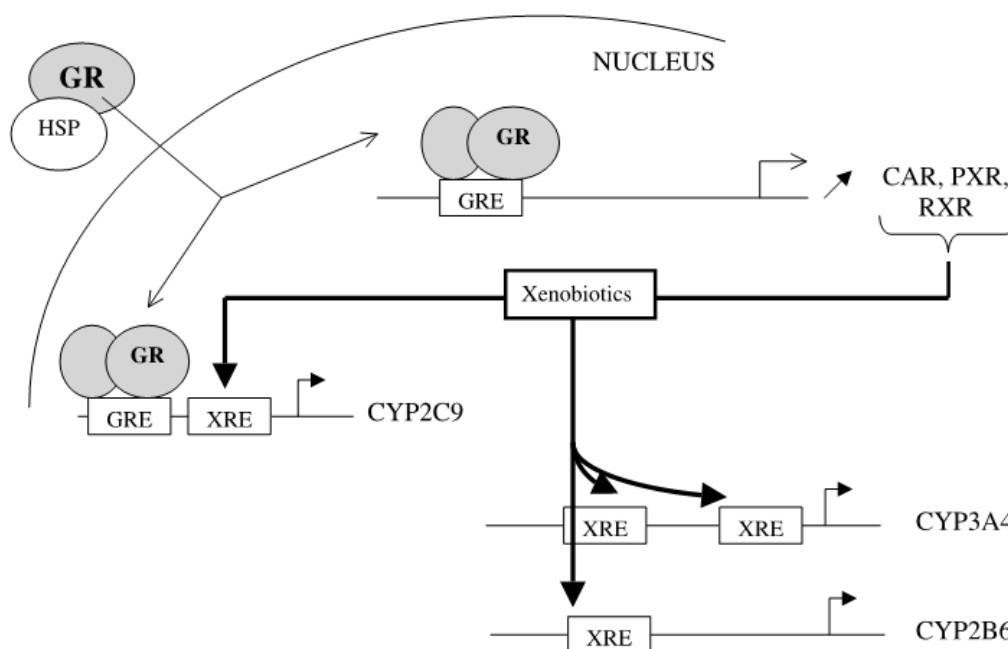
Η δράση των γλυκοκορτικοειδών διενεργείται μέσω των υποδοχέων τους (GR), οι οποίοι ανήκουν στην οικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων. Οι GR συναντώνται σε δύο ισομορφές, την GRα, η οποία είναι η μεταγραφικά ενεργός ισομορφή και η GRβ, η οποία δρα ανταγωνιστικά (Dvorak and Pavek, 2010). Οι GR εκφράζονται σχεδόν σε

όλους τους τύπους ιστών και ελέγχουν την μεταγραφή γονιδίων. Ελλείπει συνδέτη (γλυκοκορτικοειδών), οι GR βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα, συνδεδεμένοι με heat shock πρωτεΐνες. Όταν εμφανιστεί ένας συνδέτης, ο GR μετατοπίζεται στον πυρήνα, δημιουργεί ένα ομοδιμερές σύμπλοκο GR/GR και αυτό συνδέεται με στοιχεία απόκρισης του DNA (GREs) και επηρεάζει την μεταγραφή διαφόρων γονιδίων (Gross and Cidlowski, 2008) (βλ. **Σχήμα 14**).

Η σημασία των γλυκοκορτικοειδών και των GR γίνεται ακόμη μεγαλύτερη, λαμβάνοντας υπ' όψιν το γεγονός ότι αυτοί ελέγχουν την δράση των πυρηνικών υποδοχέων. Οι τελευταίοι είναι οι σημαντικότεροι ρυθμιστές της έκφρασης των *CYPs* και κάθε παράγοντας που τους ελέγχει, ουσιαστικά ελέγχει και την έκφραση των *CYPs*, φαινόμενο το οποίο καλείται "έλεγχος στον ελεγκτή" (Harper et al., 2006). Τα γλυκοκορτικοειδή και οι κατεχολαμίνες περιγράφονται στη βιβλιογραφία ως οι πιο σημαντικοί επενεργητές του συστήματος του στρες και επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό τον μεταβολισμό και ειδικότερα τα ηπατικά *CYPs* (Kyrou and Tsigos, 2009). Τα γλυκοκορτικοειδή είναι επαγωγείς των *CYP1A1/2*, *CYP2B1/1* και *CYP3A1/2* στον επίμυ (Meredith et al., 2003), αλλά και των *CYP2B6*, *CYP2C8/9* και *CYP3A4* στον άνθρωπο (Pascussi et al., 2003). Κάτω από συνθήκες στρες ή μετά από χορήγηση του συνθετικού γλυκοκορτικοειδούς δεξαμεθαζόνης (Khan et al., 2009), οι GR διεγείρονται και ενεργοποιούν τους μεταγραφικούς παράγοντες PXR, CAR, RXR α και HNF4, με αποτέλεσμα να επάγουν το *CYP3A4* (El-Sankary et al., 2002), (Pascussi et al., 2003), (Pascussi et al., 2004), (Pavek et al., 2007), (Brtko and Dvorak, 2011). Η μελέτη του Liddle et al. έδειξε μια εντυπωσιακή αύξηση κατά 740% των επιπέδων mRNA του *CYP3A4* μετά από χορήγηση δεξαμεθαζόνης σε πρωτογενή ανθρώπινα ηπατοκύτταρα (Liddle et al., 1998). Οι πυρηνικοί υποδοχείς εμπλέκονται στην επαγωγή του *CYP3A*, αφού η παρουσία γλυκοκορτικοειδών αυξάνει την έκφραση των CAR, PXR και RXR α (Pascussi et al., 2000a), (Dvorak et al., 2003). Τέλος, η στενή σχέση μεταξύ GR και PXR φανερώνεται από το γεγονός ότι η δεξαμεθαζόνη επάγει τον GR (σε χαμηλές συγκεντρώσεις) και τον PXR (σε υψηλότερες συγκεντρώσεις) (El-Sankary et al., 2000), (Pascussi et al., 2001), όπως συμβαίνει και με το συνθετικό γλυκοκορτικοειδές, pregnenolone-16 α -carbonitrile (PCN) (Khan et al., 2009).

Επιπλέον, ο GR ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων της υποοικογένειας *CYP2C* στον άνθρωπο και πιο συγκεκριμένα τα *CYP2C8/9/19*. Αυτό επιτυγχάνεται με δύο τρόπους, με την απ' ευθείας σύνδεση του GR στο GRE των γονιδίων του *CYP2C* αλλά

και εμμέσως δια της επαγωγής των CAR, PXR and RXR οι οποίοι είναι γνωστοί ρυθμιστές της έκφρασης των *CYP2C* (Dvorak and Pavek, 2010), (Brtko and Dvorak, 2011). Πάντως, η επαγωγή του *CYP2C11* από τα γλυκοκορτικοειδή είναι μια πολύπλοκη διαδικασία. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις τα γλυκοκορτικοειδή δρουν ως επαγωγείς του *CYP2C11* (όπως ακριβώς και στο *CYP3A*), ενώ αντίθετα σε υψηλές συγκεντρώσεις (όπως π.χ. σε συνθήκες πρόκλησης στρες) έχουν κατασταλτική δράση (Bergeron et al., 1998), (Iber et al., 1999). Τέλος, δεν υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές για τον ρόλο των γλυκοκορτικοειδών στη ρύθμιση της έκφρασης των *CYP2D*.

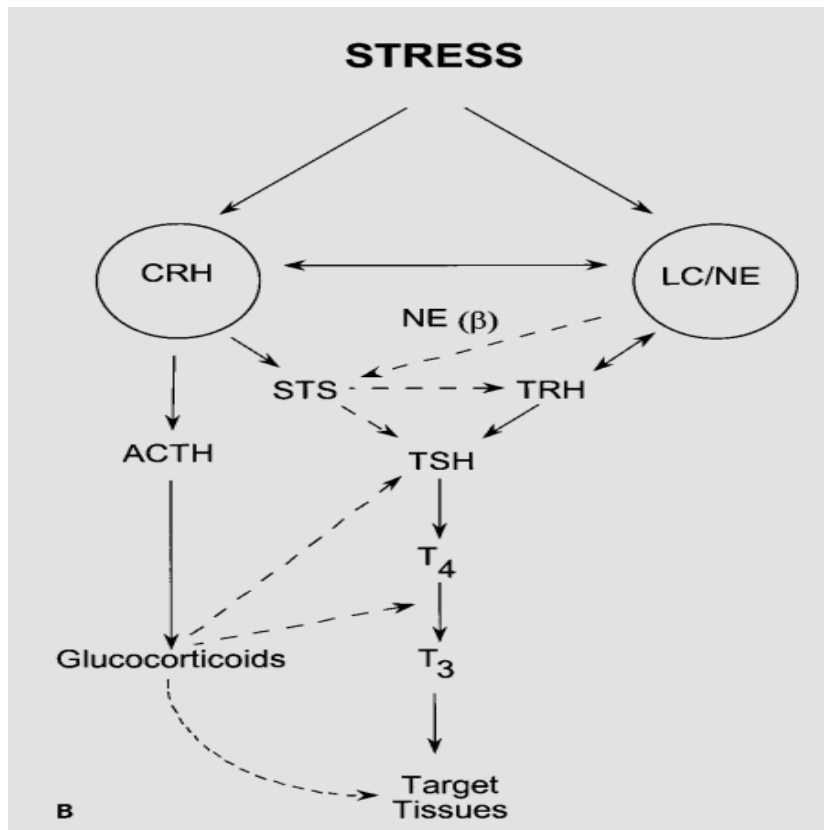


Σχήμα 14: Ο ρυθμιστικός ρόλος των GR στη ρύθμιση της μεταγραφής των *CYPs*. Σε φυσιολογικά επίπεδα γλυκοκορτικοειδών, αυξάνεται η έκφραση του *CYP2C9*, όπως επίσης και η έκφραση των CAR, PXR και RXR. Η αύξηση της έκφρασης των τελευταίων οδηγεί στην - μικρής έκτασης - επαγωγή των *CYP3A4* και *CYP2B6*. Εάν ένα ξενοβιοτικό αυξήσει την έκφραση πυρηνικών υποδοχέων ή υψηλά επίπεδα γλυκοκορτικοειδών δράσουν απ' ευθείας στους GR και στους PXR, προκύπτει πολύ μεγαλύτερη επαγωγή της έκφρασης των ανωτέρω κυτοχρωμάτων. Επεξηγήσεις: GR, υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών; GRE, στοιχεία απόκρισης DNA των γλυκοκορτικοειδών; HSP, heat shock proteins; Nucleus, πυρήνας του κυττάρου; Xenobiotics, ξενοβιοτικά; XRE, στοιχεία απόκρισης DNA των ξενοβιοτικών (Pascussi et al., 2003).

3.3.2. Στρες και CYPs

Τόσο το οξύ, όσο και το χρόνιο στρες έχουν ως αποτέλεσμα δραματικές δομικές αλλαγές σε διάφορα συστήματα και μονοπάτια, τα οποία ελέγχουν ζωτικής σημασίας λειτουργίες του οργανισμού. Έτσι, το στρες έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό τον ΥΥΕ άξονα (Tsigos and Chrousos, 2002) και τα γλυκοκορτικοειδή (Chrousos and Kino, 2009) (βλ. προηγούμενο υποκεφάλαιο).

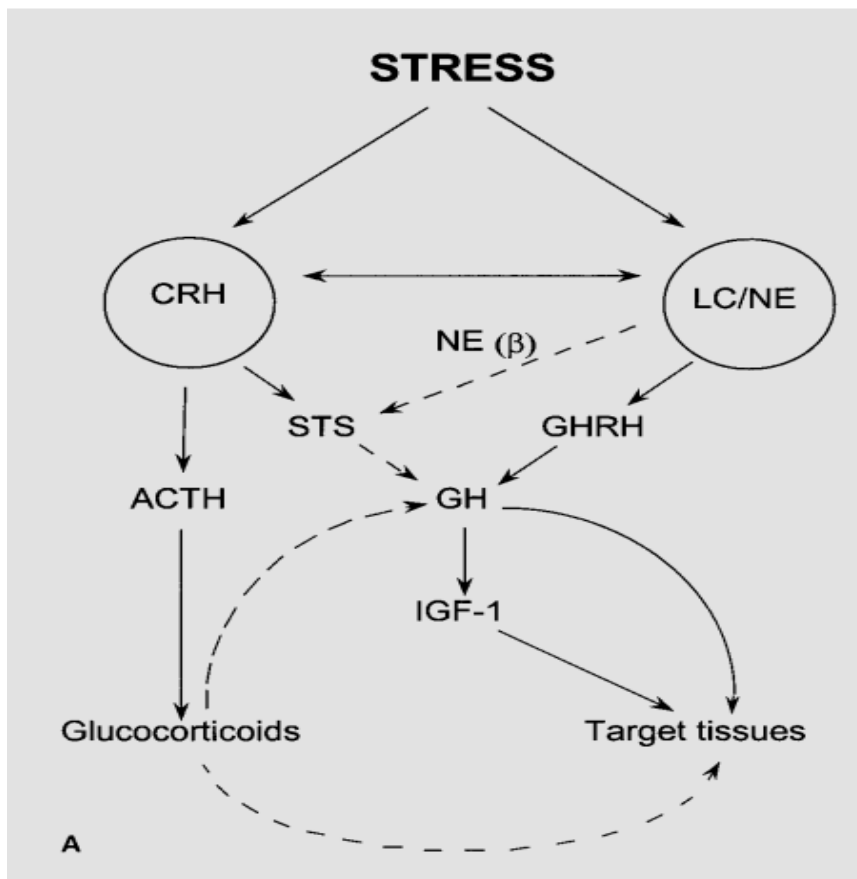
Επίσης, το στρες προκαλεί μεταβολές στην έκκριση διαφόρων ορμονών, όπως είναι οι θυρεοειδικές και η αυξητική ορμόνη. Η ενεργοποίηση του ΥΥΕ άξονα συνεπάγεται καταστολή του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-θυρεοειδούς αδένα (ΥΥΘΑ) (Helmreich and Tylee, 2011). Η καταστολή του ΥΥΘΑ άξονα διενεργείται μέσω των γλυκοκορτικοειδών και πιθανόν να συμβάλλει στην εξοικονόμηση ενέργειας κατά τη διάρκεια της έκθεσης στο στρες. Ειδικότερα, τα γλυκοκορτικοειδή αναστέλουν την δράση της 5-δεϊωδινάσης, η οποία καταλύει την μετατροπή της T4 (ανενεργή ορμόνη) σε T3 (ενεργή). Ένας άλλος παράγοντας που πιθανόν να καταστέλλει τον ΥΥΘΑ άξονα είναι τα υψηλά επίπεδα σωματοστατίνης. Η ενεργοποίηση του ΥΥΕ άξονα προκαλεί αύξηση της CRH, η οποία με τη σειρά της αυξάνει την έκκριση της σωματοστατίνης και αυτή έχει ανασταλτική δράση τόσο στην TRH, όσο και στην TSH (Charmandari et al., 2003). Στο **Σχήμα 15**, παρουσιάζονται οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των θυρεοειδικών ορμονών και του συστήματος του στρες.



Σχήμα 15: Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ του συστήματος του στρες και του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-θυρεοειδούς αδένα (ΥΥΘΑ). Επεξηγήσεις: ACTH, φλοιοεπινεφριδιοτρόπος ορμόνη; CRH, κορτικοεκλυτίνη; Glucocorticoids, γλυκοκορτικοειδή; LC/NE, υπομέλανας τόπος / πυρήνες νορεπινεφρίνης; NE, νορεπινεφρίνη; STS, σωματοστατίνη; Target tissues, ιστοί-στόχοι; TRH, θυρεοεκλυτίνη; TSH, θυρεοειδοτρόπος ορμόνη (Charmandari et al., 2003).

Επιπλέον, η παρατεταμένη ενεργοποίηση του συστήματος του στρες οδηγεί στην καταστολή του άξονα της αυξητικής ορμόνης (growth hormone ή GH). Η έκκριση της GH μειώνεται ενώ τα γλυκοκορτικοειδή καταστέλλουν την δράση του παρόμοιου με την ινσουλίνη αυξητικού παράγοντα-1 (insulin-like growth factor 1 ή IGF-1). Η καταστολή της έκκρισης GH φαίνεται να οφείλεται στην σωματοστατίνη (ο σημαντικότερος παράγοντας αναστολής της έκκρισης GH), της οποίας τα επίπεδα αυξάνονται υπό την δράση της CRH (Stratakis et al., 1995), (Charmandari et al., 2003). Μελέτες με επίμυες οι οποίοι είχαν εκτεθεί σε χρόνια στρες, έδειξαν ότι η υποφουσεκτομή ή η επινεφριδεκτομή οδηγεί σε αναστροφή της καταστολής της GH και της IGF-1, φανερώνοντας την μεγάλη σημασία της δράσης των γλυκοκορτικοειδών (Rodgers et al.,

1994). Στο **Σχήμα 16**, παρουσιάζονται οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ του συστήματος του στρες και του άξονα GH / IGF-1.



Σχήμα 16: Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ του συστήματος του στρες και του άξονα GH/IGF-1. Επεξηγήσεις: ACTH, φλοιοεπινεφριδιοτρόπος ορμόνη; GH, αυξητική ορμόνη; GHRH, σωματοεκλυτίνη; CRH, κορτικοεκλυτίνη; Glucocorticoids, γλυκοκορτικοειδή; IGF-1, ινσουλινόμορφος αυξητικός παράγοντας-1; LC/NE, υπομέλανας τόπος / πυρήνες νορεπινεφρίνης; NE, νορεπινεφρίνη; STS, σωματοστατίνη; Target tissues, ιστοί-στόχοι; TRH, θυρεοεκλυτίνη; TSH, θυρεοειδοτρόπος ορμόνη (Charmandari et al., 2003).

Επιπροσθέτως, η αντίδραση στο στρες προκαλεί μεταβολές και στο ανοσοποιητικό σύστημα, μέσω μεταβολών στην ενεργοποίηση ενός πλήθους κυτοκινών και άλλων παραγόντων του ανοσοποιητικού συστήματος. Οι τρεις σημαντικότερες κυτοκίνες που αλληλεπιδρούν με τον ΥΥΕ άξονα είναι ο TNFα, ο οποίος εμφανίζεται

συνήθως πρώτος και οι ιντερλευκίνες IL-1 και IL-6. Οι τρεις αυτές κυτοκίνες ενισχύουν την έκκριση της CRH από τον υποθάλαμο, ενώ η IL-6 φαίνεται να διεγείρει απ' ευθείας την αύξηση των επιπέδων της κορτιζόλης και της κορτικοτροπίνης στους ανθρώπους. Διάφοροι άλλοι φλεγμονώδεις παράγοντες, όπως οι ιντερφερόνες (IFN- α/γ), η IL-2, ο μετατρεπτικός αυξητικός παράγοντας β (transforming growth factor β ή TGF- β), ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (epidermal growth factor) και άλλοι, παίρνουν επίσης μέρος στη ρύθμιση του ΥΥΕ άξονα (Chrousos, 1995).

Κατά τη διάρκεια της έκθεσης ενός οργανισμού σε ψυχολογικό στρες, οι ορμόνες του στρες ασκούν έλεγχο πάνω στο μεταβολισμό, ενώ η ινσουλίνη δρα ανταγωνιστικά σε αυτές τις ορμόνες. Σε ορισμένες όμως περιπτώσεις επαναλαμβανόμενου ή χρόνιου στρες, είναι δυνατόν να αναπτυχθεί αντίσταση στην ινσουλίνη, με αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων της γλυκόζης στο πλάσμα (Black, 2006). Αυτές οι μεταβολές στα επίπεδα της ινσουλίνης, όπως θα αναπτυχθεί παρακάτω, παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της έκφρασης των *CYPs* (Woodcroft and Novak, 1997).

Όπως θα αναφερθεί στα επόμενα υποκεφάλαια, όλοι αυτοί οι παράγοντες παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της έκφρασης των κυτοχρωμάτων *CYPs*. Γίνεται λοιπόν αντιληπτό ότι το ψυχολογικό στρες, δρώντας σε διάφορους στόχους, μπορεί να επηρεάσει την έκφραση διαφόρων γονιδίων *CYPs* και επομένως να μεταβάλει τον ηπατικό μεταβολισμό φαρμάκων, γεγονός που έχει σοβαρές συνέπειες για την επιτυχία της φαρμακοθεραπείας και την τοξικότητα των φαρμακευτικών ουσιών.

Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι η επανειλημμένη έκθεση επιμύων σε στρες περιορισμού (RS) προκαλεί μεταβολές στην έκφραση διαφόρων κυτοχρωμάτων *CYPs*. Το RS αυξάνει τα ολικά *CYPs* και έχει ισχυρή επαγωγική δράση στην ενζυμική δραστηριότητα των CYP1A1, CYP2B1 και CYP2E1 σε βασικό επίπεδο. Αντίθετα, ένα άλλο μοντέλο στρες, το "ήπιο και απρόβλεπτο στρες" (MUS) προκαλεί ελάττωση στη δραστηριότητα των CYP1A2 και CYP2E1, ενώ επάγει ισχυρά την δραστηριότητα του CYP1A1. Υπό συνθήκες επαγωγής με B(α)P, οι δραστηριότητες των CYP1A1/2 και CYP2B1 αυξήθηκαν περαιτέρω όταν οι επίμυες εκτέθηκαν σε RS, αλλά το MUS κατάφερε να αυξήσει επιπλέον μόνο την - ήδη αυξημένη λόγω B(α)P - δραστηριότητα του CYP2B1 (Konstandi et al., 2000). Το RS σε συνδυασμό με τον α_2 -αγωνιστή, δεξμεντετομιδίνη, αύξησε την δραστηριότητα του CYP1A1 σε επίμυες, αλλά μείωσε τη

δραστικότητα των CYP1A2 και CYP2B1 σε συνθήκες επαγωγής με βενζοπυρένιο [B(α)P]. Αντίθετα, σε βασικό επίπεδο μόνο η δραστικότητα του CYP2B1 παρουσίασε αύξηση (Konstandi et al., 1998a). Επιπλέον, σε πειράματα με ποντίκια βρέθηκε ότι στο μεν βασικό επίπεδο το στρες μειώνει τη δραστικότητα των ολικών CYPs και τη δραστικότητα των Cyp1a1 και Cyp1a2, αλλά προκαλεί επαγωγή της δραστικότητας του Cyp2a5. Σε συνθήκες επαγωγής με τον παράγοντα TCPOBOP, τα ολικά CYPs αυξήθηκαν σημαντικά, όπως επίσης και τα επίπεδα mRNA του Cyp2a5 (Konstandi et al., 1998b). Εξάλλου οι μελέτες της Mikhailova et al. έδειξαν ότι τα επίπεδα mRNA του Cyp2a1 εμφάνισαν αύξηση σε νεαρά ποντίκια μετά από στρες, αυτό όμως δεν συνέβη σε ηλικιωμένα ποντίκια, κάτι που φανερώνει τον ρόλο της ηλικίας στην απάντηση στο στρες (Mikhailova et al., 2005).

Περαιτέρω έρευνες σε επίμυες επιβεβαίωσαν τα προηγούμενα συμπεράσματα αλλά και απέδειξαν το σημαντικό ρόλο που παίζουν οι κατεχολαμίνες στην ρύθμιση των κυτοχρωμάτων CYPs από το στρες. Μία μελέτη πάνω στο CYP1A1 κατέγραψε διαφορές στο ρόλο των κεντρικών και περιφερικών κατεχολαμινών. Το RS αύξησε την δραστικότητα του CYP1A1 και αυτό φάνηκε να ρυθμίζεται από τις κεντρικές παρά τις περιφερικές κατεχολαμίνες. Αντίθετα, υπό συνθήκες επαγωγής, η αύξηση της έκφρασης του CYP1A1 από το στρες, φάνηκε να ρυθμίζεται από τις περιφερικές και όχι από τις κεντρικές κατεχολαμίνες (Konstandi et al., 2004). Επιπλέον, φάνηκε ότι οι περιφερικές κατεχολαμίνες παίζουν σημαντικότερο ρόλο στην επαγωγική δράση του στρες πάνω στο CYP1A2 υπό συνθήκες επαγωγής με B(α)P. Οι παράγοντες που ρυθμίζονται μέσω των κεντρικών και περιφερικών α₂-αδρενεργικών υποδοχέων είναι επίσης, δυνατόν να επηρεάσουν την επαγωγή του CYP1A2 (Konstandi et al., 2008b).

3.4. Ορμόνες

3.4.1. Θυρεοειδικές ορμόνες

Ο θυρεοειδής αδένας είναι από τους μεγαλύτερους ενδοκρινικούς αδένες του ανθρώπινου σώματος και εκκρίνει τις θυρεοειδικές ορμόνες (thyroid hormones ή TH) καλσιτονίνη, τριϊωδοθυρονίνη (T3) και τετραϊωδοθυρονίνη ή θυροξίνη (T4). Η T4 είναι η ορμόνη-πρόδρομος της T3, η πρώτη όμως παράγεται σε πολύ μεγαλύτερες ποσότητες

(90%) σε σχέση με την T3 (10%) (Seeley et al., 2000). Η ρύθμιση της έκκρισής τους γίνεται από την θυρεοειδοτρόπο ορμόνη (TSH), η οποία εκκρίνεται από την υπόφυση. Η έκκριση της TSH με τη σειρά της ελέγχεται από την θυρεοεκλυτίνη (TRH), η οποία παράγεται στον υποθάλαμο. Οι TH απελευθερώνονται στην κυκλοφορία του αίματος, εισέρχονται στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων-στόχων και συνδέονται με τους - πυρηνικούς - υποδοχείς τους. Στη συνέχεια, στον πυρήνα, συνδέονται σε καθορισμένες περιοχές του DNA με αποτέλεσμα την αύξηση της μεταγραφής διαφόρων γονιδίων (Seeley et al., 2000), (Μαρσέλος και Μάλαμας, 2006), ενώ παίζουν σημαντικότατο ρόλο και στην ρύθμιση της έκφρασης των *CYPs* (Brtko and Dvorak, 2011).

Οι TH διεγείρουν τους υποδοχείς τους, TRα (ή NR1A1) και TRβ (ή NR1A2) και δημιουργούν ετεροδιμερή με τον πυρηνικό υποδοχέα RXR (Pascussi et al., 2008). Όπως προαναφέρθηκε στο υποκεφάλαιο 3.2., ο RXR είναι σημαντικότατος πυρηνικός μεταγραφικός παράγοντας για την ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων των υποοικογενειών *CYP3A*, *CYP2B* και *CYP2C* (Pascussi et al., 2003). Πιο πρόσφατες έρευνες έχουν καταλήξει στο συμπέρασμα ότι οι TH έχουν κατασταλτική δράση στην έκφραση πολλών κυτοχρωμάτων, συμπεριλαμβανομένων των υποοικογενειών *CYP1A*, *CYP2B* και *CYP3A* (Kot and Daniel, 2011).

Στη μελέτη των Ram και Waxman βρέθηκαν υψηλά επίπεδα έκφρασης του *CYP3A2* σε επίμυες, οι οποίοι είχαν υποβληθεί σε θυρεοειδεκτομή και υποφυσεκτομή. Όταν στους ίδιους επίμυες χορηγήθηκε T3 και T4, η αύξηση αυτή ανεστράφη (Ram and Waxman, 1991). Επίσης, η έκθεση καλλιέργειών ανθρώπινων ηπατοκυττάρων σε T3 προκάλεσε την καταστολή της έκφρασης του *CYP3A4* και αυτό παρατηρήθηκε σε ενζυμική δραστηριότητα (μέτρηση της 6β-υδροξυλίωσης της τεστοστερόνης) καθώς και σε επίπεδα αποπρωτεΐνης και mRNA (Liddle et al., 1998). Επιπροσθέτως, μια μελέτη που περιέλαβε υγιείς Ιάπωνες εθελοντές, έδειξε ότι η χορήγηση T3 για δύο εβδομάδες οδήγησε σε ισχυρή καταστολή των επιπέδων *CYP3A4* (Takahashi et al., 2010). Αφ' ετέρου, υποθυρεοειδικοί επίμυες εμφάνισαν καταστολή της έκφρασης του *CYP2C11*, όμως η χορήγηση T4 δεν οδήγησε σε αύξηση της έκφρασης της ισομορφής αυτής, υπονοώντας ότι η ρύθμιση της έκφρασης του *CYP2C11* δεν σχετίζεται - τουλάχιστον άμεσα - με τα επίπεδα των θυρεοειδικών ορμονών (Ram and Waxman, 1991). Αντιθέτως, οι Ram και Waxman παρατήρησαν ότι η ηπατική έκφραση του *CYP2C7* αυξήθηκε μετά από χορήγηση TH σε επίμυες, οι οποίοι είτε είχαν χαμηλά επίπεδα TH, είτε είχαν υποβληθεί σε υποφυσεκτομή (Ram and Waxman, 1990). Επομένως, ο ρόλος

των TH στην ρύθμιση της έκφρασης της υποοικογένειας CYP2C δεν είναι ακόμη εντελώς ξεκάθαρος. Τέλος, η βιβλιογραφία αναφέρει ότι η υποοικογένεια CYP2D δεν δείχνει ευαισθησία στην απ' ευθείας ρύθμιση από τις TH (Wojcikowski and Daniel, 2009).

Η ρύθμιση της έκφρασης των CYPs από τις TH φαίνεται να γίνεται δια μέσου των πυρηνικών μεταγραφικών παραγόντων CAR, PXR (Pascussi et al., 2003) και RXRα (Li et al., 2004). Οι πυρηνικοί αυτοί υποδοχείς, όπως αναφέρθηκε στο υποκεφάλαιο 3.2., έχουν σημαντικό ρόλο στην έκφραση πολλών γονιδίων CYPs (Pascussi et al., 2003), (Tolson and Wang, 2010), επομένως μεταβολές στα επίπεδα των TH είναι δυνατόν να επηρεάσουν τους TR και έτσι την ρύθμιση διαφόρων γονιδίων CYPs. Οι δεϊωδινάσες (DIO) είναι ένζυμα τα οποία καταλύουν - στο ήπαρ και διάφορους ιστούς της περιφέρειας - την μετατροπή της T4 στην ενεργή μορφή T3. Η έκθεση ανθρώπινων πρωτογενών ηπατοκυττάρων σε ριφαμπικίνη ή φαινοβαρβιτάλη (δύο γνωστούς επαγωγείς κυτοχρωμάτων CYPs) προκάλεσε αύξηση των επιπέδων mRNA των DIO. Χορήγηση φαινοβαρβιτάλης σε *in vivo* πειράματα με ποντίκια επίσης, έδειξε ότι επάγεται η έκφραση του γονιδίου *Dio-1* και αυτό φαίνεται να γίνεται μέσω του CAR (Tien et al., 2007). Εξάλλου, η παρουσία των TH φαίνεται ότι είναι ζωτικής σημασίας για την έκφραση του CAR και των ισομορφών CYPs που αυτό ελέγχει. Έκθεση καλλιέργειών μικρών ηπατοκυττάρων σε T3/T4 είχε ως συνέπεια την ισχυρή επαγωγή του CAR αλλά και του CYP2B1. Αντιθέτως, σε πειραματόζωα τα οποία είχαν υποβληθεί σε θυρεοειδεκτομή, τόσο ο CAR όσο και το CYP2B1 κατεστάλησαν σημαντικά (Ooe et al., 2009). Οι πιο πρόσφατες έρευνες φανερώνουν ότι οι TR, ο CAR και ο PXR μοιράζονται στοιχεία απόκρισης (response elements) του DNA και επομένως, συνδέονται με πολύπλοκους cross-talk μηχανισμούς (Pascussi et al., 2008). Τέλος, είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι οι TH συνδέονται στενά με cross-talk μηχανισμούς και με τους GR, για τους οποίους έγινε ξεχωριστή αναφορά σε προηγούμενο υποκεφάλαιο. Η ομάδα του Yamaguchi έδειξε ότι τα γλυκοκορτικοειδή ενισχύουν την επαγόμενη από την T3 έκφραση διαφόρων γονιδίων, συμπεριλαμβανομένου του RXRα, σε καλλιέργειες ηπατοκυττάρων (Yamaguchi et al., 1999). Η αλληλεπίδραση γλυκοκορτικοειδών, YVE άξονα, θυρεοειδικών ορμονών και πυρηνικών υποδοχέων για τη ρύθμιση της έκφρασης των CYPs φανερώνει τον υψηλό βαθμό πολυπλοκότητας του συστήματος CYP (Helmreich et al., 2005).

3.4.2. Αυξητική ορμόνη και STAT5b

Η αυξητική ορμόνη ή σωματοτροπίνη (growth hormone ή GH) είναι μια πρωτεΐνη, η οποία αποτελείται από 191 αμινοξέα και έχει ζωτικής σημασίας ρόλο στον κυτταρικό μεταβολισμό, την κυτταρική αύξηση και εξαλλαγή (Waxman and O'Connor, 2006). Η GH συνδέεται με τους υποδοχείς της (GHR), οι οποίοι βρίσκονται στην κυτταρική μεμβράνη και επηρεάζει το κύτταρο/στόχο έμμεσα και άμεσα (Seeley et al., 2000), μεταβάλλοντας την μεταγραφή διαφόρων γονιδίων, συμπεριλαμβανομένων ορισμένων που ανήκουν στην υπερ-οικογένεια CYP (Waxman and O'Connor, 2006). Η έκκριση της GH από την υπόφυση ρυθμίζεται από δύο άλλες ορμόνες, οι οποίες εκκρίνονται από τον υποθάλαμο:

- α) την εκλυτική ορμόνη της έκκρισης της GH ή σωματοεκλυτίνη (growth hormone releasing hormone ή GHRH), η οποία διεγείρει την έκκριση της GH και
- β) τον ρυθμιστικό παράγοντα αναστολής της έκκρισης της GH ή σωματοστατίνη (growth hormone inhibiting hormone ή GHIH), η οποία έχει ανασταλτικό ρόλο (Seeley et al., 2000).

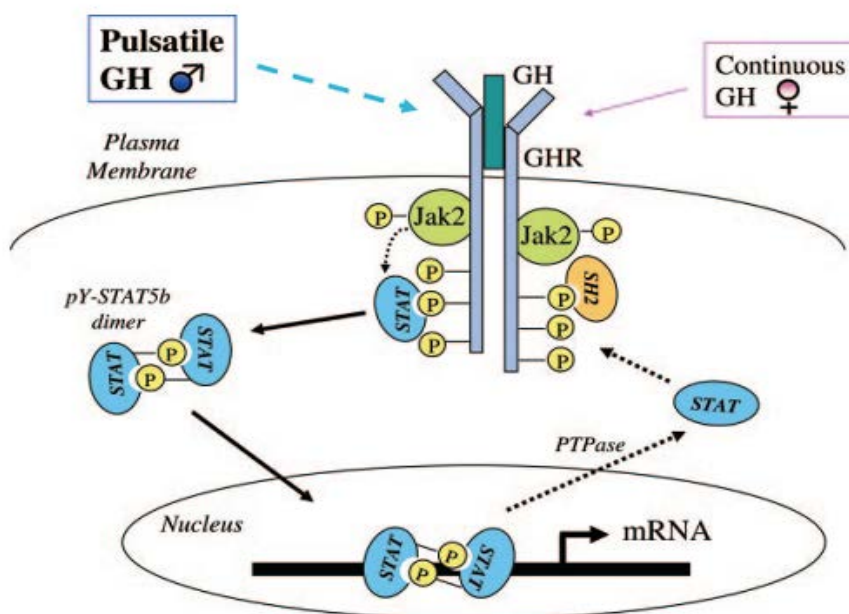
Η GH είναι ο σημαντικότερος παράγοντας καθορισμού των διαφορών στον ηπατικό μεταβολισμό μεταξύ των δύο φύλων (Mode et al., 1989). Οι διαφορές αυτές είναι ιδιαίτερα έντονες στα τρωκτικά αλλά λιγότερο σημαντικές στους ανθρώπους. Παρ' όλα αυτά, οι άνδρες μεταβολίζουν πολύ γρηγορότερα από τις γυναίκες την καφεΐνη, ενώ αντίθετα, οι γυναίκες μεταβολίζουν την ερυθρομυκίνη με μεγαλύτερη ταχύτητα από ότι οι άνδρες (Waxman and O'Connor, 2006). Η πιο εμφανής διαφορά στους επίμυες είναι μεταξύ των ισομορφών CYP2C11 και CYP2C12. Η πρώτη ισομορφή εκφράζεται μόνο στους αρσενικούς επίμυες και εξαρτάται από την παλμική έκκριση της GH (περίπου για 1 ώρα κάθε 3.5-4 ώρες) (Jansson et al., 1985), ενώ το CYP2C12 εκφράζεται μόνο σε θηλυκούς επίμυες εις απάντησιν της συνεχούς έκκρισης της GH (Waxman and O'Connor, 2006). Η διαφοροποίηση αυτή επιβεβαιώθηκε με *in vivo* μελέτες. Αρσενικά πειραματόζωα, τα οποία είχαν υποστεί υποφυσεκτομή, εμφάνισαν μειωμένα επίπεδα CYP2C11, ενώ το ίδιο παρατηρήθηκε με το CYP2C12 σε θηλυκούς επίμυες, στους οποίους είχε αφαιρεθεί η υπόφυση. Η παλμική χορήγηση GH οδηγεί σε πανομοιότυπη έκφραση του CYP2C11 και στα δύο φύλα. Αντιθέτως, η συνεχής χορήγηση GH προκαλεί την έκφραση του CYP2C12 και στους αρσενικούς και τους θηλυκούς επίμυες (Bergeron et al., 1998). Επίσης, όταν εισαχθούν σε διαγονιδιακά ποντίκια τα ανθρώπινα

γονίδια *CYP2C18* και *CYP2C19*, εκφράζονται οι αρσενικές μορφές, κάτι που αναστρέφεται όταν στα ποντίκια γίνει συνεχής χορήγηση GH (Lofgren et al., 2008).

Εκτός του *CYP2C11* και *CYP2C12* στους επίμυες, διάφορες άλλες ισομορφές φαίνεται να σχετίζονται με το φύλο και με την συνεχή ή παλμική έκκριση της GH. Έτσι, τα *CYP2A2*, *CYP2C13*, *CYP3A2* και *CYP4A2* (εκφράζονται κυρίως στους αρσενικούς επίμυες) και τα *CYP2B1/2*, *CYP3A1* και *CYP3A18* (εκφράζονται σχεδόν αποκλειστικά στους θηλυκούς επίμυες) φαίνεται να εξαρτώνται από την GH (Shimada et al., 1997), (Wojcikowski and Daniel, 2009). Εξάλλου, διάφορες μελέτες έχουν ερευνήσει την σχέση του ανθρώπινου *CYP3A4* με την GH. Σε ασθενείς με μεγαλακρία, επομένως και πολύ υψηλά επίπεδα GH στο αίμα, βρέθηκε αυξημένη δραστηριότητα του *CYP3A4*. Επίσης, σε πρωτογενή ανθρώπινα ηπατοκύτταρα, η συνεχής χορήγηση GH οδήγησε σε επαγωγή της έκφρασης του *CYP3A4*, ενώ αντιθέτως η έκφρασή του μειώθηκε μετά από παλμική χορήγηση GH (Liddle et al., 1998), (Waxman and O'Connor, 2006).

Έχει αποδειχθεί ότι ο ρυθμιστικός ρόλος της GH στην έκφραση των κυτοχρωμάτων επιτυγχάνεται με την ενεργοποίηση του κυτταροπλασματικού μεταγραφικού παράγοντα STAT5b (signal transducer and activator of transcription 5b) (Herrington et al., 2000), (Waxman and O'Connor, 2006) από την παλμική έκκριση της GH. Η δράση της παλμικής έκκρισης GH μέσω του STAT5b ξεκινά με την σύνδεση της GH στον υποδοχέα GHR, γεγονός που προκαλεί την φωσφορυλίωση της JAK2 κινάσης (Janus kinase 2) και του GHR. Εν συνεχεία, δημιουργείται ένα σύμπλεγμα GHR-JAK2-STAT5b, το οποίο προκαλεί την φωσφορυλίωση του STAT5b από την JAK2 στη θέση Tyr⁶⁹⁹ αλλά και σε άλλες θέσεις (Thr ή Ser). Ο φωσφορυλιωμένος παράγοντας STAT5b δημιουργεί διμερή και μετατοπίζεται στο εσωτερικό του πυρήνα, όπου συνδέεται με στοιχεία απόκκρισης DNA, γονιδίων τα οποία σχετίζονται με την GH, αυξάνοντας την μεταγραφή τους. Ακολούθως ο p-STAT5b απενεργοποιείται από την φωσφατάση της φωσφοτυροσίνης (PTPase) και επανενεργοποιείται μόνο σε περίπτωση που υπάρξει περαιτέρω διέγερση από την παλμική έκκριση GH (Gebert et al., 1999), (Herrington et al., 2000). Σε μελέτες με ποντίκια στα οποία είχε ανασταλεί η έκφραση του γονιδίου *Stat5b*, βρέθηκε ότι πολλά χαρακτηριστικά του αρσενικού φύλου (έκφραση ηπατικών *CYP* γονιδίων και αρσενικά χαρακτηριστικά σωματικής αύξησης), χάθηκαν λόγω της αδυναμίας του οργανισμού να "απαντήσει" στην παλμική έκκριση της GH (Udy et al., 1997), (Teglund et al., 1998), (Davey et al., 1999). Επομένως, η παρουσία του STAT5b και η παλμική έκκριση της GH ανά διαστήματα τουλάχιστον τριών ωρών είναι οι δύο

πιο σημαντικοί παράγοντες για την σωστή λειτουργία αυτής της οδού μεταγωγής σήματος και την ρύθμιση των γονιδίων *CYPs* που ελέγχονται από αυτό (Gebert et al., 1999), (Herrington et al., 2000). Στο Σχήμα 17, παρουσιάζεται αναλυτικά ο τρόπος δράσης των GH και STAT5b. Αντιθέτως, στους θηλυκούς επίμυες η συνεχής έκκριση GH έχει ως συνέπεια την ασθενέστερη ενεργοποίηση της STAT5b (Gebert et al., 1999). Μελέτες έχουν δείξει ότι η STAT5b παίζει ασήμαντο ρόλο στην ρύθμιση των *CYPs* στους θηλυκούς επίμυες. Στους θηλυκούς, σημαντικότερος παράγοντας ρύθμισης είναι ο STAT5a, ο οποίος όμως δεν φαίνεται να παίζει ρόλο στους αρσενικούς επίμυες (Park et al., 1999).



Σχήμα 17: Ο τρόπος δράσης της παλμικής έκκρισης της GH στους άρρενες επίμυες μέσω του STAT5b. Επεξηγήσεις: Pulsatile GH, παλμική έκκριση αυξητικής ορμόνης; Continuous GH, συνεχής έκκριση αυξητικής ορμόνης; Plasma membrane, κυτταρική μεμβράνη; GH, αυξητική ορμόνη; GHR, υποδοχέας αυξητικής ορμόνης; Jak2, Janus kinase 2; STAT, signal transducer and activator of transcription; SH2, Src homology 2 protein; PTPase, φωσφατάση της φωσφοτυροσίνης; pY-STAT5b dimer, ομοδιμερές φωσφορυλιωμένου STAT5b; Nucleus, πυρήνας (Waxman and O'Connor, 2006).

Τέλος, αξίζει να αναφερθεί - βλ. επίσης υποκεφάλαιο 3.1.4. - ότι η GH, ο STAT5b και οι μεταγραφικοί παράγοντες HNF συνδέονται στενά μεταξύ τους με cross-talk μηχανισμούς (Wiwi and Waxman, 2004), (Park et al., 2006), (Waxman and Holloway, 2009). *In vitro* μελέτες με αντικείμενο το CYP2C του επίμυ και το Cyp2d του ποντικού, έχουν καταδείξει την στενή σχέση μεταξύ της παλμικής έκκρισης της GH και της ενεργοποίησης των STAT5b και HNF4α, ενώ παρόμοια αποτελέσματα έχουν εξαχθεί και από *in vivo* έρευνες (Wiwi and Waxman, 2004). Αντιθέτως, η έκφραση της υποοικογένειας *CYP2D* δε φαίνεται να σχετίζεται με το φύλο και επομένως, η έκφραση των ισομορφών που ανήκουν σε αυτή, πιθανόν να μην ρυθμίζεται από την GH και τον STAT5b (Takahashi et al., 1999).

3.5. Ινσουλίνη και ρύθμιση των CYPs: ρόλος των D₂-ντοπαμινεργικών υποδοχέων

3.5.1. Ινσουλίνη

Η ινσουλίνη είναι μια πρωτεΐνη με μοριακό βάρος 5734, η οποία αποτελείται από 51 αμινοξέα σε δύο πεπτιδικές αλυσίδες, την α (21 αμινοξέα) και την β (30 αμινοξέα) (Μαρσέλος και Μάλαμας, 2006). Η ινσουλίνη παράγεται από τα β-παγκρεατικά κύτταρα των νησιδίων του Langerhans, αρχικά ως προ-προϊνσουλίνη στο αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο των β-κυττάρων. Από εκεί, μεταφέρεται στο σύμπλεγμα Golgi, όπου μετατρέπεται σε προϊνσουλίνη και έπειτα σε ινσουλίνη. Η τελευταία, αποθηκεύεται σε εκκριτικά κοκκία και εκλύεται σταθερά σε βασικό επίπεδο, αλλά και σε μεγαλύτερες ποσότητες ως απάντηση σε υψηλά επίπεδα γλυκόζης στο αίμα. Οι υποδοχείς της ινσουλίνης είναι διαμεμβρανικοί υποδοχείς γλυκοπρωτεϊνικής φύσεως και αποτελούνται από την α- και την β-υπομονάδα. Η α-υπομονάδα βρίσκεται έξω από το κύτταρο και διαθέτει το σημείο σύνδεσης με την ινσουλίνη, ενώ η β-υπομονάδα είναι διαμεμβρανική και διαθέτει ενζυμική δραστηριότητα τυροσίνης-κινάσης (Rang et al., 2003).

Η ινσουλίνη είναι ο πιο σημαντικός ρυθμιστής του μεταβολισμού του οργανισμού, συμβάλλοντας στην αποθήκευση γλυκόζης, αμινοξέων και λιπών, τα οποία προέρχονται από τη διατροφή. Η ρύθμιση αυτή γίνεται μέσω της επίδρασης της ινσουλίνης στο ήπαρ, τους σκελετικούς μύες και τον λιπώδη ιστό. Συγκεκριμένα στο

ήπαρ, η ινσουλίνη προκαλεί μείωση της γλυκογονόλυσης, αύξηση της γλυκόλυσης και της γλυκονεογένεσης, αύξηση της λιπογένεσης και μείωση της λιπόλυσης καθώς και μείωση της διάσπασης των πρωτεϊνών. Πέρα από τον έλεγχο του μεταβολισμού όμως, η ινσουλίνη διαδραματίζει σημαντικότατο ρόλο και σε άλλες λειτουργίες του κυττάρου, όπως είναι ο πολλαπλασιασμός του, η ανάπτυξη και η απόπτωση, η σύνθεση διαφόρων ενζύμων (Rang et al., 2003), όπως επίσης και στην ρύθμιση της έκφρασης διαφόρων γονιδίων (Castano, 1991), (O'Brien and Granner, 1991).

Τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα είναι ο πιο σημαντικός ρυθμιστικός παράγοντας της έκλυσης ινσουλίνης, αλλά υπάρχουν και άλλοι παράγοντες που ενεργοποιούν την παραγωγή και έκλυσή της, όπως είναι η γαστρίνη, η σεκρετίνη, η χολοκυστοκίνη, το γαστρικό ανασταλτικό πεπτίδιο (gastric inhibitory peptide ή GIP), το γλυκαγονοειδές πεπτίδιο 1 (glucagon-like peptide 1 ή GLP1) κ.α. Διάφοροι παράγοντες ασκούν αρνητική επίδραση στην έκλυση ινσουλίνης, όπως είναι οι α_2 -αδρενεργικοί και οι D₂-ντοπαμινεργικοί υποδοχείς (βλ. συνέχεια), η σωματοστατίνη, η γαλανίνη, η αμυλίνη κ.α. (Rang et al., 2003).

3.5.2. Ο ρόλος της Ινσουλίνης στην ενεργοποίηση του μονοπατιού PI3K/Akt

Το μονοπάτι της φωσφατιδυλινοσιτόλης 3-κινάσης (phosphatidylinositol-3 kinase ή PI3K) και εκείνο του ευκαρυωτικού στόχου ραπαμυκίνης (mammalian target of rapamycin ή mTOR) είναι δύο συστήματα, τα οποία ελέγχουν λειτουργίες ζωτικής σημασίας για το κύτταρο, όπως είναι η ανάπτυξη, ο μεταβολισμός και η επιβίωση. Ουσιαστικά, πρόκειται για δύο μονοπάτια, τα οποία συνδέει η Akt (protein kinase B ή PKB), η οποία είναι ίσως η πιο σημαντική κινάση για ένα πλήθος λειτουργιών. Το μονοπάτι της PI3K/Akt ενεργοποιείται από την παρουσία ινσουλίνης (μέσω των υποδοχέων της) αλλά και από μια πλειάδα άλλων ερεθισμάτων, τα οποία δρουν σε διάφορους υποδοχείς, όπως είναι ο υποδοχέας του ινσουλινοειδούς αυξητικού παράγοντα 1 (insulin-like growth factor 1 ή IGF-1), οι υποδοχείς που μοιάζουν με τους υποδοχείς Toll (Toll-like receptors ή TLR), οι υποδοχείς κυτοκινών όπως της IL-2 κ.α. (Weichhart and Saemann, 2008).

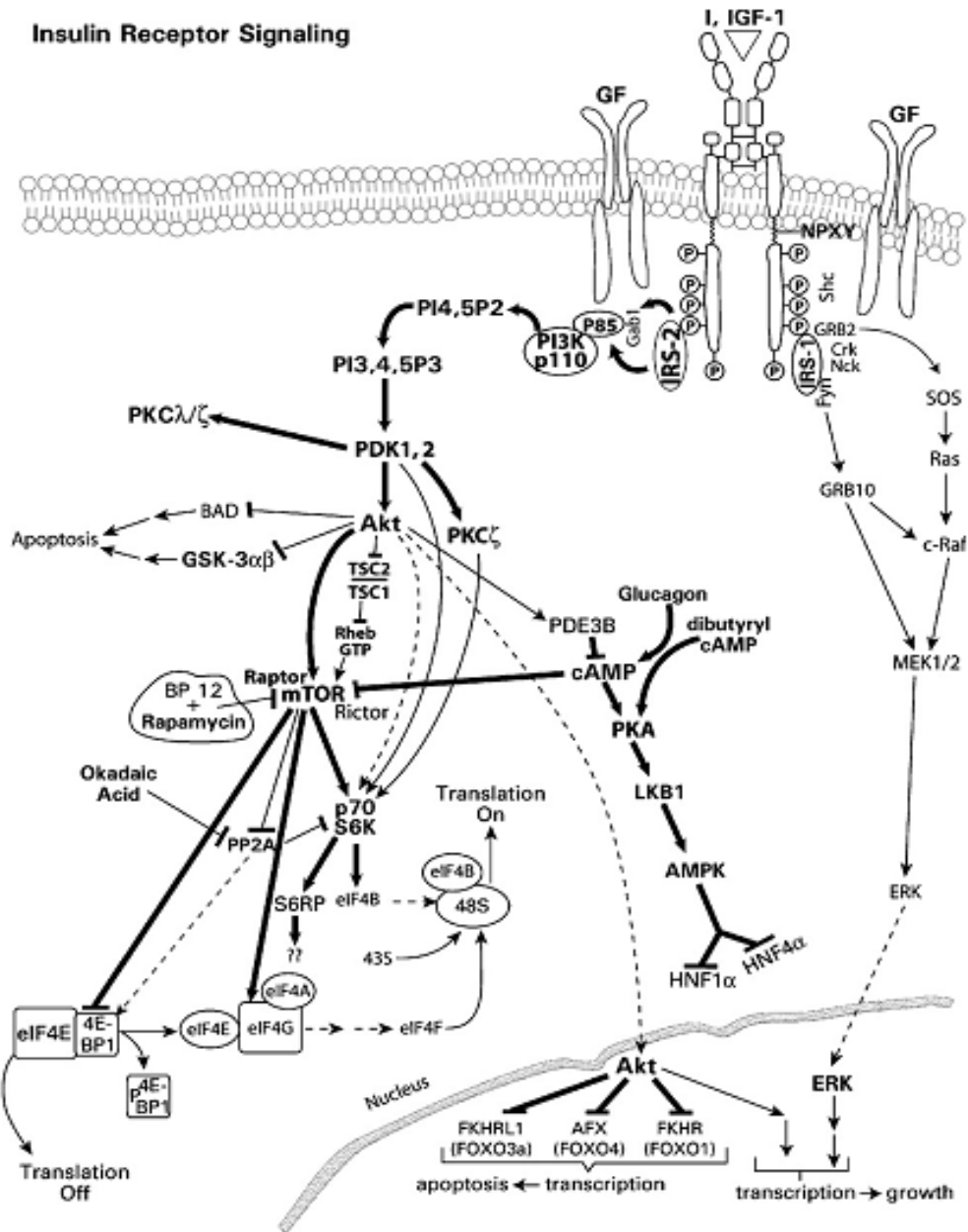
Η ινσουλίνη συνδέεται με τον υποδοχέα της και αυτός φωσφορυλιώνει το τμήμα που συνδέεται με την φωσφοτυροσίνη (phosphotyrosine binding [PTB] domain) του

υποστρώματος του ινσουλινικού υποδοχέα (IRS). Στους ανθρώπους και τα τρωκτικά εκφράζονται οι IRS-1, -2 και -4, με τις δύο πρώτες ισομορφές να εκφράζονται σχεδόν σε όλους τους ιστούς. Η φωσφορυλίωση του IRS προκαλεί ενεργοποίησή του και εκείνος συνδέεται με διάφορους άλλους παράγοντες. Ο πρώτος παράγοντας που ενεργοποιείται από τον IRS είναι η κινάση PI3K, η οποία εν συνεχεία δρα στο PI(4,5)P2 και παράγει το PI(3,4,5)P3 (ή PIP3). Το τελευταίο με την συνέργεια της πρωτεϊνικής κινάσης, που εξαρτάται από το 3-phosphoinositide-1 και -2 (PDK-1 και -2), ενεργοποιεί την Akt και όλα τα μόρια που βρίσκονται downstream από αυτή. Έτσι, ενεργοποιείται ο mTOR, η p70S6 κινάση (p70S6K), η πρωτεΐνη 4EBP1 και η ριβονουκλεϊκή πρωτεΐνη S6 (S6RP). Η ενεργοποίηση του 4EBP1 από τον mTOR οδηγεί στην αύξηση της μεταγραφής του mRNA. Η ενεργοποίηση της p70S6K και της S6RP οδηγεί τόσο στην αύξηση της πρωτεϊνοσύνθεσης, όσο και στην επαγωγή της μεταγραφής του mRNA. Οι πρωτεΐνες tuberous sclerosis complex 1 και 2 (TSC-1 και -2) δρουν ως αναστολείς του mTOR, προκαλώντας αναστολή και όλων των downstream παραγόντων που ακολουθούν (4E-BP1, p70S6K, S6RP), με αποτέλεσμα να μειώνεται η μεταγραφή του mRNA αλλά και η πρωτεϊνοσύνθεση (Asnaghi et al., 2004), (Fingar and Blenis, 2004), (Hay and Sonenberg, 2004), (Wullschlegel et al., 2006), (Kim and Novak, 2007).

Στην πραγματικότητα, το μονοπάτι μετάδοσης σημάτων που ενεργοποιείται από την ινсуλίνη, είναι πολύ πιο πολύπλοκο και περιλαμβάνει και άλλα υπο-μονοπάτια (π.χ. FoxO1, ERK, PKA), η ύπαρξη και αλληλεπίδραση των οποίων αυξάνει την πολυπλοκότητα του συστήματος. Ο FoxO1 (forkhead box O1) είναι μεταγραφικός παράγοντας που επηρεάζεται από την Akt, και ρυθμίζει την μεταγραφή σημαντικών γονιδίων (βλ. υποκεφάλαιο 3.6.5). Οι MAP κινάσες (ERK), επίσης ενεργοποιούνται από την παρουσία ινсуλίνης και παίζουν ρόλο στην μεταγραφή γονιδίων, που είναι υπεύθυνα για την κυτταρική ανάπτυξη. Τέλος, η πρωτεϊνική κινάση A (protein kinase A ή PKA) και τα επίπεδα της κυκλικής μονοφωσφορικής αδενοσίνης (cyclic adenosine 3',5'-monophosphate ή cAMP), για τα οποία θα γίνει ξεχωριστή αναφορά παρακάτω, είναι δυνατόν να επηρεάσουν το μονοπάτι της PI3K/Akt/mTOR, καταστέλλοντας την mTOR και επομένως, και της p70S6K που βρίσκεται downstream. Υπεύθυνη για την ενεργοποίηση του μονοπατιού της PKA είναι η παρουσία της ορμόνης γλυκαγόνης. Η Akt όμως δρα ανασταλτικά για τα επίπεδα cAMP και ως εκ τούτου και για την PKA. Στο **Σχήμα 18**, παρουσιάζεται μια ολοκληρωμένη εικόνα των μονοπατιών, που

ενεργοποιούνται από την ινσουλίνη και των αλληλεπιδράσεων μεταξύ τους (Kim and Novak, 2007).

A Insulin Receptor Signaling



Σχήμα 18: Μονοπάτια μετάδοσης σήματος, τα οποία ελέγχονται από την ινσουλίνη (Kim and Novak, 2007).

Η Akt λοιπόν, είναι ο κεντρικός "αισθητήρας", ο οποίος ρυθμίζει, τόσο την μεταγραφή του mRNA, όσο και την μετάφραση της πρωτεΐνης, ελέγχοντας έτσι την έκφραση διαφόρων γονιδίων (Kim and Novak, 2007). Παράγοντες, οι οποίοι μπορούν να επηρεάσουν (αρνητικά ή θετικά) τα επίπεδα ινσουλίνης, προκαλούν μεταβολές σε

μόρια, τα οποία είναι μέρος του μονοπατιού της PI3K/Akt (downstream της ινσουλίνης). Αυτό, έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση επί μέρους μονοπατιών, τα οποία έχουν ποικίλες λειτουργίες και στα οποία συμπεριλαμβάνονται η παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου (NO), το μονοπάτι της p70S6K και η ρύθμιση του μεταγραφικού παράγοντα FoxO1. Αυτοί οι παράγοντες, έχουν διάφορους ρόλους και μπορούν να οδηγήσουν στην μεταβολή της έκφρασης διαφόρων γονιδίων - συμπεριλαμβανομένων και γονιδίων που ελέγχουν την έκφραση των κυτοχρωμάτων *CYPs* - και έτσι να προκαλέσουν μεταβολές του μεταβολισμού των ξενοβιοτικών.

Μελέτες της ομάδας των Woodcroft και Novak έδειξαν ότι η έκθεση πρωτογενών ηπατοκυττάρων σε ινσουλίνη, προκαλεί καταστολή της έκφρασης του *CYP2E1*. Έκθεση των κυττάρων για 48 ώρες σε 1μM ινσουλίνης, οδήγησε στην μείωση των επιπέδων mRNA του *CYP2E1* κατά 10.5 φορές. Αντίστοιχα, τα επίπεδα mRNA του *CYP2B* μειώθηκαν κατά 50% μετά από 48 ώρες έκθεσης σε ινσουλίνη. Επίσης, και τα επίπεδα αποπρωτεΐνης των δύο κυτοχρωμάτων παρουσίασαν καταστολή μετά την έκθεση σε ινσουλίνη (Woodcroft and Novak, 1997). Η θεωρία ότι η καταστολή του *CYP2E1* από την ινσουλίνη γίνεται μέσω του μονοπατιού της PI3K/Akt επιβεβαιώθηκε με μια άλλη μελέτη από την ίδια ομάδα. Χρησιμοποιώντας τους αναστολείς της PI3K, Wortmannin και LY294002, έδειξαν ότι καταστολή του μονοπατιού PI3K/Akt οδηγεί στην αύξηση των επιπέδων του *CYP2E1*. Αποδείχθηκε ότι οι MAPK δεν έχουν ρόλο στην μέσω ινσουλίνης ρύθμιση του *CYP2E1* (Woodcroft et al., 2002). Αντίθετα από το κυτόχρωμα *CYP2E1*, διαπιστώθηκε ότι η έκφραση των κυτοχρωμάτων *CYP3A* και *CYP4A* μειώθηκε ελαφρά όταν η ινσουλίνη αφαιρέθηκε από το medium των κυττάρων. Επομένως, εξάχθηκε το συμπέρασμα ότι η έκφρασή τους δε φαίνεται να ρυθμίζεται από την ινσουλίνη (Woodcroft and Novak, 1999). Το αντίθετο αποτέλεσμα προέκυψε από μια άλλη μελέτη, η οποία έδειξε ότι επίμυες στους οποίους είχε προκληθεί διαβήτης τύπου I (με χορήγηση στρεπτοζοτοκίνης), εμφάνισαν αυξημένα επίπεδα *CYP3A1/2*, τα οποία όμως κατεστάλησαν σε διαβητικούς επίμυες στους οποίους χορηγήθηκε ινσουλίνη. Οι ερευνητές όμως, απέτυχαν να εξηγήσουν την μείωση των επιπέδων mRNA μέσω αλλαγών στον PXR (Hasegawa et al., 2010). Έρευνες από τους Sidhu & Omiecinski κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η ινσουλίνη αντιστρέφει την αύξηση στην έκφραση του *CYP3A1* που προκαλείται από την φαινοβαρβιτάλη, σε πρωτογενή ηπατοκύτταρα επιμύων, και επομένως, η ινσουλίνη δρα κατασταλτικά στην έκφραση

της ισομορφής *CYP3A1* (Sidhu and Omiecinski, 1999). Στη συνέχεια θα αναπτυχθούν τα επί μέρους μονοπάτια που σχετίζονται με το μονοπάτι PI3K/Akt και η σχέση τους με τη ρύθμιση των κυτοχρωμάτων *CYPs*.

3.5.3. Σχέση Ινσουλίνης και μονοπατιού PI3K/Akt/mTOR/p70S6k στην ρύθμιση των *CYPs*

Η ριβοσωμική p70S6 κινάση (p70S6K ή S6K1), όπως προαναφέρθηκε, είναι μια κινάση σερίνης/θρεονίνης, η οποία βρίσκεται downstream στο μονοπάτι PI3K/Akt/mTOR. Η p70S6K αποτελείται από έναν N-ακροδέκτη (N-terminus), το υπεύθυνο τμήμα για την καταλυτική δράση και τον ρυθμιστικό C-ακροδέκτη (C-terminus). Ο C-ακροδέκτης διαθέτει 3 σημεία που μπορούν να φωσφορυλιωθούν (Thr²²⁹, Thr³⁸⁹ και Ser³⁷¹) και φαίνεται ότι η PDK1 φωσφορυλιώνει την θέση Thr²²⁹ για να ενεργοποιήσει την p70S6K (Kim and Novak, 2007). Η ενεργοποίηση της p70S6K έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της μετάφρασης των πρωτεϊνών, καθώς και την ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και επομένως, την ανάπτυξη του κυττάρου (Fingar and Blenis, 2004), (Inoki and Guan, 2006), την κυτταρική επιβίωση, τις αλλαγές στον κυτταρικό σκελετό, την συρραφή (splicing) του RNA κ.α. (Fenton and Gout, 2011). Αφού ενεργοποιηθεί (από τη συνδυασμένη δράση του mTOR και της PDK1), η p70S6K φωσφορυλιώνει την ριβοσωμική πρωτεΐνη S6 (S6RP), η οποία παίζει εξαιρετικά σημαντικό ρόλο στην πρωτεϊνσύνθεση που λαμβάνει χώρα στα ριβοσωμάτια. Εκτός του ρόλου στη μετάφραση πρωτεϊνών, οι p70S6K και S6RP έχουν σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο στην μεταγραφή του mRNA διαφόρων γονιδίων (Kim and Novak, 2007).

Η σημασία της p70S6K είναι μεγάλη και λόγω της δράσης της ως αρνητικού ανατροφοδότη (negative-feedback) στο υπόστρωμα IRS-1 (insulin receptor substrate-1). Η ενεργοποίηση του mTOR και της p70S6K έχει ως αποτέλεσμα την δραστηριοποίηση της πρωτεϊνών TSC1 και TSC2 (tuberous sclerosis proteins 1 και 2). Οι πρωτεΐνες αυτές δρουν ως ετεροδιμερή και ρυθμίζουν το PI3K/Akt/mTOR/p70S6K μονοπάτι, ασκώντας αρνητική ανατροφοδότηση στο IRS-1, με αποτέλεσμα να αναστέλλεται η ενεργοποίηση της PI3K (Wullschlegel et al., 2006). Απουσία του p70S6K (π.χ. σε ποντίκια knockout για το p70S6K - *S6K1*^{-/-}), οδηγεί σε αδυναμία ελέγχου μέσω αρνητικής ανατροφοδότησης του IRS-1 και επομένως, και του μονοπατιού PI3K/Akt. Σε αυτή την

περίπτωση, το PI3K/Akt μονοπάτι δεν αναστέλλεται και έτσι τα knockout ποντίκια εμφανίζουν υπερευαισθησία στην ινσουλίνη (Um et al., 2004).

Επίσης, ένα άλλο ενδιαφέρον χαρακτηριστικό της p70S6K είναι ότι φωσφορυλιώνει την mTOR στις θέσεις Thr²⁴⁴⁶ (Holz and Blenis, 2005) και Ser²⁴⁴⁸ (Chiang and Abraham, 2005). Αυτό, εκ πρώτης όψεως, φαίνεται να είναι κάποιας μορφής ανατροφοδότηση, παρ' όλα αυτά δεν είναι ακόμη σίγουρο αν προκαλεί θετική (positive feedback) ή αρνητική (negative feedback) ανατροφοδότηση, ή ακόμη και αν η φωσφορυλίωση σε αυτές τις θέσεις δεν προκαλεί κάποια αλλαγή.

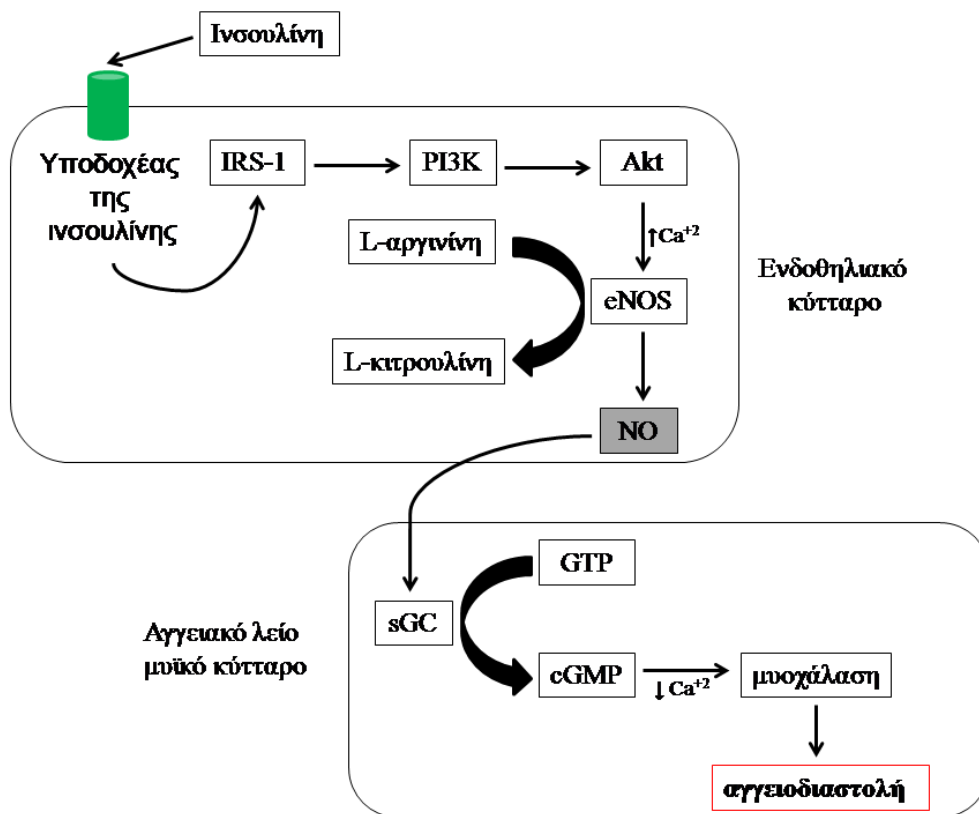
Η ομάδα των Woodcroft και Novak έδειξε ότι η χρήση ραπαμυκίνης (ισχυρού αναστολέα της mTOR), αναστέλλει την mTOR και έτσι και την p70S6K, με αποτέλεσμα την αναστροφή της αναστολής των επιπέδων mRNA του κυτοχρώματος *CYP2E1*, που είχε προκληθεί από την χορήγηση ινσουλίνης σε πρωτογενή ηπατοκύτταρα που απομονώθηκαν από επίμυες (Woodcroft et al., 2002). Πέραν αυτής της αναφοράς, η βιβλιογραφία δεν διαθέτει άλλες παραπομπές για απ' ευθείας άσκηση ελέγχου της p70S6K στη ρύθμιση των κυτοχρωμάτων *CYPs*. Παρ' όλα αυτά, ο Pondugala και οι συνεργάτες του πρόσφατα μελέτησαν τον hPXR σε HEPG2 κύτταρα ηπατοκυτταρικού καρκίνου και απέδειξαν ότι η p70S6K φωσφορυλιώνει την θέση Thr⁵⁷ του hPXR, αναστέλλοντας την λειτουργία του (Pondugala et al., 2009). Επομένως, είναι πιθανό κυτοχρώματα *CYPs*, τα οποία ρυθμίζονται από τον PXR στον άνθρωπο (*CYP2B6*, *CYP2C8/9/19*, *CYP3A4/5/7*) (Harmsen et al., 2007), να βρίσκονται υπό την επιρροή της p70S6K.

3.5.4. Ρύθμιση των *CYPs* από την Ινσουλίνη: ρόλος του μονοπατιού PI3K/Akt/NO

Είναι γνωστό ότι, το μονοξείδιο του αζώτου (NO) παίζει πολύ σημαντικό ρόλο σε όλα σχεδόν τα συστήματα του οργανισμού. Παράγεται από μια μεγάλη ποικιλία κυττάρων, όπως είναι τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων, τα αιμοπετάλια, τα μαστοκύτταρα, τα κύτταρα Kupffer, τα μακροφάγα, τις νευρικές απολήξεις, ενώ απελευθερώνεται στο ήπαρ κάτω από την επίδραση διαφόρων παραγόντων. Το NO παράγεται ενδογενώς κάτω από την επίδραση του ενζύμου συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου (nitric oxide synthase ή NOS) στην L-αργινίνη. Το τελικό προϊόν αυτής της αντίδρασης, είναι η L-κιτρουλίνη και NO. Η L-κιτρουλίνη είναι δυνατόν να μετατραπεί ξανά σε L-αργινίνη ώστε να επακολουθήσει νέος κύκλος παραγωγής NO. Υπάρχουν

τρεις σημαντικές ισομορφές της NOS, η NOS-1 (neNOS) η οποία συναντάται σχεδόν κατ' αποκλειστικότητα στον νευρικό ιστό, η NOS-2 (iNOS) που είναι η επαγωγίμη μορφή και η NOS-3 (eNOS), η οποία εκφράζεται στο ενδοθήλιο. Η iNOS είναι δυνατόν να επηρεαστεί από διάφορους παράγοντες που σχετίζονται με την φλεγμονή (π.χ. ενδοτοξίνες, ILs, TNF, αλλά και τα γλυκοκορτικοειδή (Alexander, 1998). Αντιθέτως, η eNOS επηρεάζεται από τα επίπεδα Ca^{+2} στο εσωτερικό του κυττάρου, από την calmodulin, την caveolin-1, τις Hsp90, τις διακυμάνσεις στο pH κ.α. (Fleming and Busse, 1999).

Το NO, παρά τον εξαιρετικά βραχύ χρόνο ημιζωής (5 δευτερόλεπτα), επιτελεί σημαντικές λειτουργίες σε μια πληθώρα συστημάτων και μάλιστα με διαφορετικούς τρόπους (Alexander, 1998). Η κύρια δράση του, έγκειται στην χαλάρωση του τοιχώματος των αιμοφόρων αγγείων, με αποτέλεσμα την πρόκληση αγγειοδιαστολής. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα εκφράζουν υποδοχείς ινσουλίνης, οι οποίοι ενεργοποιούνται από την παρουσία ινσουλίνης και δραστηριοποιούν το υπόστρωμα IRS-1 (insulin receptor substrate-1), το οποίο με τη σειρά του ενεργοποιεί το μονοπάτι της PI3K/Akt. Η αύξηση των ενδοκυττάρων επιπέδων ασβεστίου (Ca^{+2}) που προκαλεί η Akt, έχει ως αποτέλεσμα την φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση της eNOS. Η eNOS χρησιμοποιεί την L-αργινίνη ως υπόστρωμα και αυτή η αντίδραση έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή NO και L-κιτρουλίνης. Το NO διαχέεται ταχέως στα γειτονικά αγγειακά λεία μυϊκά κύτταρα και συνδέεται με την αίμη του μορίου της διαλυτής γουανυλικής κυκλάσης (soluble guanylate cyclase ή sGC). Το ένζυμο αυτό μετατρέπει την τριφωσφορική γουανοσίνη (guanosine triphosphate ή GTP) σε κυκλική μονοφωσφορική γουανοσίνη (cyclic guanosine monophosphate ή cGMP) και η τελευταία μειώνοντας τα ενδοκυττάρια επίπεδα Ca^{+2} έχει ως τελικό αποτέλεσμα την χαλάρωση των λείων μυϊκών κυττάρων που αποτελούν τα αγγεία και έτσι τελικά, την αγγειοδιαστολή (Ignarro, 2000), (Abebe and Mozaffari, 2010). Η ροή αρτηριακού αίματος στο ήπαρ είναι ένας σημαντικός παράγοντας ρύθμισης του ηπατικού μεταβολισμού, αν και ο ακριβής μηχανισμός δεν είναι απολύτως κατανοητός ακόμη. Αυξημένη ροή του αίματος μέσα στο ήπαρ, έχει ως συνέπεια την μείωση του μεταβολισμού (Alexander, 1998). Στο **Σχήμα 19** παρουσιάζεται η επίδραση της ινσουλίνης μέσω του μονοπατιού PI3K/Akt στα επίπεδα του NO και ο μηχανισμός πρόκλησης αγγειοδιαστολής.



Σχήμα 19: Η επίδραση της ινσουλίνης στην ενεργοποίηση του μονοπατιού PI3K/Akt και η επακόλουθη αύξηση της έκφρασης του NO, που οδηγεί σε μυοχάλαση και αγγειοδιαστολή (Abebe and Mozaffari, 2010).

Η ινσουλίνη μέσω της ενεργοποίησης του μονοπατιού της PI3K/Akt, ενισχύει την έκφραση της eNOS, παρ' όλα αυτά, το αντίθετο φαίνεται να συμβαίνει με την iNOS. Η ινσουλίνη αναστέλλει την έκφραση της iNOS στα ηπατοκύτταρα και αυτό αποδεικνύεται ότι συμβαίνει μέσω του μονοπατιού της PI3K/Akt, αφού έκθεση των πρωτογενών ηπατοκυττάρων σε LY294002 (ισχυρό αναστολέα της PI3K) οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων της iNOS (Harbrecht et al., 2011).

Το NO είναι δυνατόν να αντιδράσει με ιόντα σιδήρου και επομένως, να επηρεάσει πρωτεΐνες, οι οποίες φέρουν άτομα σιδήρου, όπως είναι τα κυτοχρώματα CYP (Alexander, 1998). Ο ακριβής μηχανισμός μέσω του οποίου το NO οδηγεί σε αναστολή των CYP δεν είναι ακόμη ξεκάθαρος. Μια θεωρία υποστηρίζει ότι το σύμπλοκο NO/CYP είναι ασταθές και επομένως, οδηγεί στην απώλεια της δραστηριότητας του κυτοχρώματος (Ebel et al., 1975). Μια άλλη θεωρία, εικάζει ότι η παραγωγή NO έχει ως αποτέλεσμα την διάσπαση του μορίου της αίμης του CYP και

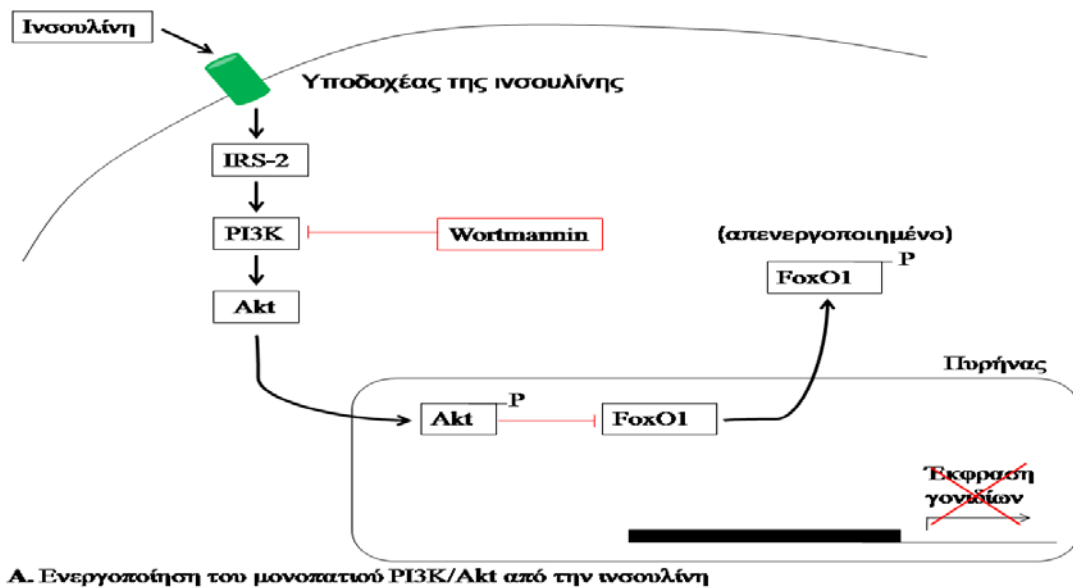
έτσι στην αδρανοποίηση του ενζύμου, μηχανισμός που πιθανόν να ισχύει κατά την αναστολή των κυτοχρωμάτων CYP από τα βακτηριακά λιποπολυσακχαρίδια (LPS) (Khatsenko et al., 1993). Επιπροσθέτως, οι Khatsenko & Kittawa ήταν οι πρώτοι που απέδειξαν με *in vivo* πειράματα ότι το NO είναι δυνατόν να προκαλέσει αναστολή των ισομορφών *CYP3A2*, *CYP2C11*, *CYP1A2* και *CYP2B1/2* σε προμεταγραφικό επίπεδο (Khatsenko and Kikkawa, 1997). Τέλος, το NO είναι πιθανόν να ρυθμίζει την έκφραση διαφόρων κυτοχρωμάτων *CYPs*, μέσω μεταγραφικών παραγόντων. Η ομάδα των Hara & Adachi έδειξε ότι η ικανότητα του HNF4 να συνδέεται με το DNA, αναστέλλεται σε HepG2 κύτταρα που είχαν εκτεθεί σε υψηλά επίπεδα NO. Η αναστολή του HNF4 οδήγησε σε μειωμένη έκφραση του γονιδίου *CYP2D6* και πιθανόν, ο ίδιος μηχανισμός να είναι υπεύθυνος και για την αναστολή της έκφρασης διαφόρων άλλων κυτοχρωμάτων *CYPs* (Hara and Adachi, 2002).

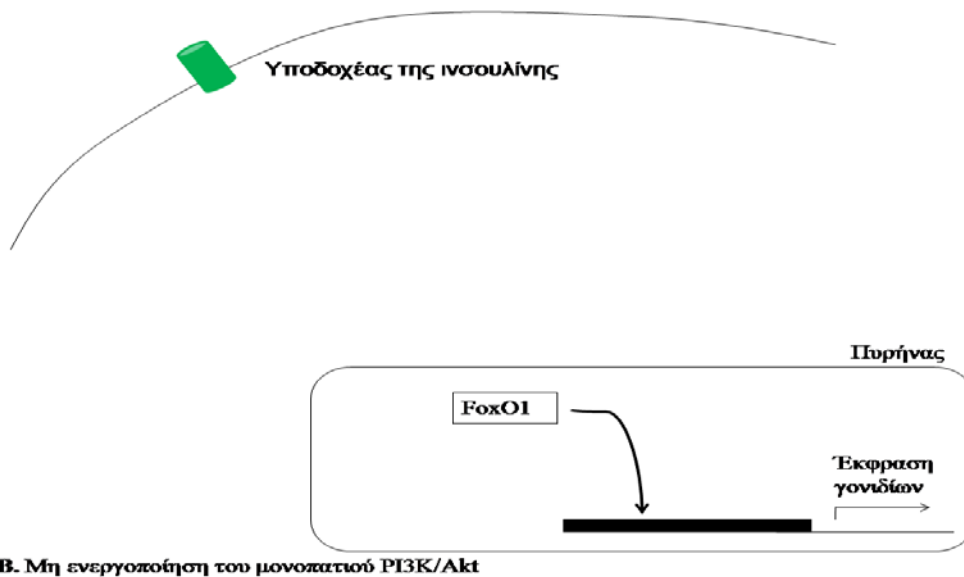
3.5.5. Ρύθμιση των *CYPs* από την Ινσουλίνη: ρόλος του μονοπατιού PI3K/Akt/FoxO1

Ο μεταγραφικός παράγοντας FoxO1 (forkhead box O1), ανήκει στην οικογένεια των FoxO, οι οποίοι είναι σημαντικοί ρυθμιστές ζωτικών λειτουργιών του κυττάρου, όπως του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της διαφοροποίησης, του μεταβολισμού, αλλά και του κυτταρικού θανάτου. Οι μεταγραφικοί παράγοντες FoxO αποτελούνται από 3 έλικες - οι οποίες μοιάζουν με φτερά πεταλούδας - και περίπου 100 αμινοξέα. Η οικογένεια FoxO διακρίνεται σε 4 μέλη: FoxO1 (ή FKHR), -3a, -4 και -6. Ο FoxO1 είναι ο τύπος που έχει μελετηθεί περισσότερο και εκφράζεται σχεδόν σε όλους τους ιστούς (Burgering, 2008).

Η σχέση της δράσης του FoxO1 με την ινσουλίνη είναι γνωστή και περιλαμβάνει πολύπλοκες διαδικασίες, οι οποίες σχετίζονται με την ενεργοποίηση του μονοπατιού της PI3K/Akt (Guo et al., 1999), (Nakae et al., 1999), (Rena et al., 1999), (Matsuzaki et al., 2003). Η ενεργοποίηση του μονοπατιού της PI3K είναι απαραίτητη για την φωσφορυλίωση του FoxO1 από την ινσουλίνη και αυτό αποδείχθηκε από το γεγονός ότι η Wortmannin (αναστολέας της PI3K) αναστέλλει την επίδραση της ινσουλίνης στον FoxO1 (Nakae et al., 1999). Η ινσουλίνη ενεργοποιεί το μονοπάτι της PI3K και οδηγεί στην αύξηση της Akt. Η Akt με τη σειρά της μετατοπίζεται (translocation) στον πυρήνα του κυττάρου, όπου καταλύει την φωσφορυλίωση του μεταγραφικού παράγοντα FoxO1, καθώς επίσης και των FoxO3a και FoxO4. Η Akt φωσφορυλιώνει το FoxO1 στις θέσεις

Thr²⁴, Ser²⁵⁶ και Ser³¹⁹. Η φωσφορυλίωση έχει ως αποτέλεσμα την μετατόπιση του FoxO1 έξω από τον πυρήνα και τελικά την απενεργοποίησή του, ενώ φαίνεται ότι η φωσφορυλίωση στην θέση Ser²⁵⁶ είναι η πιο σημαντική (Nakae et al., 1999), (Rena et al., 1999), (Zhang et al., 2002). Ο μηχανισμός μετατόπισης και απενεργοποίησης του FoxO1, δείχνει να είναι μια εξαιρετικά πολύπλοκη διαδικασία και θεωρείται ότι σημαντικό ρόλο παίζουν οι πρωτεΐνες 14-3-3. Οι πρωτεΐνες 14-3-3 πιθανόν να δρουν με διάφορους τρόπους, όπως ως πρωτεΐνες-συνοδοί (chaperone proteins), αναλαμβάνοντας να οδηγήσουν το FoxO1 εκτός του πυρήνα, επηρεάζοντας την περιοχή του FoxO1 που συνδέεται με το DNA (DNA-binding domain) ή μειώνοντας την σταθερότητα της FoxO1 πρωτεΐνης (Tzivion et al., 2011). Με τη μετατόπιση του FoxO1 εκτός του πυρήνα, αναστέλλεται η μεταγραφή μέσω FoxO1 και επομένως, και η έκφραση των γονιδίων που εξαρτώνται από αυτή. Ο μηχανισμός ενεργοποίησης του FoxO1 σε συνθήκες μη-ενεργοποίησης του μονοπατιού PI3K/Akt και σε συνθήκες απενεργοποίησης του από την ινσουλίνη, παρουσιάζεται στο **Σχήμα 20**.





Σχήμα 20: Περίληψη του μηχανισμού δράσης του FoxO1.

A. Όταν τα επίπεδα ινσουλίνης είναι υψηλά, αυτή συνδέεται με τον υποδοχέα της, ο οποίος δραστηριοποιεί το υπόστρωμα IRS-2 και ακολουθεί η ενεργοποίηση του μονοπατιού PI3K/Akt, η φωσφορυλίωση της Akt και η μετατόπισή της στον πυρήνα. Εκεί, ακολουθεί η φωσφορυλίωση του FoxO1 και η μετατόπισή του στο κυτταρόπλασμα, όπου απενεργοποιείται, με αποτέλεσμα να αναστέλλεται η έκφραση γονιδίων.

B. Απουσία ινσουλίνης, ο FoxO1 δρα ως μεταγραφικός παράγοντας, ενισχύοντας την έκφραση διαφόρων γονιδίων (Kim and Novak, 2007).

Οι πυρηνικοί μεταγραφικοί παράγοντες CAR, PXR και HNF4 - όπως προαναφέρθηκε στο υποκεφάλαιο 3.2. - είναι οι βασικοί παράγοντες ρύθμισης της επαγωγής των γονιδίων *CYPs*. Πρόσφατες μελέτες, έδειξαν ότι η δράση του FoxO1 σχετίζεται στενά με τους μεταγραφικούς παράγοντες HNF4 (Hirota et al., 2003), CAR και PXR (Kodama et al., 2004). Ο μεταγραφικός παράγοντας HNF4 είναι υπεύθυνος για τη ρύθμιση διαφόρων λειτουργιών του ήπατος, όπως της μεταφοράς γλυκόζης, της γλυκόλυσης, της σύνθεσης χολής, του μεταβολισμού λιπαρών οξέων αλλά και της ρύθμισης των *CYPs*, όπως είναι το *CYP3A4* (Gonzalez, 2008), η υποοικογένεια *CYP2C* κ.α. (Wortham et al., 2007). Η μελέτη των Hirota et al. έδειξε ότι υπάρχει στενή

αλληλεπίδραση μεταξύ του HNF4 και του FoxO1. Ο FoxO1 φαίνεται να λειτουργεί ως συμπαράγοντας του HNF4 και μάλιστα δρα ανασταλτικά στην ενεργοποίηση του HNF4, ενώ όταν ενεργοποιηθεί το μονοπάτι της PI3K/Akt, ο FoxO1 μετατοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και έτσι παύει να ασκεί ανασταλτική δράση στον HNF4 (Hirota et al., 2003). Επομένως, η ινσουλίνη μέσω της ρύθμισης του FoxO1 είναι δυνατόν να επηρεάζει τον HNF4 και κατ' επέκταση να ρυθμίζει την έκφραση των κυτοχρωμάτων *CYPs*.

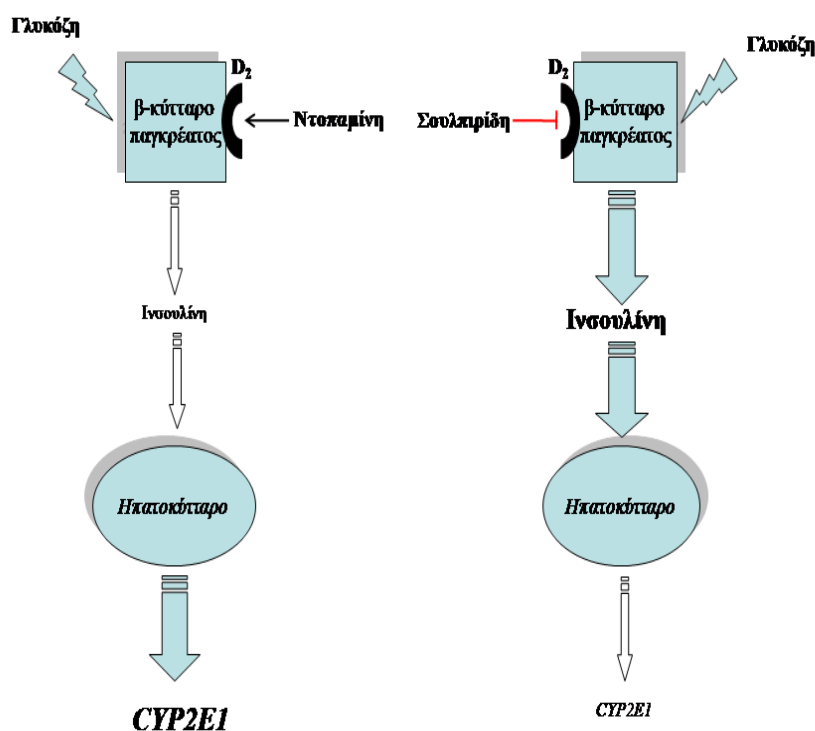
Διάφοροι παράγοντες όπως η φαινοβαρβιτάλη, η οιστραδιόλη και το TCPOBOP (1,4-bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)] benzene) επάγουν την παρουσία του CAR στο εσωτερικό του πυρήνα του κυττάρου. Όταν ο CAR συσσωρεύεται στον πυρήνα, ο FoxO1 δρα ως συν-ενεργοποιητής του, επάγωντάς τον και έτσι οδηγεί σε αύξηση της έκφρασης διαφόρων γονιδίων που ρυθμίζονται από τον CAR, όπως είναι το γονίδιο *CYP2B*. Η ινσουλίνη ενεργοποιεί το μονοπάτι PI3K/Akt και οδηγεί στην μετατόπιση του FoxO1 στο κυτταρόπλασμα. Σε αυτή την περίπτωση, δεν είναι δυνατή η συν-ενεργοποίηση του CAR και επομένως, η έκφραση γονιδίων που εξαρτώνται από τον CAR αναστέλλεται (Kodama et al., 2004). Επιπροσθέτως, ο FoxO1 ενεργοποιεί και τον PXR (Kodama et al., 2004), γεγονός που μπορεί να σημαίνει ότι πολλά γονίδια *CYP*, τα οποία ρυθμίζονται από το PXR π.χ. το *CYP3A* (Pascussi et al., 2000a), το *CYP2C* (Chen and Goldstein, 2009) κ.α. είναι επίσης, εξαρτώμενα από τον FoxO1 και η έκφραση τους πιθανόν να βρίσκεται υπό τον έλεγχο της ινσουλίνης.

3.5.6. Ινσουλίνη και ο ρόλος των D₂-ντοπαμινεργικών υποδοχέων στη ρύθμιση των *CYPs*.

Είναι αποδεδειγμένο ότι τα β-κύτταρα του παγκρέατος εκφράζουν όλους τους τύπους των ντοπαμινεργικών υποδοχέων και μάλιστα αυτοί βρίσκονται σε στενή σύνδεση με τα κοκκία αποθήκευσης της ινσουλίνης. Πρόσφατα, αποδείχθηκε ότι η ντοπαμίνη, μέσω της δράσης της στους D₂-ντοπαμινεργικούς υποδοχείς των β-κυττάρων του παγκρέατος, καταστέλλει την έκκριση ινσουλίνης και επομένως, παίζει σημαντικό ρόλο στην ομοιόσταση της γλυκόζης (Rubi et al., 2005). Το ΚΝΣ διαθέτει έναν "αισθητήρα" επιπέδων γλυκόζης, ο οποίος ενεργοποιείται όταν η γλυκόζη δεν βρίσκεται στα επιθυμητά επίπεδα. Αυτός ο "αισθητήρας" δέχεται ερεθίσματα από τον υποθάλαμο αλλά και από διάφορες άλλες πηγές που στέλνουν νευρο-ορμονικά ερεθίσματα και

επιηρεάζει τα β-παγκρεατικά κύτταρα, ώστε να ελαττώσουν ή να αυξήσουν τη έκκριση ινσουλίνης, ανάλογα με το ερέθισμα. Η ντοπαμίνη (DA) παίζει ρυθμιστικό ρόλο στην έκκριση της ινσουλίνης σε απάντηση στα υψηλά επίπεδα γλυκόζης στο αίμα (Shankar et al., 2006). Η έκθεση σε DA ή συνθετικά φάρμακα που δρουν ως αγωνιστές των D₂-ντοπαμινεργικών υποδοχέων, είχε ως αποτέλεσμα την καταστολή της έκκρισης ινσουλίνης σε μελέτες με β-κύτταρα ή απομονωμένα νησίδια παγκρέατος επιμύων (Americ et al., 1984), (Rubi et al., 2005).

Επιπροσθέτως, οι D₂-ντοπαμινεργικοί υποδοχείς των β-κυττάρων του παγκρέατος και η έκκριση ινσουλίνης, φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της έκφρασης των ηπατικών κυτοχρωμάτων *CYPs*. Ειδικότερα, πρόσφατες μελέτες, έδειξαν ότι διέγερση των D₂-ντοπαμινεργικών υποδοχέων προκαλεί καταστολή της έκκρισης ινσουλίνης, ως απάντηση στα αυξημένα επίπεδα γλυκόζης στο πλάσμα, με τελικό αποτέλεσμα την αύξηση της έκφρασης του κυτοχρώματος *CYP2E1*. Αντιθέτως, αναστολή των D₂-υποδοχέων, π.χ. με τον D₂-ανταγωνιστή σουλπιρίδη, οδηγεί σε αυξημένη έκκριση ινσουλίνης, με συνεπακόλουθη καταστολή της έκφρασης του *CYP2E1* (Konstandi et al., 2008a). Στο **Σχήμα 21**, παρουσιάζεται συνοπτικά η δράση των D₂-ντοπαμινεργικών αγωνιστών και ανταγωνιστών και ο τρόπος με τον οποίο ρυθμίζουν αυτοί τα επίπεδα ινσουλίνης και την έκφραση του κυτοχρώματος *CYP2E1*.



Σχήμα 21: Συνοπτική απεικόνιση του ρόλου των D₂-ντοπαμινεργικών υποδοχέων του παγκρέατος στη ρύθμιση της έκφρασης του *CYP2E1* στο ήπαρ. Διέγερση των D₂-ντοπαμινεργικών υποδοχέων προκαλεί καταστολή της έκκρισης ινσουλίνης και αυτή συμβάλλει στην αύξηση της έκφρασης του *CYP2E1*. Αντιθέτως, αναστολή των υποδοχέων αυτών (π.χ. με σουλπιρίδη), αυξάνει την έκκριση ινσουλίνης με συνεπακόλουθη μείωση της έκφρασης του *CYP2E1* (Konstandi et al., 2008a).

Ο ακριβής τρόπος με τον οποίο οι D₂-ντοπαμινεργικοί υποδοχείς ρυθμίζουν την έκκριση ινσουλίνης και ακολούθως και την έκφραση του *CYP2E1* (και πιθανώς και άλλων κυτοχρωμάτων *CYPs*) δεν είναι ξεκάθαρος. Οι κεντρικές κατεχολαμίνες (DA, NE) ως γνωστόν ασκούν έμμεση δράση στον υποθάλαμο, επηρεάζοντας την παραγωγή και έκκριση διαφόρων παραγόντων, όπως είναι ο εκλυτικός παράγοντας της αυξητικής ορμόνης (GHRH) και ο εκλυτικός παράγοντας της θυρεοειδοτρόπου ορμόνης (TRH) (Tuomisto and Mannisto, 1985), (Chen et al., 1999), (Konstandi et al., 2008a). Η αυξητική (GH) και οι θυρεοειδικές ορμόνες (T₃, T₄) που ελευθερώνονται υπό την

επήρεια των ανωτέρω ορμονών, σχετίζονται με την μείωση της έκφρασης του *CYP2E1* (Yamazoe et al., 1987), (Waxman et al., 1989), (Gonzalez et al., 1991), (Peng and Coon, 1998), (Chen et al., 1999), (Holloway et al., 2006), (Waxman and O'Connor, 2006), (Konstandi et al., 2008a). Ένας άλλος τρόπος ρύθμισης, πιθανόν να είναι μέσω του μονοπατιού PI3K/Akt, η διερεύνηση του οποίου είναι μέρος της παρούσας μελέτης.

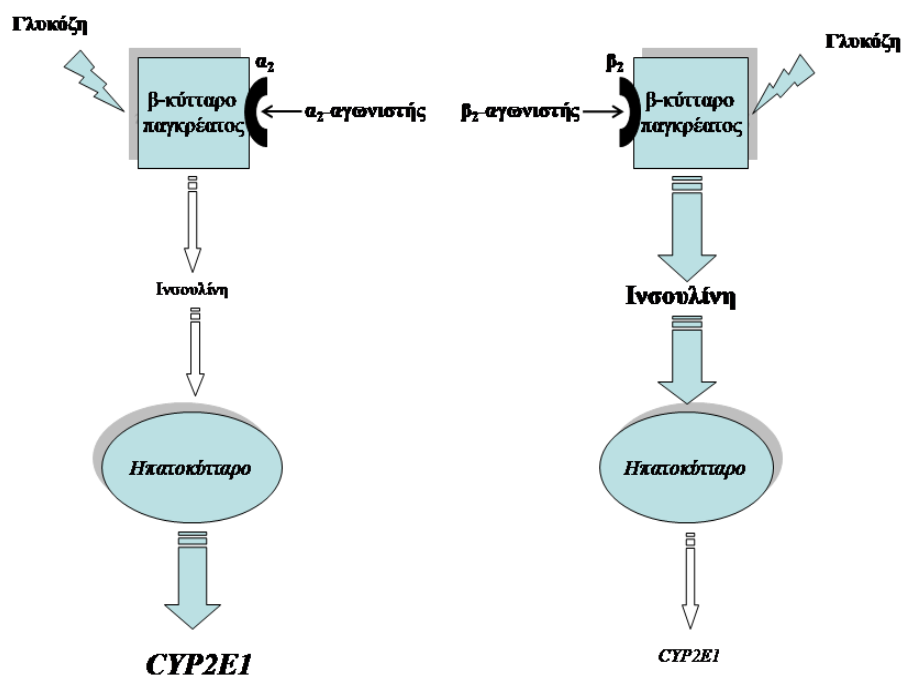
3.5.7. Ινσουλίνη και ο ρόλος των α_2 -αδρενεργικών υποδοχέων στη ρύθμιση των *CYPs*

Πέρα από τους D_2 -ντοπαμινεργικούς υποδοχείς, τα β -παγκρεατικά κύτταρα διαθέτουν και αδρενεργικούς (α_2 - και β_2 -) υποδοχείς, οι οποίοι παίζουν εξίσου σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της ινσουλίνης. Διέγερση των παγκρεατικών α_2 -υποδοχέων και πιο συγκεκριμένα των α_{2A} -υποδοχέων (Niddam et al., 1990), αναστέλλει την έκκριση ινσουλίνης, ενώ αντιθέτως, οι παγκρεατικοί β_2 -αδρενοϋποδοχείς διεγείρουν την έκκρισή της (El-Mansoury and Morgan, 1998), (Konstandi et al., 2008a).

Η κατασταλτική δράση της επινεφρίνης (EPI) και της νορεπινεφρίνης (NE) στην έκκριση ινσουλίνης έχει διαπιστωθεί εδώ και πολλές δεκαετίες (Porte, 1967), (Renstrom et al., 1996). Η NE σε χαμηλές δόσεις ενεργοποιεί τους β -αδρενεργικούς υποδοχείς του παγκρέατος και οδηγεί σε αύξηση της έκκρισης ινσουλίνης από τα β -κύτταρα. Αντιθέτως, όταν η NE βρίσκεται σε υψηλές συγκεντρώσεις, διεγείρει τους α_{2A} -αδρενεργικούς υποδοχείς, γεγονός που οδηγεί σε αναστολή της έκκρισης της ινσουλίνης. Μάλιστα, έρευνες έδειξαν ότι αυξημένα επίπεδα NE, σχετίζονται με μειωμένη έκκριση ινσουλίνης (Adeghate et al., 2001), ενώ έρευνες με απομονωμένα ανθρώπινα νησίδια του παγκρέατος από διαβητικούς ασθενείς, έδειξαν ότι οι α_{2A} -αδρενοϋποδοχείς ήταν ενεργοποιημένοι και πιθανόν να ήταν, έστω εν μέρει, υπεύθυνοι για τα χαμηλά επίπεδα της ινσουλίνης (Lacey et al., 1993).

Όπως προαναφέρθηκε και νωρίτερα, το ΚΝΣ και οι ορμόνες που εκκρίνονται από διάφορες μοίρες του, ρυθμίζουν την ηπατική έκφραση των κυτοχρωμάτων *CYPs*. Οι κεντρικές και περιφερικές κατεχολαμίνες (DA, NE, EPI) που εκλύονται εις απάντηση διαφόρων ερεθισμάτων, παίζουν ρυθμιστικό ρόλο, τόσο για την έκκριση ινσουλίνης, όσο και για τον έλεγχο της έκφρασης των *CYPs*. Διέγερση των α_2 -αδρενοϋποδοχέων υποδοχέων στο πάγκρεας από τις περιφερικές κατεχολαμίνες, αναστέλλει την έκκριση της ινσουλίνης, με αποτέλεσμα την αύξηση της έκφρασης του *CYP2E1*. Αντίθετα, οι β_2 -

αδρενεργικοί υποδοχείς διεγείρουν την έκκριση της ινσουλίνης, με αποτέλεσμα τη μείωση της έκφρασης του *CYP2E1* (El-Mansoury and Morgan, 1998), (Konstandi et al., 2008a) (βλ. Σχήμα 22). Οι κεντρικές κατεχολαμίνες, κυρίως η NE, δρουν όπως και η DA στον υποθάλαμο και επηρεάζουν την έκλυση των GHRH και TRH, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση GH και θυρεοειδικών ορμονών, οι οποίες καταστέλλουν την έκφραση ορισμένων *CYPs* (βλ. υποκεφάλαιο 3.4.1.). Έτσι, οι κεντρικές και περιφερικές κατεχολαμίνες έχουν αντίθετα αποτελέσματα, διατηρώντας το σύστημα σε ισορροπία. Εξάλλου, σημαντικό ρόλο παίζουν και οι αδρενεργικοί υποδοχείς, που βρίσκονται στην μεμβράνη των ηπατοκυττάρων. Οι α_2 -αδρενεργικοί υποδοχείς του ήπατος αναστέλλουν την έκφραση του *CYP2E1*, ενώ οι α_1 - και οι β -αδρενοϋποδοχείς επάγουν την έκφραση της ισομορφής αυτής (Daunt et al., 1997), (Konstandi et al., 2008a).



Σχήμα 22: Συνοπτική απεικόνιση του ρόλου των α_2 - και β_2 -αδρενεργικών υποδοχέων υποδοχέων του παγκρέατος, στη ρύθμιση της έκφρασης του *CYP2E1* στο ήπαρ. Διέγερση των α_2 -αδρενεργικών υποδοχέων καταστέλλει της έκκρισης ινσουλίνης και αυτή συμβάλλει στην αύξηση της έκφρασης του *CYP2E1*. Αντιθέτως, διέγερση των β_2 -αδρενεργικών υποδοχέων, αυξάνει την έκκριση ινσουλίνης, με επακόλουθη μείωση της έκφρασης του *CYP2E1* (Konstandi et al., 2008a).

Για τον μηχανισμό δράσης των κατεχολαμινών NE και EPI στη ρύθμιση της ινσουλίνης και της έκφρασης των *CYPs* κατ' επέκταση, έχουν διατυπωθεί διάφορες θεωρίες. Ο Nakaki και οι συνεργάτες του εξέφρασαν την άποψη, ότι τα παγκρεατικά β-κύτταρα του επίμυ διαθέτουν α_2 -αδρενουποδοχείς και αυτοί ελέγχουν την έκκριση της ινσουλίνης μέσω του cAMP. Ειδικότερα, χρησιμοποιώντας κλονιδίνη (αγωνιστή των α_2 -υποδοχέων), προκλήθηκε μείωση της παρουσίας του cAMP στα β-κύτταρα, με αποτέλεσμα την ελάττωση της έκκρισης της ινσουλίνης (Nakaki et al., 1983). Ο Lorenz και οι συνεργάτες του υποστήριξαν ότι ο έλεγχος της έκκρισης της ινσουλίνης από την EPI, γίνεται μέσω την ρύθμισης των επιπέδων Ca^{+2} (Lorenz et al., 1979). Παρ' όλα αυτά, ο ακριβής μηχανισμός δράσης των α_2 -αδρενεργικών υποδοχέων στη ρύθμιση των επιπέδων της ινσουλίνης αλλά και στη ρύθμιση της έκφρασης του *CYP2E1* παραμένει ακόμη ασαφής.

3.6. Μονοπάτι των MAPK

Οι πρωτεϊνικές κινάσες που ενεργοποιούνται από μιτογόνα ερεθίσματα (mitogen-activated protein kinases ή MAP κινάσες) είναι κινάσες σερίνης/θρεονίνης (Ser/Thr), οι οποίες συνδέουν μεμβρανικούς υποδοχείς με ρυθμιστικούς παράγοντες μέσα στο κύτταρο, ενώ παράλληλα απαντούν σε διάφορα ερεθίσματα χημικής ή φυσικής προέλευσης, τα οποία είναι σημαντικά για την κυτταρική ομοιόσταση (Cargnello and Roux, 2011). Οι MAPK είναι από τα πιο αρχέγονα μονοπάτια μεταβίβασης ερεθισμάτων και διαδραματίζουν καίριο ρόλο σε πλήθος φυσιολογικές λειτουργίες, όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, ο μεταβολισμός, η επιδιόρθωση βλαβών στο DNA, ο κυτταρικός θάνατος κ.α. (Karin and Gallagher, 2005). Οι MAPK παίρνουν μέρος σε πολύπλοκα συστήματα ελέγχου, που περιλαμβάνουν τις MAP κινάσες (MAPK), τις κινάσες των MAPK (MAPKK, MKK ή MEK) και τις κινάσες των MAPKK (MAPKKK ή MEKK) (Cargnello and Roux, 2011).

Στα θηλαστικά έχουν αναγνωριστεί 14 διαφορετικές MAPK και αυτές χωρίζονται σε δύο υποκατηγορίες, τις συμβατικές και τις άτυπες MAPK. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν: α) οι ERK (extracellular signal-related kinases) με δύο μέλη (ERK1/2), β) η ERK5, γ) οι JNK (c-Jun amino-terminal kinases) με 3 μέλη (JNK1/2/3)

και δ) οι πρωτεΐνες p38 (-α, -β, -γ και -δ). Η δεύτερη κατηγορία των άτυπων MAPK περιλαμβάνει τις ERK3/4, ERK7/8 και την NLK (nemo-like kinase) (Cargnello and Roux, 2011). Οι ERK1/2 ενεργοποιούνται από τις MAPKK, MEK1/2, η ERK5 από την MEK5, οι JNK από τις MKK4/7 (ή JNKK1/2) και τέλος οι p38 από τις MKK3/6 (Chang and Karin, 2001). Οι MAPKK, που ενεργοποιούν τις ανωτέρω MAPK, ενεργοποιούνται με τη σειρά τους από διάφορες MAPKK κινάσες και το γεγονός ότι κάθε MAPKK μπορεί να ενεργοποιηθεί από περισσότερες της μιας MAPKKK, αυξάνει την πολυπλοκότητα του συστήματος (Cargnello and Roux, 2011).

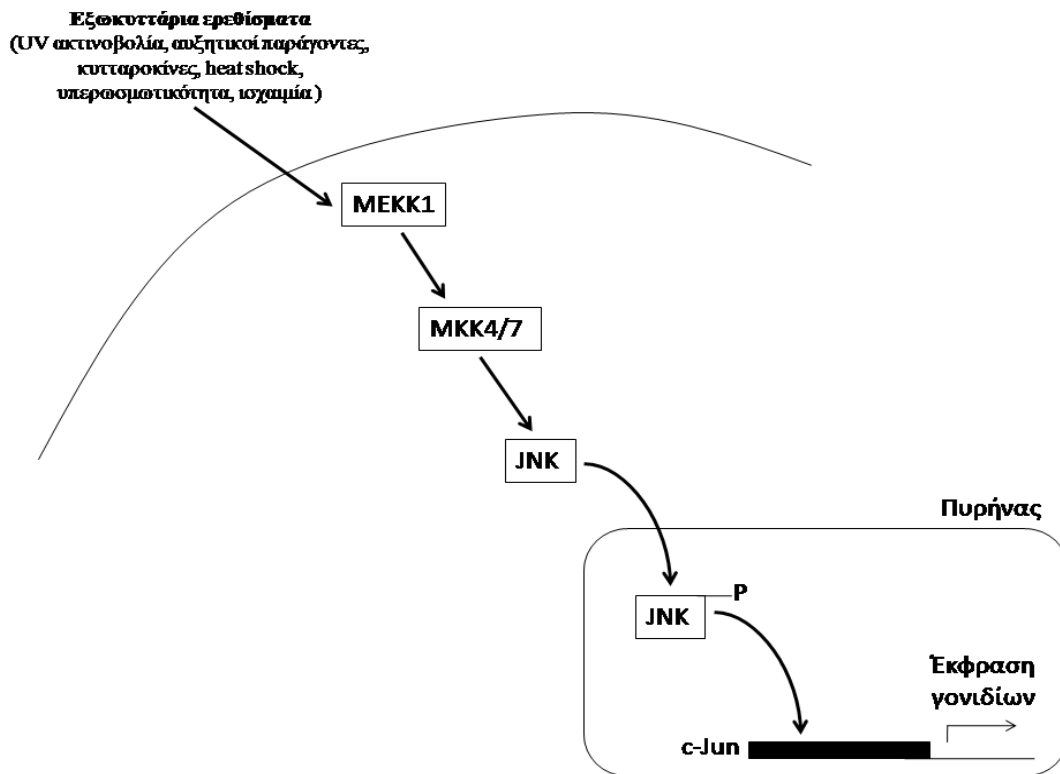
Αφού ενεργοποιηθούν, οι MAPK αναγνωρίζουν τα υποστρώματά τους, τα οποία διαθέτουν σημεία αποδοχής της φωσφορικής ομάδας (phospho-acceptor sites). Τα σημεία αποδοχής της φωσφορικής ομάδας αποτελούνται από τα αμινοξέα σερίνη ή θρεονίνη και ακολούθως προλίνη, ενώ η σύνδεση της MARK με το υπόστρωμα ολοκληρώνεται με την σύνδεση της πρώτης σε ένα άλλο σημείο πρόσδεσης του υποστρώματος (docking site) (Chang and Karin, 2001).

3.6.1. JNK

Οι JNK αποτελούν πιθανώς, τις πιο σημαντικές MAPK και γι' αυτό αποτέλεσαν αντικείμενο της παρούσας μελέτης. Οι JNK ενεργοποιούνται κυρίως από στρεσογόνα ερεθίσματα που δέχεται το κύτταρο και γι' αυτό ονομάζονται και "ενεργοποιούμενες από το στρες πρωτεϊνικές κινάσες" (stress-activated protein kinases ή SAPK) (Nishina et al., 2004). Η έκφραση των JNK ελέγχεται από 3 γονίδια, τα *JNK1*, *JNK2* και *JNK3*. Τα *JNK1/2* εκφράζονται σε όλους τους ιστούς, ενώ το *JNK3* φαίνεται να εκφράζεται, ως επί το πλείστον, στους όρχεις και τον εγκέφαλο. Η έκφραση των *JNK* είναι δυνατόν να ενισχυθεί από μια πληθώρα εξωκυττάριων ερεθισμάτων, όπως είναι οι αυξητικοί παράγοντες, οι κυτοκίνες, το heat shock, η υπερωσμωτικότητα, η UV-ακτινοβολία και η ισχαιμία (Barr and Bogoyevitch, 2001).

Η φωσφορυλίωση της JNK από τις MAPKK (MKK4/5), στις θέσεις Thr και Tyr, οδηγεί στην ενεργοποίηση της JNK και την μετατόπισή της στον πυρήνα. Εκεί, οι JNK φωσφορυλιώνουν διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες, όπως είναι το c-Jun από το οποίο παίρνουν το όνομά τους, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη μεταγραφική δραστηριότητά του (Whitmarsh and Davis, 1996) (βλ. Σχήμα 23). Η

έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα c-Jun, έχει τεράστια σημασία στην ανάπτυξη όγκων, αλλά και σε βασικές λειτουργίες του κυττάρου, όπως είναι ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η διαφοροποίηση (Barr and Bogoyevitch, 2001) και πιθανόν να ενέχεται στη ρύθμιση γονιδίων, τα οποία εκφράζουν κυτοχρώματα *CYPs*.



Σχήμα 23: Ο μηχανισμός ενεργοποίησης της JNK και η επίδρασή της στην έκφραση γονιδίων μέσω του c-Jun. Διάφορα ερεθίσματα με εξωκυττάρια προέλευση, ενεργοποιούν την MAPRKKK, MEKK1. Αυτή φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την αντίστοιχη MAPKK, MKK4/7, η οποία με τη σειρά της φωσφορυλιώνει την MAPK, JNK. Η φωσφορυλιωμένη JNK μετατοπίζεται στον πυρήνα, όπου φωσφορυλιώνει το c-Jun, με αποτέλεσμα να ενεργοποιείται η μεταγραφή διαφόρων γονιδίων (Chang and Karin, 2001).

Πρόσφατες μελέτες έχουν καταδείξει τον ρόλο των JNK μονοπατιών στη ρύθμιση διαφόρων κυτοχρωμάτων *CYP*. Η 1,25-διϋδροξυ-βιταμίνη D3 (ή καλσιτριόλη), είναι γνωστό ότι επάγει την έκφραση του *CYP3A4* στα κύτταρα Caco-2. Ο αποκλεισμός

της JNK από τον ειδικό αναστολέα SP600125 ή την κουρκουμίνη (αναστολέα του μονοπατιού της JNK) οδηγεί στην αναστολή της επαγωγής του *CYP3A4* από την 1,25-διυδροξυβιταμίνη D3. Παρόμοια αναστολή δεν παρατηρείται με τον αναστολέα του μονοπατιού της ERK, PD098059 ή τον αναστολέα της p38, SB203580 (Yasunami et al., 2004). Επίσης, το μονοπάτι της JNK φαίνεται να διαδραματίζει σημαίνοντα ρόλο και στη ρύθμιση των κυτοχρωμάτων της υποοικογένειας CYP2B και συγκεκριμένα της ισομορφής CYP2B1. Η φαινοβαρβιτάλη ως γνωστόν αποτελεί ισχυρό επαγωγέα της έκφρασης του *CYP2B1* σε καλλιέργειες πρωτογενών ηπατοκυττάρων. Το εικοσιδυεξαενοϊκό οξύ (Docosahexaenoic acid ή DHA), μειώνει την επαγωγή του *CYP2B1* από τη φαινοβαρβιτάλη και αυτό γίνεται με την μεσολάβηση του μονοπατιού της JNK, αλλά όχι των μονοπατιών της ERK και p38 (Lu et al., 2009). Τα κυτοχρώματα CYP1A1/2 επίσης, φαίνεται να επηρεάζονται από το μονοπάτι των JNK. Η έκθεση ανθρώπινων ηπατοκυττάρων στον ειδικό JNK αναστολέα, SP600125, επηρέασε τους υποδοχείς AhR με άμεσο αποτέλεσμα την επαγωγή των γονιδίων *CYP1A1* και *CYP1A2* (Dvorak et al., 2008). Τέλος, το μονοπάτι της JNK έχει ενεργό ρόλο και στη ρύθμιση του κυτοχρώματος CYP2E1. Το CYP2E1 σχετίζεται με το μεταβολισμό διαφόρων φαρμάκων αλλά και την ηπατοτοξικότητα μετά από χρόνια κατάχρηση αλκοόλ. Ποντίκια που υπερεξέφραζαν το γονίδιο *Cyp2e1* και έλαβαν μεγάλες ποσότητες αλκοόλης, παρουσίασαν λιπώδες ήπαρ και αυτό φάνηκε να σχετίζεται με αυξημένη ενεργοποίηση του μονοπατιού JNK. Αντίθετα, knockout ποντίκια για το *Cyp2e1* δεν παρουσίασαν ηπατοτοξικότητα και αυτό πιθανόν, να οφείλεται σε μειωμένη ενεργοποίηση του μονοπατιού JNK (Cederbaum, 2010).

3.7. Μονοπάτι cAMP/PKA

Το κυκλικό AMP (3'-5'-κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη ή cAMP) είναι από τους σημαντικότερους δευτερογενείς αγγελιοφόρους (secondary messengers) και διαδραματίζει καίριο ρόλο στην μεταγωγή σημάτων, ρυθμίζοντας ζωτικές λειτουργίες του κυττάρου (Dremier et al., 2003). Οι τρεις βασικοί παράγοντες που ενεργοποιούνται από το cAMP είναι η πρωτεϊνική κινάση A (PKA), η exchange protein activated by cAMP (ή EPAC) και οι διάλυτοι κατιόντων, που σχετίζονται με το κυκλικό νουκλεοτίδιο (cyclic nucleotide-gated ion channels ή CNGCs). Η PKA όμως είναι ο πιο σημαντικός

παράγοντας που λαμβάνει μέρος στις μεταγωγή σήματος μέσω cAMP. Η PKA θεωρείται ότι έχει τεράστια σημασία για την ρύθμιση των ενδοκυττάρων επιπέδων Ca^{+2} , την ρύθμιση διαφόρων άλλων πρωτεϊνικών κινασών, τον έλεγχο της μεταγραφής κ.α. Το cAMP ελέγχει τη μεταγραφή και την έκφραση γονιδίων μέσω του cAMP response element modulator (CREM), της αντίστοιχης πρωτεΐνης, η οποία ονομάζεται cAMP response element-binding protein (CREB) και του ενεργοποιητικού μεταγραφικού παράγοντα 1 (activating transcription factor 1 ή ATF1). Αυτά τα τρία μέρη του συστήματος μπορούν να φωσφορυλιωθούν από την PKA (Murray, 2008).

Όταν τα επίπεδα του cAMP είναι χαμηλά, η PKA είναι ουσιαστικά ένα ανενεργό τετραμερές το οποίο αποτελείται από δύο ρυθμιστικές και δύο καταλυτικές υπομονάδες. Οι ρυθμιστικές υπομονάδες διαθέτουν τις θέσεις πάνω στις οποίες προσδέεται το cAMP. Σε περίπτωση που τα επίπεδα του cAMP αυξηθούν, τα τέσσερα μόρια cAMP συνδέονται στις θέσεις πρόσδεσης και το μόριο της PKA διασπάται σε δύο τμήματα, αυτό με τις δύο καταλυτικές μονάδες και αυτό με τις δύο ρυθμιστικές μονάδες. Οι καταλυτικές υπομονάδες τότε προσδέονται σε ένα μόριο ATP, ενεργοποιούνται, εισέρχονται στον πυρήνα και είναι δυνατόν να φωσφορυλιώσουν τα υποστρώματά τους, επηρεάζοντας την μεταγραφή γονιδίων (Murray, 2008). Η δραστηριότητα της PKA συνδέεται στενά με τα επίπεδα του cAMP στο κύτταρο. Πληθώρα παραγόντων, όπως είναι τα επίπεδα κάποιων ορμονών (EPI, γλυκαγόνη), αλλά και διάφορα ξενοβιοτικά, μπορούν να επηρεάσουν τα επίπεδα του κυτταρικού cAMP και επομένως, και τη δραστηριότητα της PKA (Oesch-Bartlomowicz and Oesch, 2003). Τέτοια παραδείγματα ξενοβιοτικών είναι φάρμακα που δρουν στους α_2 - και β -αδρενεργικούς υποδοχείς (Docherty, 1998), (Johnson, 1998), καθώς και οι αναστολείς της φωσφοδιεστεράσης (PDE inhibitors) (Boswell-Smith et al., 2006).

Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η φωσφορυλίωση ορισμένων κυτοχρωμάτων CYP από την PKA, είναι δυνατόν να επηρεάσει την λειτουργικότητα των πρώτων. Φωσφορυλίωση των CYP2B και CYP2E από την PKA οδηγεί σε ταχύτερη απώλεια της ενζυμικής λειτουργικότητας των κυτοχρωμάτων και το σημείο στο οποίο γίνεται η φωσφορυλίωση φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο, αφού αυτό είναι διαφορετικό για κάθε υποοικογένεια π.χ Ser¹²⁸ για τα κυτοχρώματα CYP2B και Ser¹²⁹ για την ισομορφή CYP2E1 (Oesch-Bartlomowicz and Oesch, 2003). Η φωσφορυλίωση του κυτοχρώματος CYP3A1 από την PKA γίνεται στη θέση Ser³⁹³ και οδηγεί επίσης, στην απενεργοποίηση της ισομορφής αυτής (Eliasson et al., 1994). Επιπροσθέτως, ως

γνωστόν η φαινοβαρβιτάλη επάγει την έκφραση των *CYP3A1/2* και *CYP2B1/2*. Η ενεργοποίηση του συστήματος της cAMP/PKA φαίνεται να αναστέλλει την επαγωγή των επιπέδων mRNA των *CYP3A1/2* και *CYP2B1/2*, αν και η αναστολή αυτή ίσως να οφείλεται και σε άλλους παράγοντες πλην της PKA, όπως π.χ. τις MAPK, ERK1/2, τις φωσφατάσες PP1, PP2A και PP2B, καθώς και την εξαρτημένη από το Ca⁺² καλμοδουλινική κινάση II (Ca⁺²-dependant Calmodulin kinase II) (Joannard et al., 2000).

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Είναι γνωστό ότι τα ηπατικά κυτοχρώματα CYPs αποτελούν τους βασικούς παράγοντες μεταβολισμού πληθώρας ξενοβιοτικών ουσιών. Στις ξενοβιοτικές ουσίες περιλαμβάνονται διάφορα φάρμακα (συνταγογραφούμενα ή μη), τοξικές ουσίες, εντομοκτόνα, φυτοφάρμακα, ζιζανιοκτόνα, περιβαλλοντικοί ρύποι, συντηρητικά τροφών και καλλυντικών, καθώς και διάφοροι προκαρκινογόνοι και καρκινογόνοι παράγοντες. Τεράστιος αριθμός παραγόντων (συγχορηγούμενα φάρμακα, στρες, νοσήματα κτλ) είναι δυνατόν να επηρεάσουν την έκφραση των κυτοχρωμάτων αυτών και επομένως, να προκαλέσουν μεταβολές στη μεταβολική ικανότητα του οργανισμού, με άμεσες και σε ορισμένες περιπτώσεις δραματικές συνέπειες για την αποτελεσματικότητα της φαρμακοθεραπείας αλλά και την τοξικότητα των συνταγογραφούμενων φαρμάκων. Αυτοί οι παράγοντες μπορούν επίσης, να επηρεάσουν την ικανότητα ορισμένων προκαρκινογόνων να προκαλέσουν όγκους ή να πυροδοτήσουν μεταστάσεις. Ως εκ τούτου, η γνώση των παραγόντων που μεταβάλλουν την έκφραση των κυτοχρωμάτων CYPs είναι υψίστης σημασίας.

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η επίδραση του ψυχολογικού stress και των συστημάτων του στο ηπατικό μεταβολικό προφίλ επιμύων, με στόχο να εξαχθούν χρήσιμες πληροφορίες, που θα μπορούσαν να αποτελέσουν την βάση για τον αποτελεσματικότερο σχεδιασμό και την αξιολόγηση ανάλογων κλινικών μελετών αλλά και την κλινική πρακτική εν γένει. Προηγούμενες μελέτες της ομάδας μας έδειξαν ότι το στρες τροποποιεί την ρύθμιση ορισμένων κυτοχρωμάτων, συμπεριλαμβανομένων των CYP1A1/2, CYP2B1/2 και CYP2E1. Φαρμακολογικοί χειρισμοί κατεχολαμινεργικών συστημάτων κατέδειξαν τον καθοριστικό τους ρόλο στην ρύθμιση των κυτοχρωμάτων που προαναφέρθηκαν. Τα πιο σημαντικά κυτοχρώματα για το μεταβολισμό των συχνότερα συνταγογραφούμενων φαρμάκων είναι εκείνα που ανήκουν στις υποοικογένειες CYP3A, CYP2C και CYP2D. Θεωρήθηκε λοιπόν, επιτακτική ανάγκη να διερευνηθεί ο ρόλος του στρες στην ρύθμιση των βασικών ισομορφών αυτών των κυτοχρωμάτων, που εκφράζονται στον επίμυ, δηλαδή των CYP3A1/2, CYP2C11 και CYP2D1/2. Για την ακριβέστερη προσέγγιση των ερωτημάτων υπό διερεύνηση, σχεδιάστηκαν διάφορα πειράματα, τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*, και μελετήθηκαν οι κάτωθι παράμετροι:

α) *In vivo* διερεύνηση του ρόλου του ψυχολογικού στρες, καθώς και της σημασίας του ΥΥΕ άξονα στην έκφραση των CYPs.

β) *In vivo* και *in vitro* αξιολόγηση του ρόλου των γλυκοκορτικοειδών στο ηπατικό μεταβολικό προφίλ.

γ) *In vivo* και *in vitro* αξιολόγηση του ρόλου των αδρενεργικών και D₂-ντοπαμινεργικών συστημάτων στην έκφραση των CYPs.

δ) *In vivo* και *in vitro* διερεύνηση του ρόλου καθοριστικών μονοπατιών μεταγωγής σήματος (π.χ. PI3K/Akt, FoxO1, STAT5b, cAMP/PKA, JNK) για την έκφραση των υπό μελέτην CYPs.

ε) *In vivo* διερεύνηση της επίδρασης του στρες, των αδρενεργικών και των D₂-ντοπαμινεργικών οδών, στην ρύθμιση των βασικών πυρηνικών μεταγραφικών παραγόντων (CAR, PXR, RXR, HNF), με καθοριστικό ρόλο στην ρύθμιση των υπό μελέτην CYPs.

στ) Μελέτη της πιθανής συμμετοχής ορμονών στις μεταβολές που παρατηρούνται στην έκφραση των CYPs.

Συνοπτικά, θα μπορούσαμε να πούμε ότι η παρούσα μελέτη είχε σαν στόχο να συνεισφέρει στην βασική γνώση σχετικά με τους μηχανισμούς ρύθμισης της έκφρασης των πιο σημαντικών κυτοχρωμάτων *CYP3A1/2*, *CYP2C11* και *CYP2D1/2*, που μεταβολίζουν την πλειονότητα των συνταγογραφούμενων φαρμάκων. Είχε σαν στόχο επίσης, να διερευνήσει τον μηχανισμό μέσω του οποίου διάφορες μορφές ψυχολογικού στρες, καθώς και ο ΥΥΕ άξονας, ρυθμίζουν την έκφραση των CYPs. Επίσης, η μελέτη αυτή είχε σαν σκοπό να εμβαθύνει στο ρόλο των αδρενεργικών και D₂-ντοπαμινεργικών μονοπατιών και να συμβάλει στην βαθύτερη κατανόηση των μοριακών μηχανισμών και των μονοπατιών μεταγωγής σήματος (PI3K/Akt/FoxO1, GH/STAT5b, cAMP/PKA, JNK κ.α.), που διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση της μεταγραφής των προαναφερθέντων CYPs. Η μελέτη αυτή επίσης, στόχευσε στη διερεύνηση του ρόλου πολύ σημαντικών πυρηνικών υποδοχέων (CAR, PXR, RXR, HNF), οι οποίοι είναι καλά εδραιωμένο ότι εμπλέκονται στην ρύθμιση των ανωτέρω CYPs. Τέλος, διερευνήθηκε η πιθανή εμπλοκή της ινσουλίνης, της αυξητικής ορμόνης, της προλακτίνης και των θυρεοειδικών ορμονών στην ρύθμιση της έκφρασης των *CYP3A1/2*, *CYP2C11* και *CYP2D1/2*.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Πειραματόζωα

Για τα πειραματικά πρωτόκολλα (τόσο *in vivo* όσο και *in vitro* - βλ. υποκεφάλαιο "Απομόνωση και Καλλιέργεια Πρωτογενών Ηπατοκυττάρων από ήπαρ επίμυος") που παρουσιάζονται σε αυτή τη μελέτη, χρησιμοποιήθηκαν αποκλειστικά επίμυες (*rattus norvegicus*) Wistar (Εικόνες 1, 2). Η αναπαραγωγή και απόκτηση των επίμυων έγινε στο Εκτροφείο του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Οι επίμυες, σε ομάδες των 3-4 ατόμων, παρέμεναν σε ειδικούς κλωβούς (πλεξιγκλάς) διαστάσεων 42.5 x 26.6 x 15.5 cm, με στρώση από ροκανίδι αποστειρωμένο. Η θερμοκρασία του χώρου όπου ήταν τοποθετημένοι οι κλωβοί ήταν σταθερή ($21 \pm 1^\circ \text{C}$). Υπήρχε σταθερός κύκλος φωτός - σκότους 12 ωρών (07.00 π.μ.-19.00 μ.μ. φως, 19.00 μ.μ.-07.00 π.μ. σκοτάδι), ενώ οι επίμυες είχαν ελεύθερη πρόσβαση (*ad libitum*) σε νερό και τυποποιημένη τροφή καθορισμένης σύστασης (Biozoe, Ελλάς). Τα πειραματόζωα κατά την εκτέλεση των πειραμάτων είχαν ηλικία 2.5 έως 3 μηνών, ενώ το βάρος τους κυμαίνονταν μεταξύ 250 και 300g.



Εικόνα 1: Άρσενικοί επίμυες Wistar (Κυο/Ιο/rr).

Όλοι οι χειρισμοί (φαρμακολογικοί ή μη) των πειραματόζωων, σε όλα τα πειραματικά στάδια, έγιναν σύμφωνα με τον κώδικα δεοντολογίας του Εθνικού

Ινστιτούτου Υγείας των ΗΠΑ (NIH Publications No. 80-23, 1996) και τις Ευρωπαϊκές οδηγίες για τη φροντίδα και τη χρησιμοποίηση των πειραματόζωων (EEC Council 86/609, No 116, 1992). Καταβλήθηκε κάθε δυνατή προσπάθεια ώστε να ελαχιστοποιηθεί κάθε ταλαιπωρία και επώδυνη κατάσταση για τα πειραματόζωα.



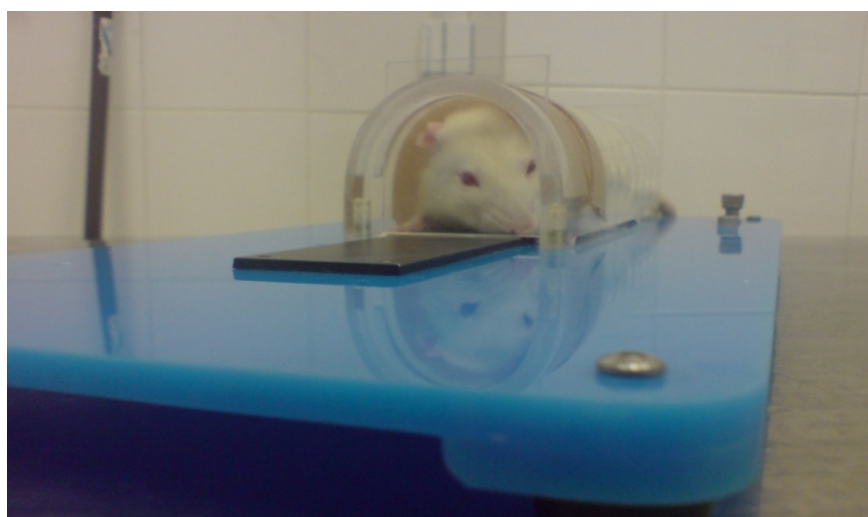
Εικόνα 2: Αρσενικός επίμυς Wistar (Kuo/Io/rr).

2. Πειραματικά μοντέλα πρόκλησης στρες

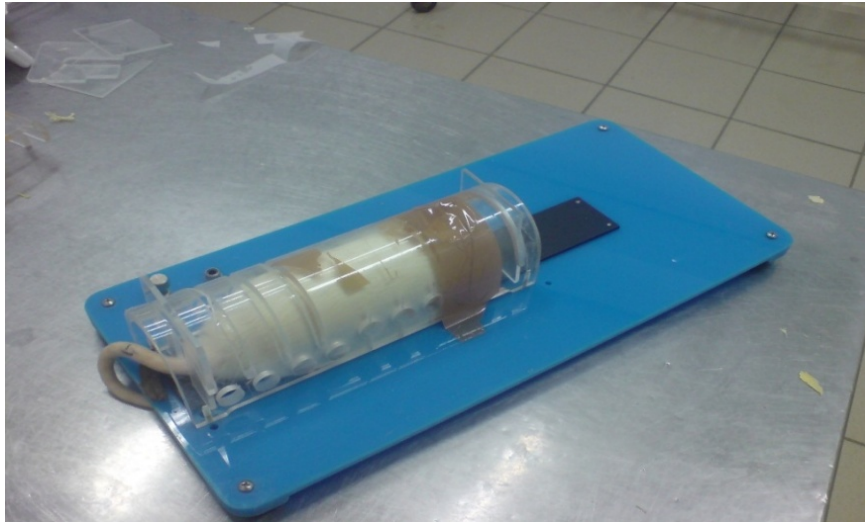
2.1. Στρες Περιορισμού (Restraint Stress - RS)

Τα πειραματόζωα εκτέθηκαν στο RS για 60 λεπτά (μεταξύ 9.00 και 11.00 π.μ.) για τέσσερις συνεχόμενες ημέρες σε ένα απομονωμένο δωμάτιο (Harbuz and Lightman, 1989), ώστε να μην επηρεαστούν τα πειραματόζωα από άλλους παράγοντες (θορύβους, οσμές, ανθρώπινη παρουσία κ.τ.λ.). Καθ' όλη την διάρκεια του πειράματος, τα πειραματόζωα βρίσκονταν υπό περιορισμό, μέσα σε μικρές συραγγοειδείς μονάδες (φτιαγμένες από ακρυλικό, διαστάσεις 5×15 cm, Physiograph MKIII, Narco Bio System, Austin, TX, USA), χωρίς την δυνατότητα να μετακινηθούν, να στρέψουν την κεφαλή τους, να προσλάβουν τροφή και νερό. Τα πειραματόζωα είχαν επαρκή παροχή αέρα μέσα στις συραγγοειδείς μονάδες και δεν υπέστησαν πόνο ή πίεση όσο βρίσκονταν υπό περιορισμό (βλ. **Εικόνες 3 και 4**).

Αμέσως μετά το τέλος του περιορισμού, τα πειραματόζωα επέστρεφαν στα κλουβιά τους (3-4 πειραματόζωα ανά κλουβί). Τα πειραματόζωα, τα οποία δεν εκτέθηκαν στο RS (μάρτυρες, 6 πειραματόζωα) παρέμειναν καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος στα κλουβιά τους, αλλά η τροφή και το νερό αφαιρέθηκαν, ώστε να βρίσκονται υπό τις ίδιες συνθήκες με τα RS πειραματόζωα (stress group, 6 πειραματόζωα). Την 4η ημέρα του πειράματος, όλα τα πειραματόζωα θυσιάστηκαν 60 λεπτά μετά το τέλος της διαδικασίας του στρες.



Εικόνα 3: Έκθεση πειραματοζώου σε RS μέσα σε συραγγοειδή μονάδα.



Εικόνα 4: Έκθεση πειραματοζώου σε RS μέσα σε συραγγοειδή μονάδα.

2.2. Στρες Μητρικής Αποστέρησης (Maternal Deprivation Stress - MDS)

2.2.1. Διαδικασία Αναπαραγωγής

Η αναπαραγωγή των επιμύων άρχιζε σε ηλικία περίπου 2.5 με 3 μηνών και σε κάθε κλωβό τοποθετούνταν ένας αρσενικός με δύο θηλυκούς επίμυες. Οι θηλυκοί επίμυες ελέγχονταν καθημερινά για ενδείξεις εγκυμοσύνης και όταν αυτό επιβεβαιώνονταν, τα αρσενικά απομακρύνονταν από τους κλωβούς. Μετά από 21 ημέρες περίπου (φυσιολογική διάρκεια εγκυμοσύνης στον *rattus norvegicus*), τα θηλυκά ελέγχονταν δύο φορές ημερησίως για την καταγραφή των γεννήσεων. Η ημερομηνία γέννησης του κάθε πειραματοζώου καταγράφονταν ως "postnatal day" 0 (pnd 0).

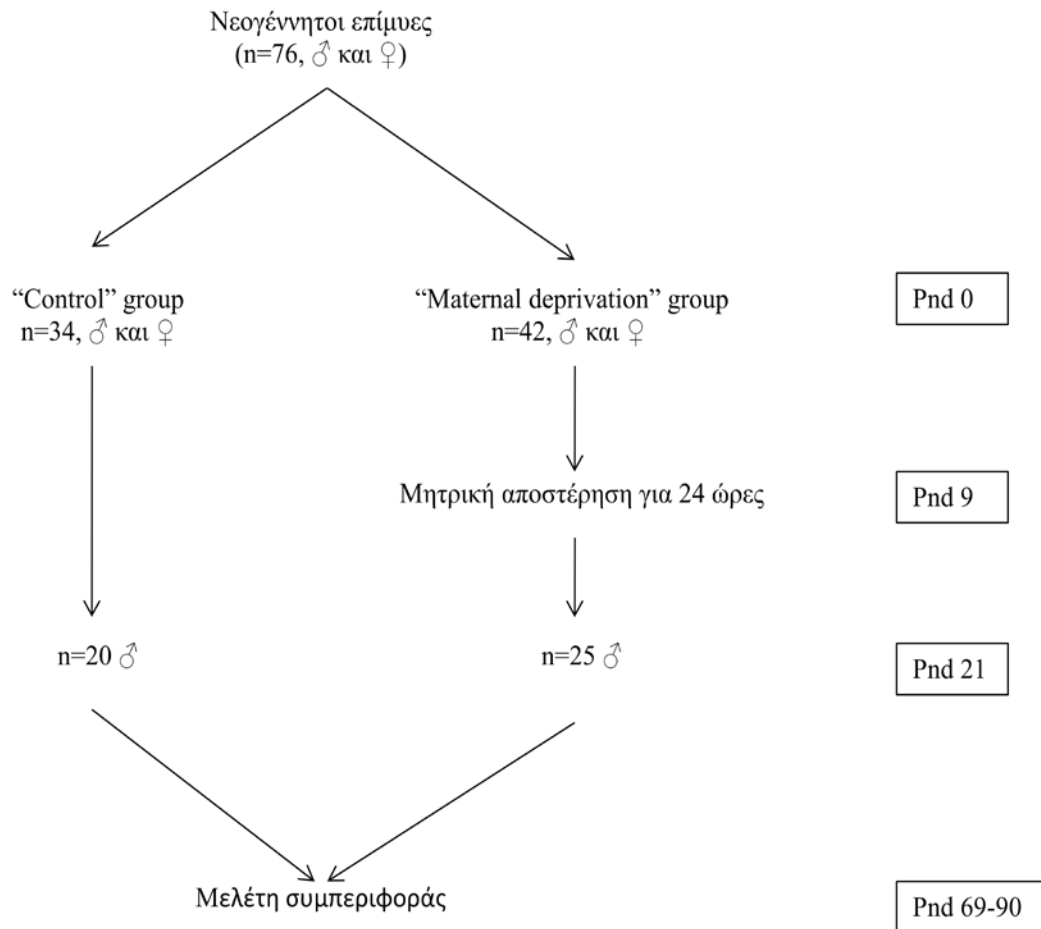
2.2.2. Πρόκληση Στρες σύμφωνα με το Μοντέλο της Μητρικής Αποστέρησης

Το σύνολο των νεογέννητων επιμύων στην αρχή του πειράματος ήταν 76. Σύμφωνα με το μοντέλο MDS, οι εγγυμονούντες θηλυκοί επίμυες Wistar τοποθετήθηκαν σε κλουβιά (από πλεξιγκλάς, διαστάσεων 42.5 x 26.6 x 15.5 cm, με στρώση από ροκανίδι στο εσωτερικό τους) και παρέμειναν εκεί χωρίς να ενοχληθούν μέχρι να γεννήσουν.

Οι 76 νεογέννητοι επίμυες (τόσο θηλυκοί όσο και αρσενικοί, εφόσον δεν υπήρχε η δυνατότητα να ελεγχθεί το φύλο τους ακόμη) χωρίστηκαν σε κατηγορία "μαρτύρων" (n=34, "control" group) και κατηγορία "μητρικής αποστέρησης" (n=42, "maternal deprivation" group). Οι νεογέννητοι MDS επίμυες απομακρύνθηκαν από τις μητέρες τους για ένα διάστημα 24 ωρών. Η μητρική αποστέρηση έλαβε χώρα στις 10.00 π.μ. την 9η ημέρα μετά τη γέννηση (pnd 9) (Ellenbroek et al., 1998), (Ellenbroek and Cools, 2002). Το πρωί της 9^{ης} ημέρας μετά τη γέννηση, οι μητέρες απομακρύνθηκαν με προσοχή από τα κλουβιά στα οποία βρίσκονταν οι νεογέννητοι επίμυες και τοποθετήθηκαν σε άλλο κλουβί, το οποίο βρίσκονταν στο ίδιο δωμάτιο (**Εικόνα 5**). Οι νεογέννητοι επίμυες παρέμειναν στο κλουβί χωρίς την παρουσία της μητέρας τους. Μετά από 24 ώρες, οι μητέρες επεστράφησαν στα κλουβιά με τους νεογέννητους επίμυες και παρέμειναν χωρίς να ενοχληθούν μέχρι την ημέρα του απογαλακτισμού ("weaning", pnd 21). Οι "μάρτυρες επίμυες" ("control" group), δεν αποχωρίστηκαν καθόλου τις μητέρες τους. Την ημέρα του απογαλακτισμού (pnd 21) διαχωρίστηκαν οι αρσενικοί από τους θηλυκούς επίμυες. Για την περαιτέρω μελέτη χρησιμοποιήθηκαν μόνο οι αρσενικοί επίμυες (20 πειραματόζωα "control" group και 25 πειραματόζωα "maternal deprivation" group, για την αναλυτική διαδικασία του πειράματος βλ. **Σχήμα 1**).



Εικόνα 5: Αποχωρισμός της μητέρας από τους νεογέννητους επίμυες την pnd 9 για 24 ώρες.



Σχήμα 1: Σχεδιασμός πειράματος με το μοντέλο MDS.

2.2.3. Μελέτη συμπεριφοράς

Οι αρσενικοί επίμυες Wistar κατά το χρονικό διάστημα πραγματοποίησης της μελέτης συμπεριφοράς είχαν βάρος περίπου 250-300g και ηλικία 2.5 έως 3 μηνών (δηλαδή η μελέτη συμπεριφοράς διεξήχθη μεταξύ της pnd 69 και pnd 90). Τα πειραματόζωα "μάρτυρες" (20 αρσενικοί επίμυες) και τα πειραματόζωα που υπέστησαν MDS (25 αρσενικοί επίμυες), υπεβλήθησαν σε ορισμένες μελέτες κινητικής δραστηριότητας. Οι μελέτες κινητικής δραστηριότητας συνδέονται στενά με διάφορες λειτουργίες και συμπεριφορές του επίμυ και επομένως μέσω αυτών είναι δυνατόν να εξαχθούν πολύτιμες πληροφορίες όσον αφορά την φυσιολογική, (ή μη) κατάσταση, στην οποία βρίσκονται οι επίμυες (διαταραχές σχετιζόμενες με το ΚΝΣ κ.α.) (Polissidis et al., 2009). Οι δύο παράμετροι που μελετήθηκαν ήταν: α) οι αλλαγές στην αυθόρμητη κινητικότητα ("spontaneous motor activity") πειραματόζωων που έχουν υποστεί MDS,

σε σχέση με τους "μάρτυρες" και β) οι διαφορές στην κινητικότητα των δύο ομάδων στο κέντρο του ανοιχτού πεδίου ("open field test"). Αυτοί οι δύο δείκτες χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της κατάστασης άγχους στα πειραματόζωα. Οι δύο αυτές συμπεριφορολογικές μελέτες πραγματοποιήθηκαν σε ειδικό κλωβό (40 x 40 x 40cm), συνδεδεμένο με συσκευή καταγραφής της κινητικότητας (ENV515, Activity Monitor, version 5, Med Associates, USA, βλ. **Εικόνα 6**), η οποία με τη σειρά της ήταν συνδεδεμένη με Η/Υ. Οι πλάγιες επιφάνειες του κλωβού διέθεταν οριζόντιες και κάθετες σειρές φωτοκυττάρων, τα οποία εξέπεμπαν δεσμίδες φωτός. Η κίνηση του πειραματοζώου στο χώρο διέκοπτε αυτές τις δεσμίδες φωτός και αυτό καταγράφονταν στο σύστημα. Πριν την έναρξη της καταγραφής, για 40 λεπτά περίπου, γίνονταν εξοικείωση των επίμυων στο δωμάτιο, στο οποίο θα γίνονταν η καταγραφή.

Μελέτη αυθόρμητης κινητικής δραστηριότητας

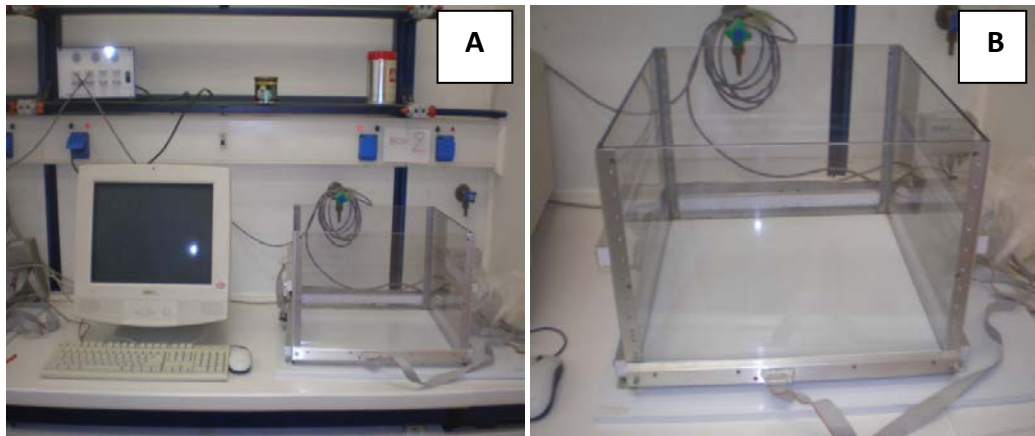
Οι επίμυες εισάγονταν στον ειδικό κλωβό και αφήνονταν να εξερευνήσουν τον καινούριο χώρο για 75 λεπτά. Πιο συγκεκριμένα, γίνονταν καταγραφή του χρόνου που περνούσαν οι επίμυες στο κέντρο και στην περιφέρεια του κλωβού. Η μελέτη της καταγραφής της αυθόρμητης συμπεριφοράς του πειραματοζώου παρέχει σημαντικές πληροφορίες για την κινητικότητα και την ικανότητα εξερεύνησής του και αξιολογεί συμπεριφορές, οι οποίες σχετίζονται με αυξημένα επίπεδα στρες.

Μελέτη κινητικότητας στο ανοιχτό πεδίο

Αμέσως μετά το πέρας της μελέτης αυθόρμητης κινητικής δραστηριότητας, οι επίμυες τοποθετούνταν στον κλωβό για την καταγραφή της κινητικότητας τους για 30 λεπτά. Οι παράμετροι, οι οποίες προσδιορίζονταν ήταν:

- απόσταση οριζόντιας κινητικότητας (ambulatory distance)
- εκτεταμένη οριζόντια κινητικότητα (ambulatory episodes)
- διάρκεια οριζόντιας κινητικότητας (ambulatory time)
- συχνότητα εμφάνισης οριζόντιας κινητικότητας (ambulatory counts)
- διάρκεια εμφάνισης κατακόρυφης κινητικότητας / ανόρθωσης (vertical time)
- συχνότητα εμφάνισης κατακόρυφης κινητικότητας / ανόρθωσης (vertical counts)
- διάρκεια απραξίας (resting time).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτών των δύο συμπεριφορολογικών μελετών, τα πειραματόζωα, που είχαν υποστεί MDS, χωρίστηκαν σε δύο ομάδες: Α) πειραματόζωα, τα οποία ανταποκρίθηκαν στο στρες (Maternal Deprivation Responders ή MDR) και Β) πειραματόζωα, τα οποία δεν ανταποκρίθηκαν (Maternal Deprivation Non-Responders ή MDNR).



Εικόνα 6: Α. Σύστημα καταγραφής κινητικότητας,

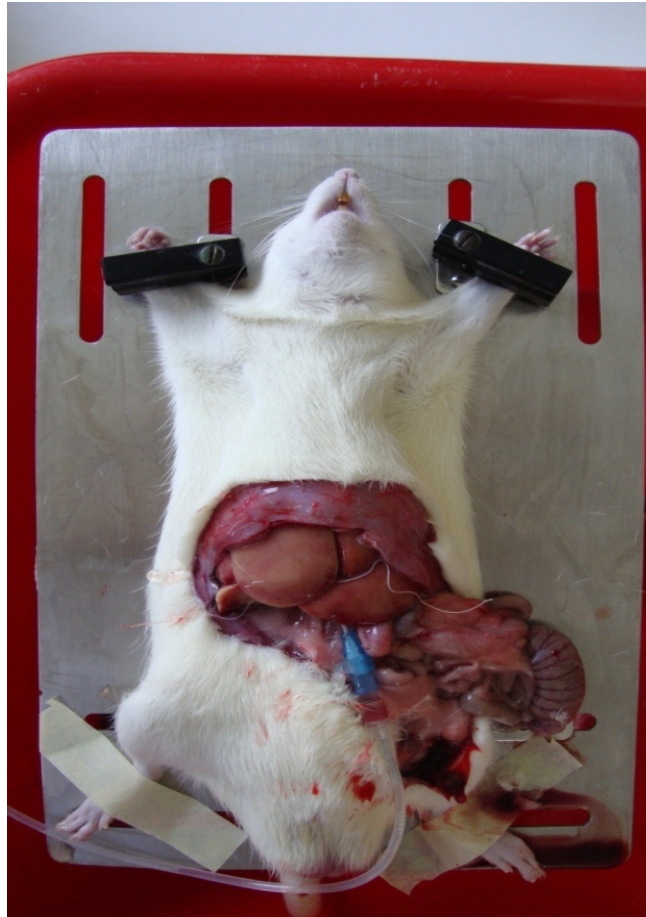
Β.Κλωβός καταγραφής κινητικότητας.

3. Απομόνωση και καλλιέργεια πρωτογενών ηπατοκυττάρων από ήπαρ επίμυος

3.1. Διαδικασία απομόνωσης πρωτογενών ηπατοκυττάρων

Η απομόνωση διενεργείθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο απομόνωσης πρωτογενών ηπατοκυττάρων από ήπαρ επιμύων και μυών του Εργαστηρίου του NIH, το οποίο στηρίζεται στην μέθοδο του Klaunig et al. (Klaunig et al., 1981), με ορισμένες μετατροπές. Πιο συγκεκριμένα, για την απομόνωση των πρωτογενών κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν δύο διαλύματα, το "διάλυμα έγχυσης" (perfusion buffer - 1mM Na₂EDTA σε 250ml HBSS) και το "διάλυμα κολλαγενάσης" (collagenase buffer - CaCl₂ 0.56g/L, Collagenase I 50mg/100ml σε 250ml HBSS), τα οποία αμέσως μετά την προετοιμασία τους διατηρήθηκαν στους 37°C καθ'όλη την διάρκεια της απομόνωσης των ηπατοκυττάρων. Επίσης, για τη διενέργεια της απομόνωσης των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε περισταλτική αντλία (Gilson, Minipuls evolution, Middleton, WI, USA) ούτως ώστε να καταστήσει ικανή την μεταφορά των δύο διαλυμάτων στο ήπαρ του πειραματοζώου. Πριν την έναρξη της διαδικασίας, καθώς και καθ' όλη τη διάρκεια της, το πειραματόζωο βρίσκονταν υπό αναισθησία με αιθέρα (Panreac, Barcelona, Spain). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

- α) Αναισθητοποίηση του πειραματοζώου με αιθέρα, μέσα σε ειδικό γυάλινο θάλαμο.
- β) Μετά την επιβεβαίωση ότι το πειραματόζωο ήταν πλήρως αναισθητοποιημένο, έγινε η μεταφορά του σε ειδική μεταλλική βάση και ακινητοποίησή του πάνω σε αυτή.
- γ) Καθαρισμός του τριχώματος της κοιλιακής χώρας με αιθανόλη 75% και οριζόντια τομή της κοιλιακής χώρας με αποστειρωμένα εργαλεία.
- δ) Απομάκρυνση του στομάχου και των σπλάχνων προς τα δεξιά (έξω από το κοιλιακή κοιλότητα, βλ. **Εικόνα 7**). Αναγνώριση της πυλαίας φλέβας και τοποθέτηση κλωστής κάτω από αυτήν, ώστε να δημιουργηθεί βρόγχος.
- ε) Εισαγωγή βελόνας και καθετήρα (Surflo I/V catheter, 22G, 0.85 x 25 mm, Terumo) στην πυλαία φλέβα, κλείσιμο του βρόγχου (βλ. **Εικόνα 7**).



Εικόνα 7: Αναισθητοποιημένος επίμυς με καθετήρα τοποθετημένο στην πυλαία φλέβα

στ) Επιβεβαίωση της σωστής τοποθέτησης του καθετήρα (έξοδος φλεβικού αίματος από την πίσω μεριά του καθετήρα σημαίνει επιτυχή καθετηριασμό) και αφαίρεση της βελόνας (ώστε μόνον ο καθετήρας να βρίσκεται μέσα στην πυλαία φλέβα).

ζ) Προσαρμογή στον καθετήρα του σωλήνα, μέσω του οποίου μεταφέρθηκε από την αντλία το διάλυμα με την κολλαγενάση. Ενεργοποίηση της αντλίας.

η) Εκκίνηση της έγχυσης του **διαλύματος έγχυσης** (perfusion buffer) με ροή 15 ml/λεπτό. Συχνός έλεγχος για την σωστή θέση του καθετήρα μέσα στην πυλαία φλέβα (βλ. **Εικόνα 8**).



Εικόνα 8: Έλεγχος της σωστής θέσης του καθετήρα μέσα στην πυλαία φλέβα του πειραματοζώου. Χαρακτηριστική αλλαγή του χρώματος του ήπατος από καφέ σε υποκίτρινο.

θ) Μετά την αλλαγή χρώματος του ήπατος (από καφέ σε υποκίτρινο), έγινε τομή της μηριαίας αρτηρίας και φλέβας, με αποτέλεσμα την κατάληξη του πειραματοζώου εντός δευτερολέπτων λόγω αιμορραγίας.

ι) Ολοκλήρωση της έγχυσης των 250ml διαλύματος έγχυσης, και εκκίνηση της έγχυσης του **διαλύματος κολλαγενάσης** (collagenase buffer), όγκου επίσης 250ml. Η ροή αρχικά ήταν 15-20 ml/λεπτό και σταδιακά αυξήθηκε στα 30 ml/λεπτό. Το διάλυμα κολλαγενάσης, το οποίο ανέβλυζε από τα αγγεία του πειραματοζώου, συλλέχθηκε και επεστράφη στο αρχικό διάλυμα κολλαγενάσης (37°C), ώστε να επανεγχυθεί. Κατά τη διάρκεια της έγχυσης του δεύτερου διαλύματος, ήταν καλή πρακτική η μάλαξη του ήπατος, ώστε να επιταχύνεται η πλήρωση των λοβών του με το διάλυμα.

ια) Αλλαγή του χρώματος του ήπατος σε κίτρινο, ολοκλήρωση της έγχυσης του διαλύματος κολλαγενάσης και αφαίρεση του καθετήρα από την πυλαία φλέβα.

ιβ) Αφαίρεση των λοβών του ήπατος (με αποστειρωμένα εργαλεία) και τοποθέτηση τους σε δύο τριβλία petri (ισόποσα).

ιγ) Κατάτμηση των λοβών σε πολύ μικρά κομμάτια και μεταφορά του περιεχομένου του κάθε τριβλίου petri σε αποστειρωμένο σωληνίσκο falcon 50ml.

- ιδ) Έκπλυση των κομματιών του ήπατος με 35ml διαλύματος DPBS (Gibco).
- ιε) Φιλτράρισμα του περιεχομένου κάθε falcon μέσα από φίλτρο των 70μm (BD Falcon nylon filters, BD).
- ιστ) Συλλογή του διαλύματος που προέκυψε από το φιλτράρισμα, σε νέο αποστειρωμένο σωληνίσκο falcon 50ml.
- ιζ) Φυγοκέντρωση στις 1000 στροφές (rpm) για 3 λεπτά, στους 4°C.
- ιη) Αφαίρεση του υπερκείμενου και προσθήκη 15ml DPBS στο ίζημα του κάθε falcon. Ανάδευση με την πιπέτα μέχρι την όσο το δυνατόν καλύτερη και ήπια ομογενοποίηση του διαλύματος (οι διαδικασίες από αυτό το σημείο και μετά γίνονται μέσα σε hood για την αποφυγή επιμόλυνσης).
- ιθ) Φυγοκέντρωση στις 1000 στροφές (rpm) για 3 λεπτά, στους 4°C.
- ικ) Αφαίρεση του υπερκείμενου, προσθήκη 10ml DPBS στο ίζημα του κάθε falcon και ανάδευση με πιπέτα μέχρι την όσο το δυνατόν καλύτερη και ήπια ομογενοποίηση του διαλύματος.
- κα) Φυγοκέντρωση στις 1000 στροφές (rpm) για 3 λεπτά, στους 4°C.
- κβ) Αφαίρεση του υπερκείμενου, προσθήκη 10ml DPBS στο ίζημα του κάθε falcon και ανάδευση μέχρι την όσο το δυνατόν καλύτερη και ήπια ομογενοποίηση του διαλύματος. Με την ολοκλήρωση της ομογενοποίησης προστίθεται 1ml HBSS (Gibco) και 9ml Percoll (Sigma-Aldrich). Έγινε καλή ανάμιξη.
- κγ) Φυγοκέντρωση στις 1000 στροφές (rpm) για 3 λεπτά, στους 4°C.
- κδ) Αφαίρεση του υπερκείμενου, προσθήκη 10ml DPBS στο ίζημα του κάθε falcon και ανάδευση με πιπέτα μέχρι την όσο το δυνατόν καλύτερη και ήπια ομογενοποίηση του διαλύματος.
- κε) Φυγοκέντρωση στις 1000 στροφές (rpm) για 3 λεπτά, στους 4°C.
- κστ) Αφαίρεση του υπερκείμενου, προσθήκη 1ml culture medium στο ίζημα του κάθε falcon και ανάδευση με πιπέτα μέχρι την όσο το δυνατόν καλύτερη και ήπια ομογενοποίηση του διαλύματος. Το culture medium αποτελούνταν από William's

Medium E (Gibco), 1% L-Glutamine (PAA, USA) και 1% Penicillin/Streptomycin (PAA).

κζ) Ποσοτικός προσδιορισμός των ηπατοκυττάρων σε chamber μέτρησης κυττάρων (βλ. **Εικόνες 9, 10**).

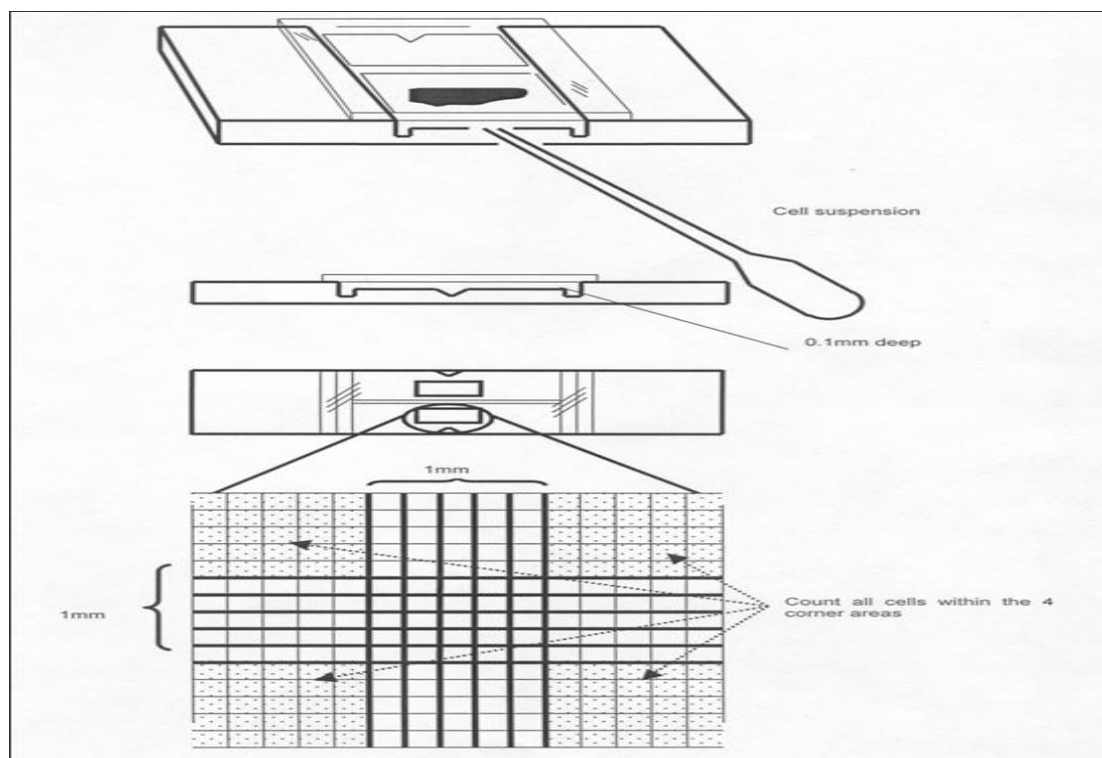
3.2. Ποσοτικός προσδιορισμός κυττάρων και τοποθέτησή τους σε πιάτα με επικάλυψη κολλαγόνου

Σε ειδικό chamber μέτρησης κυττάρων (τύπου Neubauer, Marienfeld, Germany - βλ. **Εικόνα 9**) προστέθηκαν 10μl του διαλύματος πρωτογενών ηπατοκυττάρων που απομονώθηκαν. Με τη βοήθεια μικροσκοπίου έγινε μέτρηση του αριθμού των κυττάρων, που βρίσκονταν εντός των τεσσάρων μεγάλων τετραγώνων του chamber (βλ. **Εικόνα 10**) και έγινε υπολογισμός του μέσου όρου. Ο αριθμός που προέκυψε, πολλαπλασιάστηκε με το 10^4 και το τελικό αποτέλεσμα ήταν η συγκέντρωση των ηπατοκυττάρων σε 1ml.



Εικόνα 9: Chamber μέτρησης κυττάρων (τύπου Neubauer)

Η απαιτούμενη συγκέντρωση για την τελική τοποθέτηση των κυττάρων σε πιάτα (plating των κυττάρων) με 12 πηγαδάκια, ήταν 10^5 κύτταρα / 500μl. Επομένως, σύμφωνα με την μέτρηση, υπολογίστηκε ο τελικός όγκος, στον οποίο έπρεπε να αραιωθεί το 1ml κυττάρων, ώστε να επιτευχθεί η συγκέντρωση που απαιτούνταν.



Εικόνα 10: Υπολογισμός αριθμού κυττάρων σε chamber τύπου Neubauer

Αφού προστέθηκε ο απαιτούμενος όγκος culture medium (William's Medium E, 1% L-Glutamine, 1% Penicillin/Streptomycin), έγινε ανάδευση μέχρι την όσο το δυνατόν καλύτερη και ήπια ομογενοποίηση του διαλύματος. Τέλος 500μl διαλύματος ηπατοκυττάρων μεταφέρθηκαν σε κάθε πηγαδάκι του πιάτου (με 12 πηγαδάκια έκαστο, BD, USA - βλ. **Εικόνα 11**) και τα κύτταρα επώαστηκαν για 24 ώρες στους 37°C.



Εικόνα 11: Πιάτο με 12 πηγαδάκια προεπικαλυμμένα με κολλαγόνο

3.3. Αξιολόγηση της βιωσιμότητας των ηπατοκυττάρων

Η χρήση της βαφής trypan blue βασίζεται στο γεγονός ότι μπορεί να γίνει χρώση του κυτταροπλάσματος, μόνον εάν η κυτταρική μεμβράνη δεν είναι άθικτη. Επομένως κύτταρα, τα οποία βάφονται με την trypan blue είναι νεκρά, ενώ τα κύτταρα, τα οποία δεν φέρουν τη βαφή είναι ζώντα. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

α) Χρησιμοποίηση του ειδικού chamber μέτρησης κυττάρων τύπου Neubauer για την ποσοτικοποίηση των κυττάρων.

β) Προσθήκη 10μl trypan blue (διάλυμα 0.4%, Invitrogen) σε 100μl διαλύματος κυττάρων και ανάμιξη (η παρατεταμένη επαφή των κυττάρων με την βαφή trypan blue - για πάνω από 30 λεπτά - αποφεύχθηκε, λόγω της τοξικότητας της).

γ) Μεταφορά στο ειδικό chamber μέτρησης κυττάρων και μέτρηση (με τη βοήθεια μικροσκοπίου) των ολικών κυττάρων και έπειτα των κυττάρων που έφεραν την βαφή.

δ) Υπολογισμός του ποσοστού των ζώντων κυττάρων σύμφωνα με τον εξής μαθηματικό τύπο:

$$\% \text{ ζώντων κυττάρων} = [1 - (\text{αριθμός βαμμένων κυττάρων} / \text{αριθμός ολικών κυττάρων})] \times 100$$

Το ποσοστό των ζώντων κυττάρων έπρεπε να είναι τουλάχιστον 85% για μια επιτυχημένη κυτταροκαλλιέργεια.

4. Φάρμακα, Χημικές ουσίες

4.1. *In vivo* αξιολόγηση της επίδρασης του στρες και των αδρενεργικών μονοπατιών, στη ρύθμιση των κυτοχρωμάτων *CYPs*

Το πείραμα αυτό σχεδιάστηκε ώστε να αξιολογηθεί η επίδραση των συστημάτων του στρες στη ρύθμιση των κυτοχρωμάτων CYP3A, CYP2C, CYP2D και CYP2A. Οι επίμυες χωρίστηκαν σε τέσσερις ομάδες. Στους επίμυες της πρώτης ομάδας (Α) χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός (Φ/Ο, normal saline, sodium chloride 0.9%) ενδοπεριτοναϊκά, μια φορά την ημέρα για 4 συνεχόμενες ημέρες. Οι επίμυες της δεύτερης ομάδας (Β) έλαβαν τον αγωνιστή των α_1 -αδρενεργικών υποδοχέων, υδροχλωρική φαινυλεφρίνη [PH] (Sigma-Aldrich; 2mg/kg ενδοπεριτοναϊκά), μια φορά την ημέρα για 4 συνεχόμενες ημέρες, ενώ στους επίμυες της τρίτης ομάδας (Γ) δόθηκε ο α_2 -αδρενεργικός αγωνιστής, υδροχλωρική δεξμεντετομιδίνη [DEXT] (Pfizer; 5μg/kg υποδόρια), μια φορά την ημέρα για 4 συνεχείς ημέρες. Οι επίμυες της τέταρτης ομάδας (Δ) έλαβαν τον β -αδρενεργικό αγωνιστή, υδροχλωρική ισοπρεναλίνη [ISOP] (Sigma-Aldrich; 2mg/kg ενδοπεριτοναϊκά) για 4 ημέρες. Τέλος, στους επίμυες της πέμπτης ομάδας (Ε) χορηγήθηκε το συνθετικό γλυκοκορτικοειδές δεξαμεθαζόνη [DM] (Sigma-Aldrich; 100mg/kg ενδοπεριτοναϊκά) για 4 συνεχείς ημέρες.

Όλα τα πειραματόζωα θυσιάστηκαν δι' αποκεφαλισμού, την 4η ημέρα, μια ώρα μετά την τελευταία χορήγηση φαρμάκου. Τα δοσολογικά σχήματα των αγωνιστών που δρούν στους αδρενεργικούς υποδοχείς (PH, DEXT, ISOP), επελέγησαν σύμφωνα με την βιβλιογραφία, ούτως ώστε να προκαλέσουν επαρκή ενεργοποίηση των αδρενεργικών υποδοχέων (Virtanen, 1989), (Ravaris et al., 1991), (Mealy et al., 1996), (Bucheler et al., 2002). Στην περίπτωση της DEXT, η δοσολογία που επιλέχθηκε ήταν 5μg/kg ημερησίως, ώστε να αποφευχθεί η πρόκληση υπνηλίας/νάρκωσης στους επίμυες (Scheinin et al., 1998). Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε σε αυτή τη μελέτη βρίσκεται αναλυτικά στον **Πίνακα 1**.

Ομάδα	Ημέρα			
	Ημέρα 1	Ημέρα 2	Ημέρα 3	Ημέρα 4
A	Φ/Ο	Φ/Ο	Φ/Ο	Φ/Ο [θυσία]
B	PH	PH	PH	PH [θυσία]
Γ	DEXT	DEXT	DEXT	DEXT [θυσία]
Δ	ISOP	ISOP	ISOP	ISOP [θυσία]
E	DM	DM	DM	DM [θυσία]

Πίνακας 1: Συνοπτικό πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε για την πειραματική μελέτη αξιολόγησης του ρόλου των γλυκοκορτικοειδών και των αδρενεργικών μονοπατιών στη ρύθμιση των κυτοχρωμάτων *CYPs*.

4.2. *In vivo* αξιολόγηση της επίδρασης των D₂-ντοπαμινεργικών μονοπατιών, στη ρύθμιση των κυτοχρωμάτων *CYPs*

Η πειραματική αυτή μελέτη είχε ως σκοπό την αξιολόγηση της επίδρασης των D₂-ντοπαμινεργικών υποδοχέων στη ρύθμιση των κυτοχρωμάτων CYP3A, CYP2C, CYP2D και CYP2A. Τα πειραματόζωα χωρίστηκαν σε δύο ομάδες. Η πρώτη ομάδα (A) έλαβε φυσιολογικό ορό (Φ/Ο) υποδόρια, δύο φορές την ημέρα για 3 συνεχόμενες ημέρες και μια φορά το πρωί της ημέρας της θυσίας των πειραματοζώων (σύνολο 7 δόσεις). Στους επίμυες της δεύτερης ομάδας (B) χορηγήθηκε ο D₂-ντοπαμινεργικός ανταγωνιστής, σουλπιρίδη (Sigma-Aldrich, 12mg/kg υποδόρια), επίσης δύο φορές την ημέρα για 3 συνεχόμενες ημέρες και μια φορά το πρωί της ημέρας της θυσίας (σύνολο 7 δόσεις).

Όλα τα πειραματόζωα θυσιάστηκαν δι' αποκεφαλισμού την 4η ημέρα, μια ώρα μετά την τελευταία χορήγηση του φαρμάκου. Το δοσολογικό σχήμα της Sulp επελέγη σύμφωνα με την βιβλιογραφία (Sigala et al., 1991). Το πρωτόκολο που ακολουθήθηκε σε αυτή τη μελέτη βρίσκεται αναλυτικά στον **Πίνακα 2**.

Ομάδα	Ημέρα			
	Ημέρα 1	Ημέρα 2	Ημέρα 3	Ημέρα 4
A	Φ/Ο (x2)	Φ/Ο (x2)	Φ/Ο (x2)	Φ/Ο (x1) [θυσία]
B	SULP (x2)	SULP (x2)	SULP (x2)	SULP (x1) [θυσία]

Πίνακας 2: Συνοπτικό πρωτόκολλο, που ακολουθήθηκε για την πειραματική μελέτη αξιολόγησης του ρόλου των D₂-ντοπαμινεργικών υποδοχέων στη ρύθμιση των κυτοχρωμάτων CYPs.

4.3. *In vitro* αξιολόγηση της επίδρασης του συστήματος των αδρενεργικών μονοπατιών στη ρύθμιση των κυτοχρωμάτων CYPs

Αφού απομονώθηκαν τα πρωτογενή ηπατοκύτταρα, έγινε ποσοτικός προσδιορισμός τους και τοποθετήθηκαν σε πιάτα με επικάλυψη κολλαγόνου (βλ. υποκεφάλαιο "Απομόνωση και καλλιέργεια πρωτογενών ηπατοκυττάρων από ήπαρ επίμυος"), τα κύτταρα διατηρήθηκαν σε επωαστήρα στους 37°C για 24 ώρες. Την επόμενη ημέρα άρχισαν τα πειράματα, στα οποία χρησιμοποιήθηκαν ποικίλες συνθήκες φαρμακευτικών ουσιών, συγκεντρώσεων και χρόνου επώασης.

Στις καλλιέργειες πρωτογενών ηπατοκυττάρων χορηγήθηκαν:

- το κορτικοστεροειδές, κορτικοστερόνη [CORT] (Sigma-Aldrich), σε διάφορες συγκεντρώσεις με εύρος 1-25μΜ.
- ο αδρενεργικός αγωνιστής, υδροχλωρική επινεφρίνη [EPI] (Sigma-Aldrich) σε διάφορες συγκεντρώσεις με εύρος 1-100μΜ.
- ο α₂-αδρενεργικός αγωνιστής, υδροχλωρική φαινυλεφρίνη [PH] (Sigma-Aldrich) σε διάφορες συγκεντρώσεις με εύρος 1-100μΜ.
- ο α₁-αδρενεργικός αγωνιστής, υδροχλωρική δεξμεντετομιδίνη [DEXT] (Pfizer) σε διάφορες συγκεντρώσεις με εύρος 1-20μΜ.
- ο β-αδρενεργικός αγωνιστής, υδροχλωρική ισοπρεναλίνη [ISOP] (Sigma-Aldrich) σε διάφορες συγκεντρώσεις με εύρος 1-100μΜ.

Οι αδρενεργικοί αγωνιστές χορηγήθηκαν στις καλλιέργειες πρωτογενών κυττάρων, είτε μόνοι τους, είτε σε συνδυασμούς με τους αναστολείς της JNK, SP600125 (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA) ή της PKA, H89 (Sigma-Aldrich) και sodium orthovanadate [NaOV] (Sigma Aldrich). Η επώαση με τους αναστολείς της JNK ή της PKA άρχισε 30-60 λεπτά πριν την προσθήκη των αδρενεργικών αγωνιστών. Τα πρωτογενή ηπατοκύτταρα επώαστηκαν με τους ανωτέρω συνδυασμούς για διάφορες χρονικές περιόδους, από 4 μέχρι 36 ώρες.

4.4. *In vitro* αξιολόγηση της επίδρασης του συστήματος των ντοπαμινεργικών μονοπατιών, της ινσουλίνης και του μονοπατιού PI3K/Akt στη ρύθμιση των κυτοχρωμάτων CYPs

Αφού απομονώθηκαν τα πρωτογενή ηπατοκύτταρα, έγινε ποσοτικός προσδιορισμός τους και τοποθετήθηκαν σε πιάτα με επικάλυψη κολλαγόνου ((βλ. υποκεφάλαιο "Απομόνωση και Καλλιέργεια Πρωτογενών Ηπατοκυττάρων από ήπαρ επίμυος"), τα κύτταρα διατηρήθηκαν σε επωαστήρα στους 37°C για 24 ώρες. Την επόμενη ημέρα άρχισαν τα πειράματα, στα οποία χρησιμοποιήθηκαν ποικίλες συνθήκες φαρμακευτικών ουσιών, συγκεντρώσεων και χρόνου επώασης.

Στις καλλιέργειες πρωτογενών ηπατοκυττάρων χορηγήθηκαν:

- ο D₂-αγωνιστής, σουλπιρίδη [SULP] (Sigma-Aldrich), σε διάφορες συγκεντρώσεις με εύρος 1-25μM.

- ινσουλίνη [INS] (Sigma-Aldrich) σε διάφορες συγκεντρώσεις με εύρος 100nM-1μM.

Η ινσουλίνη χορηγήθηκε στα πρωτογενή κύτταρα είτε μόνη της, είτε σε συνδυασμό με τον αναστολέα του μονοπατιού της PI3K, Wortmannin [WORT] (Sigma Aldrich). Η επώαση με τον αναστολέα της PI3K άρχισε 30 λεπτά πριν την προσθήκη της ινσουλίνης και το εύρος των συγκεντρώσεων της WORT που δοκιμάστηκε ήταν 500nM-1mM. Τα πρωτογενή ηπατοκύτταρα επώαστηκαν με τους ανωτέρω συνδυασμούς για διάφορες χρονικές περιόδους, από 4 μέχρι 36 ώρες.

5. Θυσία πειραματοζώων, απομόνωση και προσδιορισμός πρωτεϊνών-RNA

5.1. Επεξεργασία του ήπατος - ομογενοποίηση - απομόνωση κυτταροπλάσματος και μικροσωματίων

Μετά το πέρας των φαρμακολογικών χειρισμών (ή των πειραμάτων συμπεριφοράς αναλόγως), ακολούθησε η θυσία των πειραματοζώων. Όλα τα πειραματοζώα ζυγίζονταν πριν την έναρξη των πειραμάτων, κάθε ημέρα πριν την έναρξη οποιουδήποτε χειρισμού και λίγο πριν τη θυσία. Τα πειραματοζώα θυσιάστηκαν δι' αποκεφαλισμού. Έγινε συλλογή του αίματος του επίμυ (από τον τράχηλο) μέσα σε κρύους δοκιμαστικούς σωλήνες, στους οποίους είχαν προστεθεί 10μl EDTA 0.5% (ως αντιπηκτικός παράγοντας) και ακολούθησε φυγοκέντρηση των δειγμάτων αίματος για το διαχωρισμό του πλάσματος από τα έμμορφα συστατικά. Το τρίχωμα στην κοιλιακή χώρα καθαρίστηκε με αιθανόλη 75% και έγινε οριζόντια τομή στην κοιλιακή χώρα. Αφού απομακρυνθηκε ο συνδετικός και ο λιπώδης ιστός, τρίχες καθώς και τυχόν θρόμβοι αίματος, το ήπαρ αφαιρέθηκε και ζυγίστηκε σε ζυγό. Σε ποτήρι ζέσεως, το οποίο περιείχε **Διάλυμα Ομογενοποίησης** (0.15M KCL, 10 mM K₂EDTA, 1mM διθειοτρεϊτόλη, pH 7.4) τοποθετήθηκαν 2g ήπατος.

Το ήπαρ κόπηκε σε μικρότερα τμήματα με τη βοήθεια ψαλιδιού, ξεπλύθηκε με Διάλυμα Ομογενοποίησης δύο φορές (ώστε να απομακρυνθεί το αίμα) και σε αυτό προστέθηκε κρύο Διάλυμα Ομογενοποίησης (40-50ml). Ακολούθησε ομογενοποίηση με ομογενοποιητή (Heidolph RZRO, Γερμανία) και ειδικό έμβολο από teflon. Το προϊόν της ομογενοποίησης φυγοκεντρήθηκε στις 10500 στροφές (rpm) για 20 λεπτά στους 4°C (φυγόκεντρος Sorvall® RC28S, USA). Το ίζημα το οποίο δημιουργήθηκε, αποτελούνταν από κυτταρικούς πυρήνες, κυτταρικό σκελετό και κύτταρα που δεν είχαν υποστεί λύση. Το υπερκείμενο - αποτελούνταν από το κυτταρόπλασμα και τα μικροσωμάτια - μεταφέρθηκε σε καθαρούς σωληνίσκους και φυγοκεντρήθηκε στις 27500 στροφές για 60 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο στο τέλος της φυγοκέντρησης αποτελούσε το κυτταρόπλασμα, το οποίο συλλέχθηκε και μοιράστηκε σε σωληνίσκους τύπου erpendorf, οι οποίοι καταψύχθηκαν στους -80°C.

Το ίζημα που απέμεινε περιείχε τα μικροσωμάτια. Στο ίζημα προστέθηκαν 8 ml Διαλύματος Ομογενοποίησης, έγινε ομογενοποίηση και ακολούθησε η τελευταία φυγοκέντρωση στις 27500 στροφές για 45 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και στο ίζημα προστέθηκαν 2 ml **Διαλύματος Αποθήκευσης** (διάλυμα K₂HPO₄/KH₂PO₄ pH 7.4, 1mM K₂EDTA, 0.1mM διθειοθρεϊτόλη, 20% γλυκερόλη). Έγινε η τελική ομογενοποίηση και το προϊόν μοιράστηκε σε σωληνίσκους τύπου erpendorf οι οποίοι καταψύχθηκαν στους -80°C (Lang et al., 1981).

5.2. Προσδιορισμός πρωτεϊνών από μικροσωμάτια

Ο προσδιορισμός των πρωτεϊνών έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο Lowry (Lowry et al., 1951). Η μέθοδος αυτή συνδυάζει δύο αντιδράσεις:

α) αντίδραση ιόντων χαλκού (Cu⁺) με γειτονικούς πεπτιδικούς δεσμούς (απαραίτητη προϋπόθεση η ύπαρξη αλκαλικού περιβάλλοντος). Η αντίδραση αυτή είναι ανεξάρτητη της σύστασης της πρωτεΐνης σε αμινοξέα.

β) αντίδραση αναγωγής του φωσφομολυβδαινικού και φωσφολφραμικού οξέος (συστατικά του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu) από τα αμινοξέα τυροσίνη και τρυπτοφάνη της πρωτεΐνης.

Για την μέθοδο Lowry χρησιμοποιήθηκαν τα κάτωθι διαλύματα:

Διάλυμα Α: 2% Na₂CO₃ σε NaOH 0.1 N

Διάλυμα Β: 2% τρυγικό νάτριο (C₄H₄Na₂O₆·2H₂O)

Διάλυμα Γ: 1% CuSO₄·5H₂O

Διάλυμα Δ: μείγμα διαλύματος αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu (Sigma, USA) με H₂O σε αναλογία 1:1 (παρασκευή ακριβώς πριν τη χρήση)

Διάλυμα Ε: αλκαλικό διάλυμα, το οποίο προέκυψε από ανάμιξη των διαλυμάτων Α, Β και Γ σε αναλογία 100 : 1 : 1 (παρασκευή ακριβώς πριν τη χρήση)

Δείγμα μικροσωματικής πρωτεΐνης 20μl, διαλύθηκε σε d.d. H₂O (1:40) και σε αυτό προστέθηκαν 3ml διαλύματος Ε, αναμείχθηκαν και έγινε επώαση για 10 λεπτά στους 37°C. Στη συνέχεια προστέθηκαν 300μl διαλύματος Δ, έγινε ανάμιξη και επώαση για 20 λεπτά στους 37°C. Ακολούθησε η μεταφορά του τελικού προϊόντος σε κυββέτα χαλαζία (quartz) και η μέτρηση της απορρόφησης του δείγματος σε μήκος κύματος 750 nm σε φωτόμετρο φάσματος (Shimadzu UV 1601, Japan). Για την δημιουργία της πρότυπης καμπύλης χρησιμοποιήθηκε αλβουμίνη από βόειο ορρό αίματος (bovine serum albumin ή BSA, Serva, Heidelberg, Germany).

5.3. Επεξεργασία του ήπατος - ομογενοποίηση - απομόνωση ολικών πρωτεϊνών (total cellular protein extraction)

5.3.1. Παρασκευή του ρυθμιστικού διαλύματος λύσης RIPA (RIPA lysis buffer)

Περίπου 30 λεπτά πριν την έναρξη της θυσίας των πειραματοζώων, παρασκευάστηκε το ρυθμιστικό διάλυμα λύσης RIPA (radio-immuno-precipitation assay). Για την παρασκευή του απαιτήθηκαν τα εξής:

6ml NaCl 5M

2ml διαλύματος Tris-HCl 1M, pH 8 (Sigma-Aldrich)

400μl EDTA, pH 8 (Open Biosystems, UK)

2ml SDS 10% (Sigma-Aldrich)

2ml IgePal CA-630 (Sigma-Aldrich)

Το μείγμα των 12.4ml που προέκυψε, αραιώθηκε σε d.d. H₂O, μέχρις τελικού όγκου 200ml. Στην συνολική ποσότητα διαλύματος RIPA που απαιτούνταν για τα δείγματα προς ομογενοποίηση, γινόταν προσθήκη των αναστολέων των πρωτεασών (Protease Inhibitor Cocktail Kit, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA).

5.3.2. Θυσία πειραματοζώων

Τα πειραματόζωα θυσιάστηκαν δι' αποκεφαλισμού., όπως περιγράφεται στο υποκεφάλαιο 5.1.1.

5.3.3. Ομογενοποίηση του ιστού του ήπατος

Ένα τμήμα του ηπατικού ιστού τοποθετήθηκε σε αποστειρωμένους σωληνίσκους erpendorf, οι οποίοι αποθηκεύτηκαν αμέσως σε δοχείο με υγρό N₂, ενώ σε ζυγό ακριβείας ζυγίστηκαν ακριβώς 100mg ιστού (μέσα σε αποστειρωμένο σωληνίσκο erpendorf) και μεταφέρθηκαν γρήγορα σε γυάλινο ομογενοποιητή των 5ml (στον οποίο εφάρμοζε έμβολο από teflon). Ακολούθως και χωρίς καμία καθυστέρηση, προστέθηκαν στον ομογενοποιητή τα εξής:

1ml ρυθμιστικού διαλύματος λύσης RIPA (με Protease Inhibitor Cocktail, Pierce)

10μl διαλύματος PMSF (αρχικής συγκέντρωσης 100mM, Sigma-Aldrich)

10μl διαλύματος β-glycerophosphate (αρχικής συγκέντρωσης 500mM, Sigma-Aldrich)

10μl διαλύματος NaF (αρχικής συγκέντρωσης 500mM, Sigma-Aldrich)

5μl διαλύματος NaVO₃ (αρχικής συγκέντρωσης 400mM, Sigma-Aldrich)

Ακολούθησε ομογενοποίηση με τη χρήση του εμβόλου, του κάθε δείγματος για 2-3 λεπτά και τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε αποστειρωμένους σωληνίσκους erpendorf. Αφέθηκαν μέσα σε πάγο για 15 λεπτά. Μεταξύ της ομογενοποίησης διαφορετικών δειγμάτων, ο ομογενοποιητής των 5ml πλένονταν με διάλυμα RIPA και στεγνώνονταν επαρκώς. Το προϊόν της ομογενοποίησης φυγοκεντρήθηκε στις 14000 στροφές (rpm) για 15 λεπτά στους 4°C (σε φυγόκεντρο Megafuge 1.0R, Heraeus Instruments, Γερμανία). Το υπερκείμενο, το οποίο αποτελούνταν από τις ολικές πρωτεΐνες, χωρίστηκε σε υποπολλαπλάσιες ποσότητες (aliquots) των 100μl και μεταφέρθηκε προσεκτικά σε νέους αποστειρωμένους σωληνίσκους erpendorf και αυτοί αποθηκεύτηκαν χωρίς καμία καθυστέρηση στους -80°C.

5.3.4. Προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο BCA

Ο προσδιορισμός των ολικών πρωτεϊνών έγινε με το BCA Protein Assay Kit (Pierce, IL, USA). Η μέθοδος αυτή συνδυάζει την αντίδραση αναγωγής του Cu^{+2} σε Cu^{+1} από την πρωτεΐνη μέσα σε αλκαλικό περιβάλλον, με την υψηλής ευαισθησίας χρωματομετρική ανίχνευση του Cu^{+1} , χρησιμοποιώντας το δι-κιγχονινικό οξύ (bicinchoninic acid). Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του αγνώστου δείγματος πρωτεΐνης απαιτήθηκε η κατασκευή πρότυπης καμπύλης (standard curve), με τη βοήθεια γνωστών συγκεντρώσεων αλβουμίνης από βόειο ορό (BSA). Το πρωτόκολλο του BCA Protein Assay Kit, ακολουθήθηκε με μικρές προσαρμογές και συνοψίζεται στα εξής:

α) Προετοιμασία των διαλυμάτων της πρότυπης καμπύλης με διαδοχικές αραιώσεις ενός αρχικού διαλύματος BSA (Pierce, USA), συγκέντρωσης 2mg/ml. Προετοιμάστηκαν οι εξής συγκεντρώσεις: 2mg/ml, 1.5mg/ml, 1mg/ml, 0.75mg/ml, 0.5mg/ml, 0.25mg/ml, 0.125mg/ml, 0.025mg/ml και ένα "τυφλό" δείγμα (blank) με 0mg/ml BSA.

β) Προετοιμασία του BCA Working Reagent, με αναλογία 50 μέρη BCA Reagent A με 1 μέρος BCA Reagent B. Μετά την ανάμιξη, το μείγμα απέκτησε χαρακτηριστικό πράσινο χρώμα.

γ) Μεταφορά 25μl από κάθε δείγμα πρωτεΐνης και κάθε δείγματος standard BSA, σε σωληνίσκους eppendorf.

δ) Προσθήκη 100μl μείγματος BCA Working Reagent σε κάθε σωληνίσκο eppendorf και ανακίνηση για 30 δευτερόλεπτα.

ε) Επώαση των μειγμάτων στους 37°C για 30 λεπτά.

στ) Τα μείγματα αφέθηκαν να φθάσουν την θερμοκρασία δωματίου.

ζ) Έγινε ανίχνευση στα 595 nm με το φωτόμετρο NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, USA).

η) Το υπολογιστικό πρόγραμμα του NanoDrop 2000 υπολόγισε την ακριβή συγκέντρωση των μειγμάτων της πρωτεΐνης.

5.4. Απομόνωση RNA

5.4.1. Απομόνωση RNA από ιστό ήπατος

Κατά την θυσία των πειραματοζώων, ζυγίστηκαν 100mg ιστού ήπατος και αποθηκεύτηκαν σε αποστειρωμένους σωληνίσκους eppendorf (άμεση μεταφορά τους στους -80°C). Λίγα λεπτά πριν την έναρξη της διαδικασίας απομόνωσης RNA, τα δείγματα αυτά μεταφέρθηκαν από τους -80°C σε πάγο.

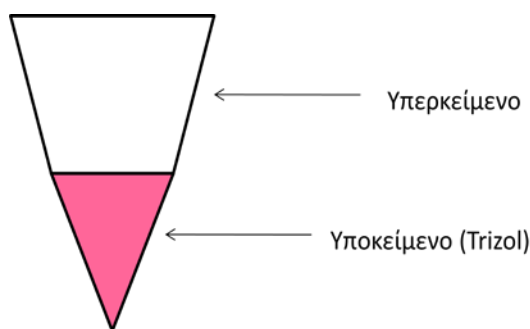
Έγινε προσαρμογή του εμβόλου στον ομογενοποιητή (από teflon) και ακολούθησε καθαρισμός του εμβόλου με αποστειρωμένο d.d. H_2O (συν DEPC) και αιθανόλη 75%. Η απομόνωση ολικού RNA επιτεύχθηκε με την χρήση διαλύματος TRIzol (Invitrogen, USA). Το TRIzol είναι ένα διάλυμα φαινόλης και ισοθειοκυανικής γουανιδίνης για την απομόνωση ολικού RNA από κύτταρα και ιστούς. Κατά την ομογενοποίηση των δειγμάτων και τη λύση τους, ο ρόλος του TRIzol είναι η διάσπαση των κυτταρικών μεμβρανών και του εσωτερικού των κυττάρων, ενώ παράλληλα εξασφαλίζεται η ακεραιότητα του RNA. Ακολούθως έγινε προσθήκη χλωροφορμίου και το μείγμα φυγοκεντρήθηκε, ώστε να διαχωριστούν τα δείγματα σε δυο διαφορετικές φάσεις, την ανόργανη και την οργανική. Το RNA, το οποίο ήταν διαλυμένο στην ανόργανη φάση, συλλέχθηκε μετά από προσθήκη ισοπροπανόλης (Sigma-Aldrich). Το ίζημα καθαρίστηκε με 75% αιθανόλης (Panreac, Barcelona, Spain) και ακολούθησε αναδιάλυσή του σε d.d. $\text{H}_2\text{O}/\text{DEPC}$ (Invitrogen, USA). Η ακριβής διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

- α) Προετοιμάστηκαν αποστειρωμένοι σωληνίσκοι των 5ml και σε αυτούς προστέθηκε 1ml TRIzol (Invitrogen).
- β) Παραμονή του ιστού μέσα στο TRIzol για 5 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου.
- γ) Με χρήση ομογενοποιητή και εμβόλου έγινε ομογενοποίηση του ιστού μέσα στους σωληνίσκους.
- δ) Φυγοκέντρωση στα 13000g για 10 λεπτά, στους 4°C .
- ε) Μεταφορά του υπερκείμενου σε καινούρια αποστειρωμένα eppendorf (1.5ml), απόρριψη του ιζήματος.

στ) Προσθήκη 300μl χλωροφορμίου (Sigma-Aldrich) και ανακίνηση (30-40 φορές). Παραμονή του διαλύματος για 5 λεπτά, μέσα σε πάγο.

ζ) Φυγοκέντρωση στα 13000g για 15 λεπτά, στους 4°C.

η) Μεταφορά του υπερκείμενου (ημιδιαφανής φάση) σε καινούριους αποστειρωμένους σωληνίσκους erpendorf (**Σχήμα 2**).



Σχήμα 2: Διαχωρισμός υπερκείμενου (εμπεριέχει το RNA) και υποκειμένου

θ) Προσθήκη 500μl ισοπροπανόλης (Sigma-Aldrich) η οποία είχε διατηρηθεί για λίγα λεπτά μέσα σε πάγο. Προσεκτική ανακίνηση (30-40 φορές).

ι) Παραμονή του διαλύματος μέσα σε πάγο για 10 λεπτά.

ια) Φυγοκέντρωση στα 13000g για 15 λεπτά, στους 4°C.

ιβ) Απόρριψη του υπερκείμενου και έκπλυση του ιζήματος με 1ml αιθανόλης 75% (παρασκευασμένη με αποστειρωμένο d.d. H₂O/DEPC) και ανακίνηση (η ανακίνηση έγινε πολύ προσεκτικά ώστε να μη χαθεί το ίζημα).

ιγ) Φυγοκέντρωση στα 7500g για 5 λεπτά, στους 4°C.

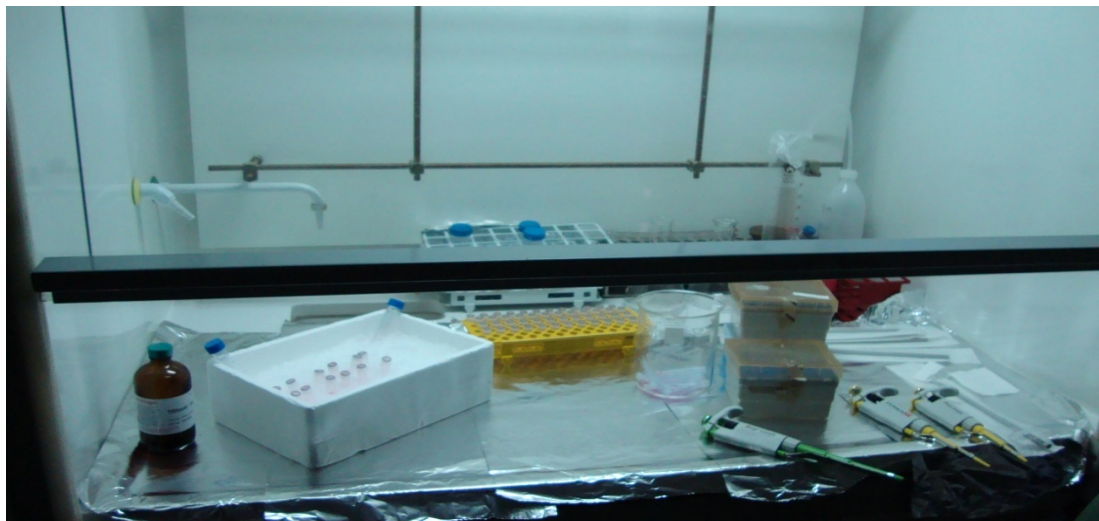
ιδ) Προσεκτική αφαίρεση όλης της ποσότητας αιθανόλης 75%.

ιε) Προσθήκη 250μl αποστειρωμένου d.d. H₂O/DEPC (Invitrogen) και προσεκτική ανάδευση με πιπέτα μέχρι την όσο το δυνατόν πλήρη και ήπια ομογενοποίηση του διαλύματος RNA.

ιζ) Ακολούθησε ο ποσοτικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης του RNA με φωτομετρική μέθοδο (χρήση του φωτομέτρου NanoDrop).

5.4.2. Απομόνωση RNA από Καλλιέργεια Πρωτογενών Ηπατοκυττάρων

Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε μέσα σε hood (**Εικόνα 12**) λόγω της τοξικότητας του TRIzol. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:



Εικόνα 12: Εργασία μέσα σε hood για την απομάκρυνση των τοξικών αναθυμιάσεων.

- α) Αφαίρεση και απόρριψη του medium από κάθε πηγαδάκι (well) του πιάτου.
- β) Προσθήκη 500μl TRIzol σε κάθε πηγαδάκι και απόξεση (scraping) του πυθμένα, ώστε να επιτευχθεί η αποκόλληση των κυττάρων από τον πυθμένα. Η απόξεση έγινε με ειδική ξύστρα (κεφαλή 18mm, Corning, USA). Κατά την αλλαγή από ομάδα σε ομάδα του ίδιου πιάτου, η ξύστρα καθαρίζονταν με αιθανόλη 75% και αποστειρωμένη γάζα.
- γ) Ολοκλήρωση της απόξεσης του πυθμένα, συλλογή του περιεχομένου (κύτταρα και TRIzol) του κάθε πηγαδιού και μεταφορά του σε νέο αποστειρωμένο σωληνίσκο eppendorf.
- δ) Προσθήκη 150μl χλωροφορμίου (Sigma-Aldrich) και ανακίνηση (30-40 φορές). Παραμονή του διαλύματος για 5 λεπτά σε πάγο.
- ε) Φυγοκέντρηση στα 13000g για 15 λεπτά, στους 4°C.
- στ) Μεταφορά του υπερκείμενου (ημιδιαφανής φάση) σε καινούριους αποστειρωμένους σωληνίσκους eppendorf.

ζ) Προσθήκη 250μl ισοπροπανόλης (Sigma-Aldrich), η οποία είχε διατηρηθεί για λίγα λεπτά μέσα σε πάγο. Προσεκτική ανακίνηση (30-40 φορές).

η) Παραμονή του διαλύματος για 10 λεπτά σε πάγο.

θ) Φυγοκέντρηση στα 13000g για 15 λεπτά, στους 4°C.

ι) Απόρριψη του υπερκείμενου και έκπλυση του ιζήματος με 150μl αιθανόλης 75% (παρασκευασμένη με αποστειρωμένο d.d. H₂O/DEPC) και ανακίνηση (η ανακίνηση έγινε πολύ προσεκτικά ώστε να μη χαθεί το ίζημα).

ια) Φυγοκέντρηση στα 7500g για 5 λεπτά, στους 4°C.

ιβ) Προσεκτική αφαίρεση όλης της ποσότητας της αιθανόλης 75%.

ιγ) Προσθήκη 20μl αποστειρωμένου d.d. H₂O/DEPC (Invitrogen) και προσεκτική ανάδευση μέχρι την πλήρη και ήπια ομογενοποίηση του διαλύματος RNA.

ιδ) Ακολούθησε ο ποσοτικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης του RNA με φωτομετρική μέθοδο (χρήση του φωτόμετρου NanoDrop).

5.4.3. Ποσοτικός προσδιορισμός του απομονωθέντος RNA με φωτομέτρηση

Η συγκέντρωση των διαλυμάτων RNA που προέκυψαν, είτε από την απομόνωση RNA από ιστό ήπατος, είτε από καλλιέργειες πρωτογενών ηπατοκυττάρων, προσδιορίστηκε με το φωτόμετρο NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, USA).

Ο προσδιορισμός με αυτή τη μέθοδο θεωρείται ο ιδανικότερος, διότι:

α) απαιτούνται μόνο 2μl δείγματος RNA για κάθε μέτρηση

β) η οπτική πυκνότητα, η ακριβής συγκέντρωση του RNA και ο λόγος απορρόφησης A₂₆₀/A₂₈₀, ο οποίος δίνει σημαντικές πληροφορίες για την καθαρότητα του δείγματος RNA, υπολογίζονται αυτόματα από το πρόγραμμα του H/Y, ο οποίος είναι συνδεδεμένος με το φωτόμετρο NanoDrop.

6. Ορμονικοί προσδιορισμοί

Οι επίμυες θυσιάστηκαν δι' αποκεφαλισμού. Το αίμα από τον τράχηλο του επίμυ συλλέχθηκε αμέσως σε κρύους δοκιμαστικούς σωλήνες, οι οποίοι περιείχαν 10μl EDTA 0.5% (αντιπηκτικός παράγοντας). Εν συνεχεία, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 3000 στροφές (rpm) ανά λεπτό, σε φυγόκεντρο Megafuge 1.0R (Heraeus Instruments, Γερμανία) για 10 λεπτά. Το πλάσμα διαχωρίστηκε από τα έμμορφα συστατικά και φυλάχθηκε σε σωληνίσκους erpendorf, στους -20°C , μέχρι τον προσδιορισμό των επιπέδων των ορμονών. Οι ορμονικοί προσδιορισμοί πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Πυρηνικής Φυσικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων.

Για τον προσδιορισμό των επιπέδων της κορτικοστερόνης χρησιμοποιήθηκε το RIA kit (Coat-A-Count kit, Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, USA). Τα όρια ανίχνευσης ήταν 5.7 ng/ml και η intra-assay διακύμανση ήταν 4.0%. Τα επίπεδα της ACTH του πλάσματος προσδιορίστηκαν με την χρήση του RIA kit της Diasorin (Ελλάς).

Ο προσδιορισμός των επιπέδων της αυξητικής ορμόνης έγινε με το Rat growth hormone RIA kit (Millipore, MA, USA). Τα όρια ανίχνευσης ήταν 0.5 ng/ml και η intra-assay διακύμανση 10%. Για τον προσδιορισμό της προλακτίνης χρησιμοποιήθηκε το Rat prolactin RIA kit (MP Biomedicals Europe, France), το οποίο είχε όρια ανίχνευσης 0.5 ng/ml. Τα επίπεδα των θυρεοειδικών ορμονών μετρήθηκαν με τα kits Dynatest T3, Dynatest T4 και Dynatest TSH (Brahms, Germany). Οι φυσιολογικές τιμές τους ήταν 80-200 ng/dl (Dynatest T3), 4.5-12 μg/dl (Dynatest T4) και 0.4-4 mg/ml (Dynatest TSH) αντιστοίχως.

Ο προσδιορισμός των επιπέδων της ινσουλίνης έγινε χρησιμοποιώντας το ELISA kit (Mercodia Rat ELISA kit for insulin, Uppsala, Sweden). Τα όρια ανίχνευσης ήταν 3.3 ng/ml και η intra-assay διακύμανση 3.1%. Τα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα προσδιορίστηκαν με την χρήση της τεχνικής της οξειδάσης της γλυκόζης (Trinder, 1969) με ένα εμπορικά διαθέσιμο kit (Merck, Germany).

Τέλος, τα επίπεδα των κυτοκινών IL-1 β και TNF- α στο πλάσμα, προσδιορίστηκαν με το IL-1 β EIA kit assay (Quantikine, R&D Systems, USA) και το TNF- α EIA kit assay (Bioscience, USA), αντίστοιχα. Τα όρια ανίχνευσης του kit της IL-1 β ήταν 1.0 pg/mL, ενώ τα αντίστοιχα όρια του kit του TNF- α ήταν 4.59 pg/mL.

7. Μετρήσεις δραστηκότητας των ενζύμων με την μέθοδο της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC)

7.1. Προσδιορισμός πρωτεϊνών

Για τον προσδιορισμό των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Lowry (Lowry et al., 1951), η οποία περιγράφεται λεπτομερώς στην παράγραφο 5.1.2. ("Προσδιορισμός πρωτεϊνών").

7.2. Ανάλυση δειγμάτων με τη την μέθοδο της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC)

Οι αναλύσεις των δειγμάτων για την δραστηκότητα των κυτοχρωμάτων CYP3A1/2, CYP2C11, CYP2D1/4 και CYP2A1, έγιναν με το σύστημα HPLC (Shimadzu LC-10A/10Avp, Shimadzu Deutschland GmbH, Γερμανία). Χρησιμοποιήθηκε αντλία LC10AD, αυτόματος δειγματολήπτης SIL-10Avp και δύο διαφορετικοί ανιχνευτές (UV-ανιχνευτής SPD-M10A και ανιχνευτής φθορισμού RF-10AXL, **Εικόνα 13**).



Εικόνα 13: Σύστημα Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC).

7.2.1. Αξιολόγηση της δραστηριότητας των κυτοχρωμάτων CYP3A1/2, CYP2C11 και CYP2A1: Υδροξυλίωση της τεστοστερόνης

7.2.1.1. Προετοιμασία δειγμάτων (*ex vivo*)

Έγινε επώαση 1mg μικροσωματικής πρωτεΐνης από το ήπαρ επιμύων (αραιωμένης σε 100μl ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού καλίου 0.1M, pH 7.4) σε θερμοκρασία 37°C για 15 λεπτά, σε μείγμα τελικού όγκου 500μl, το οποίο επίσης περιείχε:

- 370μl d.d. H₂O
- 5μl υπόστρωμα τεστοστερόνης (200μM στο τελικό μείγμα) (Steraloids, Newport, RI, USA)
- 25μl NADPH (1mM) (Sigma-Aldrich).

Η αντίδραση ξεκίνησε αμέσως μετά την προσθήκη των 25μl NADPH και τερματίστηκε με τη προσθήκη 2ml μείγματος χλωροφορμίου και μεθανόλης (2:1). Τα δείγματα ανακινήθηκαν προσεκτικά και αφέθηκαν σε ηρεμία για 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου (15-22°C). Εν συνεχεία, το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το υποκείμενο μεταφέρθηκε σε γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες. Ακολούθως, έγινε εξάχνωση υπό αέριο N₂ για 5-10 λεπτά και έγινε ανασύσταση του ιζήματος με 200μl Ακετονιτριλίου 100% (ACN, Merck, Darmstadt, Germany). Τέλος, το μείγμα αποθηκεύτηκε σε σωληνάκια (ειδικά για HPLC) στους -20°C, μέχρις ότου αναλυθεί με τη μέθοδο HPLC.

7.2.1.2. Ανάλυση με HPLC

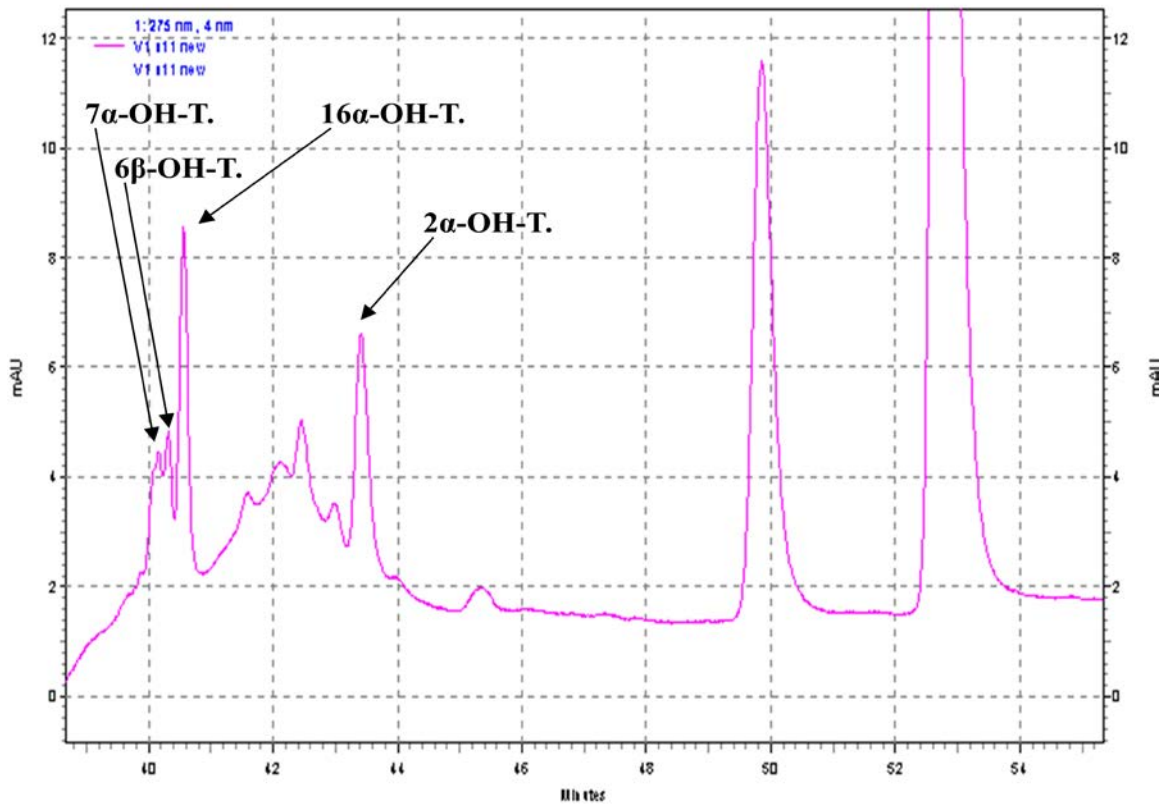
Πριν την ανάλυση του δείγματος, γίνονταν έγχυση 100% ACN, ώστε να απομακρυνθεί από το σύστημα κάθετι που θα μπορούσε να επηρεάσει την ευαισθησία του ανιχνευτή και εν τέλει τα αποτελέσματα. Επίσης, καθημερινά, πριν την ανάλυση των δειγμάτων, γίνονταν φόρτωση μείγματος αποτελούμενου από τις 5 πρότυπες ουσίες (standards):

- 15μM 7α-υδροξυ-τεστοστερόνη
- 15μM 6β-υδροξυ-τεστοστερόνη
- 15μM 2α-υδροξυ-τεστοστερόνη
- 15μM 16α-υδροξυ-τεστοστερόνη
- 15μM τεστοστερόνη

από την Steraloids (Newport RI, USA), με διαλύτη ακετονιτρίλιο (ACN), μέχρι τελικό όγκο 250μl μίγματος. Κάθε ένας από αυτούς τους παράγοντες, έδινε μια κορυφή, και ο υπολογισμός του εμβαδού της χρησιμοποιούνταν για την δημιουργία πρότυπης καμπύλης. Η πρότυπη καμπύλη προέκυπτε από τη σχέση εμβαδού κορυφής και συγκέντρωσης της κάθε ουσίας στο πρότυπο διάλυμα.

Για την ανίχνευση του σήματος των δειγμάτων, χρησιμοποιήθηκε στήλη HPLC Zorbax C₁₈ (5μm, 150 x 4mm), η ροή ήταν ρυθμισμένη στα 0.8 ml/min (πίεση περίπου 80 Atm) και η ανίχνευση τους σήματος έγινε σε UV-ανιχνευτή (SPD-M10A, Shimadzu, Japan). Η τεστοστερόνη και οι μεταβολίτες της μετρήθηκαν σε φάσμα 254nm (Excitation wavelength) και 302nm (Emission wavelength) (Li et al., 2002). Η ποσότητα δείγματος που εγχύονταν ήταν 20μl. Οι **δύο κινητές φάσεις** που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: α) μείγμα “A”, 10% ACN και 90% d.d. H₂O (με προσθήκη 0.5% οξικό οξύ). Ροή 0.8ml/min για 30 λεπτά. β) μείγμα “B”, 36% ACN και 64% d.d. H₂O (0.5% οξικό οξύ). Ροή 0.8ml /min για 35 λεπτά.

Μετά από την ανάλυση του κάθε δείγματος, το πρόγραμμα του H/Y που ήταν συνδεδεμένο με τον UV-ανιχνευτή, έδινε το αντίστοιχο χρωματογράφημα (**Εικόνα 14**) και γινόταν υπολογισμός της συγκέντρωσης του κάθε μεταβολίτη της τεστοστερόνης στο δείγμα με βάση το εμβαδόν της αντίστοιχης καμπύλης. Η ποσότητα αυτή, προέκυπτε από την ποσοτικοποίηση του χρωματογραφήματος και εκφράζονταν σε μg/g ιστού.



Εικόνα 14: Παράδειγμα χρωματογραφήματος ανάλυσης των μεταβολιτών της τεστοστερόνης, με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (UV-ανιχνευτής)

Μετά το πέρας της ανάλυσης του κάθε δείγματος, ακολουθούσε έκπλυση της στήλης για 15 λεπτά με την κινητή φάση “Α” και έπειτα έγχυση του επόμενου δείγματος (κινητή φάση “Α” για 30 λεπτά, κινητή φάση “Β” για 35 λεπτά, κ.ο.κ.). Κατά τις βραδινές ώρες, στα μεσοδιαστήματα των προσδιορισμών, όταν δεν γίνονταν αναλύσεις, γίνονταν έκπλυση με κινητή φάση Β σε χαμηλή ροή (0.2 ml/min), ώστε να αποφευχθεί η ξήρανση και καταστροφή της στήλης.

7.2.2. Αξιολόγησης της δραστηριότητας των κυτοχρωμάτων CYP2D1/2: Υδροξυλίωση της μπουφουραλόλης

7.2.2.1. Προετοιμασία δειγμάτων (*ex vivo*)

Έγινε προκαταρκτική επώαση 40μg μικροσωματικής πρωτεΐνης (αραιωμένης σε 20μl ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού καλίου 0.1M, pH 7.4) από το ήπαρ επιμύων σε θερμοκρασία 37°C για 5 λεπτά, σε μείγμα τελικού όγκου 180μl, το οποίο επίσης περιείχε:

- 120μl d.d. H₂O
- 20μl ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου 1M, pH 7.4
- 20μl υπόστρωμα μπουφουραλόλης (50μM στο τελικό μείγμα)

Στη συνέχεια προστέθηκε ποσότητα 20μl NADPH (Sigma-Aldrich) και έγινε 2^η επώαση για άλλα 7.5 λεπτά στους 37°C. Η αντίδραση ξεκίνησε αμέσως μετά την προσθήκη του NADPH και τερματίστηκε με την προσθήκη 20μl υπερχλωρικού οξέος (HClO₄) 60%. Τέλος, έγινε φυγοκέντρηση των δειγμάτων στις 13000 rpm για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο συλλέχθηκε και μεταφέρθηκε σε σωληνάκια (ειδικά για HPLC), τα οποία αποθηκεύτηκαν στους -20°C, μέχρις ότου αναλυθούν με HPLC.

7.2.2.2. Ανάλυση με HPLC

Καθημερινά, πριν την ανάλυση των δειγμάτων, γίνονται έλεγχος των πρότυπων διαλυμάτων (standard solutions) (5mM υδροξυ-μπουφουραλόλη και υδροχλωρική μπουφουραλόλη – Sigma Aldrich) με διαλύτη d.d. H₂O, μέχρι τελικό όγκο 250μl μείγματος. Κάθε ένας από αυτούς τους παράγοντες, έδινε μια κορυφή, και ο υπολογισμός του εμβαδού της χρησιμοποιούνταν για την δημιουργία πρότυπης καμπύλης. Η πρότυπη καμπύλη προέκυπτε από τη σχέση εμβαδού κορυφής και συγκέντρωσης της κάθε ουσίας στο πρότυπο διάλυμα.

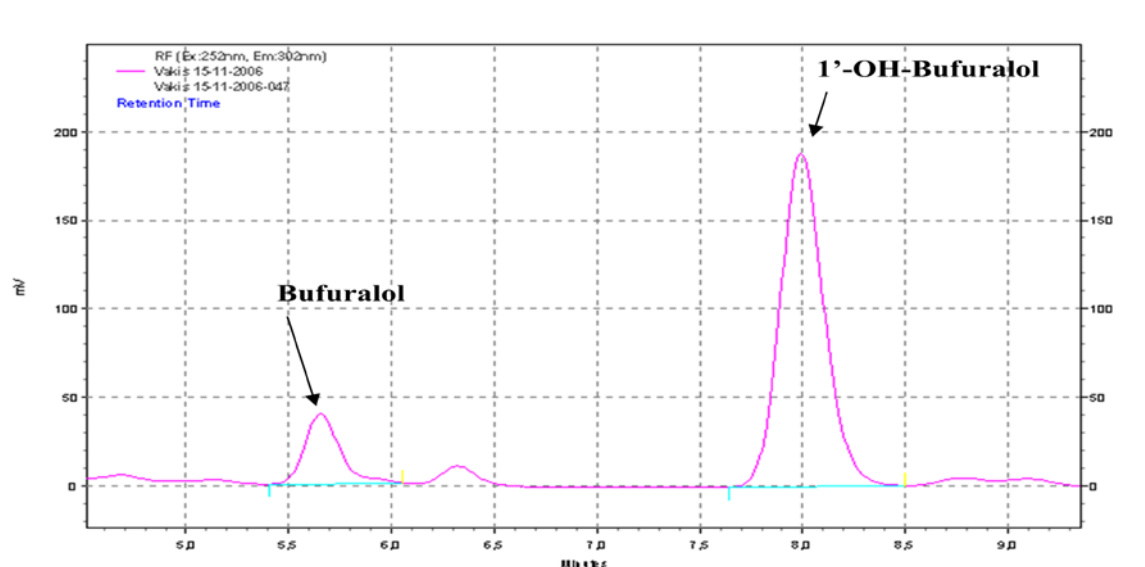
Για την ανίχνευση του σήματος των δειγμάτων, χρησιμοποιήθηκε στήλη HPLC Luna C₁₈ (5μm, 150 x 3mm) και αντίστοιχη προστήλη, ενώ η ροή ήταν ρυθμισμένη στο

1 ml/min και η ανίχνευση τους σήματος έγινε σε ανιχνευτή φθορισμού (RF-10AXL, Shimadzu). Η μπουφουραλόλη και ο μεταβολίτης της, υδροξυ-μπουφουραλόλη, μετρήθηκαν σε φάσμα μεταξύ μηκών κύματος 252nm (Excitation wavelength) και 302nm (Emission wavelength) (Kronbach et al., 1987), (Mankowski, 1999). Η ποσότητα δείγματος που εγχύονταν ήταν 20μl. Η **κινητή φάση (mobile phase)** που χρησιμοποιήθηκε ήταν ένα μείγμα 30% ACN και 70% perchlorate buffer 20mM (pH 2.5). Η διάρκεια ανάλυσης ήταν 14 λεπτά.

Μετά από την ανάλυση του κάθε δείγματος, λαμβάνονταν το αντίστοιχο χρωματογράφημα (**Εικόνα 15**) και με τη βοήθεια του προγράμματος του H/Y, που ήταν συνδεδεμένος με τον ανιχνευτή φθορισμού, υπολογίζονταν η ποσότητα της υδροξυλιωμένης μπουφουραλόλης στο δείγμα με βάση το εμβαδόν της καμπύλης. Η ποσότητα αυτή, προέκυπε από την ποσοτικοποίηση του χρωματογραφήματος και εκφράζονταν σε μg/g ιστού.

Μετά το πέρας της ανάλυσης του δείγματος, ακολουθούσε έκπλυση της στήλης για 5 λεπτά με την κινητή φάση και έπειτα η έγχυση του επόμενου δείγματος.

Κατά τις βραδινές ώρες, όταν δεν γίνονταν χρήση της στήλης για ανάλυση δειγμάτων, γίνονταν έκπλυση με την κινητή φάση σε χαμηλή ροή (0.2 ml/min), ώστε να αποφευχθεί η ξήρανση και καταστροφή της στήλης.



Εικόνα 15: Παράδειγμα χρωματογραφήματος ανάλυσης του μεταβολίτη της μπουφουραλόλης, υδροξυ-μπουφουραλόλης, με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (ανιχνευτής φθορισμού).

8. Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κατά Western Blot

8.1. Ανοσοαποτύπωση κατά Western Blot σε μικροσωματικές πρωτεΐνες

8.1.1. Προετοιμασία δειγμάτων

Αμέσως μετά τη θυσία των πειραματόζων και την απομόνωση του ιστού του ήπατος, ακολούθησε η απομόνωση μικροσωματίων, όπως περιγράφεται στην υποπαράγραφο 5.1. (απομόνωση μικροσωματίων, προσδιορισμός πρωτεϊνών (Lang et al., 1981). Για την ανοσοαποτύπωση κατά Western χρησιμοποιήθηκαν δείγματα μικροσωματίων. Η ποσότητα της περιεχόμενης συνολικής πρωτεΐνης στα δείγματα προσδιορίστηκε φωτομετρικά, σύμφωνα με την μέθοδο Lowry, η οποία περιγράφεται λεπτομερώς στην υποπαράγραφο 5.1.2. ("Προσδιορισμός πρωτεϊνών") (Lowry et al., 1951).

Για την επιλογή της βέλτιστης δυνατής ποσότητας μικροσωματικής πρωτεΐνης, που έπρεπε να φορτωθεί, έγινε πιλοτική ανάλυση διαφόρων ποσοτήτων πρωτεΐνης (linearization). Έτσι, 10μg, 15μg ή 20μg μικροσωματικής πρωτεΐνης αναλύθηκαν πιλοτικά και η ποσότητα πρωτεΐνης, που έδωσε το καλύτερο σήμα επιλέχθηκε για περαιτέρω ανάλυση.

Για την αραιώση των δειγμάτων μικροσωματικής πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης (sample buffer), το οποίο είχε την εξής σύνθεση:

4 ml d.d. H₂O

1 ml Tris-HCl 0.5 M (pH 6.8)

800 μl Glycerol (Sigma-Aldrich)

1.6 ml SDS 10 % w/v (Sigma-Aldrich)

400 μl 2-μερκαπτοαιθανόλη (Sigma-Aldrich)

200 μl bromophenol blue 0.1 % (Sigma-Aldrich)

Υπολογίστηκε ο όγκος των μικροσωματίων στον τελικό όγκο φόρτωσης, ώστε να υπάρχει συγκεκριμένη ποσότητα πρωτεΐνης (ανάλογα με τα αποτελέσματα του linearization). Η πρωτεΐνη και το διάλυμα φόρτωσης αναμείχθηκαν και οι πρωτεΐνες αποδιατάχθηκαν στους 95°C για 5 λεπτά σε heat block (Stuart block heater SBH130DC, Bibby Scientific Limited, Staffordshire, UK). Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε πάγο για ~ 5 λεπτά και στην συνέχεια αφέθηκαν εκτός πάγου, έως ότου η θερμοκρασία προσεγγίσει εκείνη του περιβάλλοντος και στην συνέχεια φορτώθηκαν στη γέλη για ηλεκτροφόρηση.

8.1.2. Ηλεκτροφόρηση και ανοσοαποτύπωση

Τα δείγματα φορτώθηκαν και διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση γέλης (SDS-PAGE) σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 7.5 - 10 % (ανάλογα με την πρωτεΐνη). Το πήκτωμα αποτελούνταν από δύο μέρη:

α) **πήκτωμα διαχωρισμού** (κάτω μέρος), το οποίο έχει την εξής σύνθεση (επαρκείς ποσότητες για δύο πηκτώματα):

5.345 ml d.d. H₂O

2.5 ml Tris-HCl 1.5 M (pH 8.8)

100 μl SDS 10 % w/v (Sigma-Aldrich)

2.5 ml Acrylamide 30% (BioRad)

50 μl APS 10% (Sigma-Aldrich)

5 μl TEMED (Sigma)

β) **πήκτωμα επιστοιβαξης** (πάνω μέρος), το οποίο έχει την εξής σύνθεση (επαρκείς ποσότητες για δύο πήκτώματα):

3.8 ml d.d. H₂O

1.5 ml Tris-HCl 0.5 M (pH 6.8)

60 μl SDS 10 % w/v (Sigma-Aldrich)

800 μl Acrylamide 30% (BioRad)

30 μl 10% APS (Sigma-Aldrich)

6 μl TEMED (Sigma-Aldrich)

Η ηλεκτροφόρηση έγινε με συσκευή Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (**Εικόνα 16**, Bio-Rad, California, USA) στα 100 Volt για περίπου 60 λεπτά, μέσα σε διάλυμα ηλεκτροφόρησης (running buffer - 25 mM Tris-base, 250 mM Glycine, 0.1 % SDS). Στη συνέχεια οι πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν από την γέλη σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Trans Protran nitrocellulose Transfer Membrane, πάχους 0.2 μm, Schleicher & Schuell, Germany) με την ίδια συσκευή BioRad, στα 100 Volt για 80 λεπτά, μέσα σε διάλυμα μεταφοράς (transfer buffer - 25 mM Tris base, 192 mM Glycine, 20% methanol). Για την επιβεβαίωση της επιτυχούς και ισομερούς φόρτωσης και μεταφοράς της πρωτεΐνης στις μεμβράνες, χρησιμοποιήθηκε το διάλυμα Ponceau (Sigma, USA).



Εικόνα 16: Συσκευή Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell

8.1.3. Ανίχνευση πρωτεϊνών

Πριν την έναρξη της διαδικασίας ανοσοαποτύπωσης κατά Western, προετοιμάστηκαν τα εξής διαλύματα:

α) Διάλυμα TBS (10mM Tris-HCl και 0.154M NaCl, pH 7.5)

β) Διάλυμα TTBS (διάλυμα TBS, 0.25% Tween 20 [Sigma, USA]).

Οι μεμβράνες επώαστηκαν αρχικά σε ρυθμιστικό διάλυμα (**blocking solution**), αποτελούμενο από διάλυμα TTBS και 5% άπαχο γάλα σε σκόνη, όλη τη νύχτα (overnight) στους 4°C, προκειμένου να δεσμευτούν οι μη-ειδικές (κενές) θέσεις δέσμευσης του αντισώματος. Την επόμενη ημέρα, οι μεμβράνες πλύθηκαν δύο φορές με διάλυμα TTBS επί 7 λεπτά. Ακολούθως, οι μεμβράνες επώαστηκαν για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου - υπό συνεχή ανακίνηση - με τα μονοκλωνικά πρωτογενή αντισώματα (CYP3A1, CYP3A2, CYP2D1, CYP2C11), σε διάλυμα TTBS που περιείχε 5% άπαχο γάλα. Λεπτομέρειες για τον χρόνο επώασης, τις αραιώσεις, το είδος του διαλύματος παρεμπόδισης (blocking solution) και τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν, παρατίθενται αναλυτικά στον **Πίνακα 3**.

Εν συνεχεία, οι μεμβράνες πλύθηκαν 2 φορές με TTBS, επί 12 λεπτά και ακολούθησε επώαση - υπό ανακίνηση - με το δευτερογενές αντίσωμα (anti-mouse IgG, Horseradish Peroxidase-linked) στους 4°C για 1 ώρα (διάλυμα TTBS και 5% άπαχο γάλα). Οι μεμβράνες πλύθηκαν 3 φορές με διάλυμα TTBS (8 λεπτά ανά πλύση) και εν συνεχεία - μέσα σε σκοτεινό θάλαμο - οι μεμβράνες επώαστηκαν σε μείγμα 1:1 των reagents A και B του συστήματος χημειοφωταύγειας ECL (Amersham, GE Healthcare, UK). Έγινε ανάμειξη 1ml reagent A και 1ml reagent B, και στη συνέχεια το μείγμα τοποθετήθηκε στην επιφάνεια της μεμβράνης για 5 λεπτά. Ακολούθως, οι μεμβράνες τοποθετήθηκαν σε ειδική κασετίνα και στον σκοτεινό θάλαμο το φωτεινό σήμα αποτυπώθηκε σε φωτοευαίσθητο φιλμ (Fuji Film, Fuji Medical X-Ray Film, Japan). Ο χρόνος για την αποτύπωση στο φιλμ διέφερε ανάλογα με το αντίσωμα προς εξέταση (από 1 μέχρι 30 λεπτά). Τέλος, το φιλμ εμβαπτίστηκε πρώτα σε **διάλυμα εμφάνισης** (developer solution, Kodak, Japan) για 3.5 λεπτά και έπειτα σε **διάλυμα σταθεροποίησης** (fixer solution, Kodak) για 7 λεπτά. Μετά το πέρας της διαδικασίας

στον σκοτεινό θάλαμο, έγινε stripping στις μεμβράνες και ακολούθησε νέα επώαση με ακτίνη ή GAPDH για τον ποσοτικό έλεγχο του φορτώματος των πρωτεϊνών.

8.1.4. Stripping

Για όλες τις αναλύσεις κατά western blot που πραγματοποιήθηκαν, μετά την αποτύπωση σε φιλμ, ακολούθησε stripping των μεμβρανών για 15 λεπτά μέσα σε υδατόλουτρο (θερμοκρασία 50°C), ώστε ακολούθως να καταστεί δυνατή η επώαση της ίδιας μεμβράνης σε πρωτογενές αντίσωμα ακτίνης (actin - I19 monoclonal antibody, Santa Cruz, USA) ή Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH, Chemicon Inc., USA). Το διάλυμα stripping είχε την εξής σύνθεση:

6.25 ml Tris-HCl 0.5 M (pH 6.8)
10 ml SDS 10% w/v (Sigma-Aldrich)
537μl 2- μερκαπτοαιθανόλη (Sigma-Aldrich)
μέχρι τελικό όγκο 50ml d.d. H₂O

Η διάλυση της μερκαπτοαιθανόλης και όλοι οι χειρισμοί του διαλύματος stripping έγιναν μέσα σε hood λόγω της τοξικότητας της μερκαπτοαιθανόλης. Μετά το πέρας της διαδικασίας stripping, έγιναν 2 πλύσεις σε διάλυμα TTBS (5 λεπτά έκαστη) και 2 πλύσεις σε διάλυμα TBS (5 λεπτά έκαστη). Ακολούθησε η επώαση των μεμβρανών σε πρωτογενές αντίσωμα ενός house-keeping αντισώματος (actin - I19 monoclonal antibody, Santa Cruz, USA ή GAPDH, Chemicon Inc., USA) και έπειτα σε δευτερογενές αντίσωμα (anti-mouse IgG HRP-linked, Santa Cruz, USA), ώστε να εκτιμηθεί η ποσότητα της πρωτεΐνης που φορτώθηκε στην κάθε μεμβράνη (Konstandi et al., 2008a).

8.1.5. Ποσοτικοποίηση

Μετά την επιλογή των φιλμ με το καλύτερο δυνατό αποτέλεσμα, έγινε σάρωση (scanning) με σαρωτή και το πρόγραμμα Precisionscan Programme 3.1 (Hewlett Packard). Τα αρχεία σώθηκαν σε ψηφιακή μορφή (.tiff), έγινε επεξεργασία τους στο

πρόγραμμα Photoshop CS3 (Adobe Labs) για τον "καθαρισμό" του σήματος και ακολούθησε η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας κάθε ζώνης πρωτεΐνης με το πρόγραμμα Scion Image (Scion Corp.). Για την ομαλοποίηση (normalization) της ποσότητας πρωτεΐνης στα δείγματα που μετρήθηκαν, χρησιμοποιήθηκαν οι ποσότητες πρωτεΐνης ενός housekeeping αντισώματος (ακτίνη ή GAPDH) και η οπτική πυκνότητα της κάθε ζώνης πρωτεΐνης αξιολογήθηκε σε σχέση με την αντίστοιχη οπτική πυκνότητα της ζώνης της ακτίνης (ή GAPDH).

8.2. Ανοσοαποτύπωση κατά Western Blot σε φωσφορυλιωμένες πρωτεΐνες

Για την ανάλυση των φωσφορυλιωμένων πρωτεϊνών με την μέθοδο Western Blot, εφαρμόστηκε το ανωτέρω πρωτόκολλο με ορισμένες μεταβολές, ούτως ώστε να αυξηθούν οι πιθανότητες ισχυρότερου σήματος κατά την ανοσοαποτύπωση των φωσφορυλιωμένων πρωτεϊνών:

α) Φορτώθηκαν 100 μg ολικής πρωτεΐνης (σε αντίθεση με 10, 15 ή 20μg).

β) Η ηλεκτροφόρηση διήρκεσε 90 λεπτά και έγινε σε τάση 100 Volt.

γ) Οι μεμβράνες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν Hybond-P PVDF (Amersham, USA). Πριν την χρήση απαιτήθηκε η ενεργοποίησή τους με μεθανόλη 100% για 1 λεπτό. Πλύση με d.d. H₂O για 5 λεπτά και επώαση σε transfer buffer.

δ) Η μεταφορά (transfer) των πρωτεϊνών από το πήκτωμα στις μεμβράνες έγινε στους 4°C, υπό ανακίνηση για 12-14 ώρες (overnight), σε τάση 30 Volt.

ε) Η επώαση των μεμβρανών σε ρυθμιστικό διάλυμα TBS (blocking solution) προκειμένου να δεσμευτούν οι μη-ειδικές (κενές) θέσεις δέσμευσης του αντισώματος, έγινε με 5% Bovine Serum Albumin (Serva), για 60 λεπτά στους 4°C.

στ) Τα πρωτογενή αντισώματα (Akt, phospho-Akt, P70S6K, phospho-P70S6K, total-STAT5a/b, phospho-STAT5b, total-FoxO1, phospho-FoxO1) αραιώθηκαν σε διάλυμα TTBS και 5% Bovine Serum Albumin και επώαστηκαν overnight στους 4°C.

Πρωτογενές αντίσωμα (primary antibody)	Είδος / Πηγή	Χρόνος επώασης	Αραίωση	Διάλυμα παρεμπόδισης (blocking solution)	Δευτερογενές αντίσωμα (secondary antibody)
CYP3A1	Μονοκλωνικό (mouse) (Dr Susumu Imaoka)	2 ώρες (θερμ. δωματίου)	(1:1000)	5% άπαχο γάλα	anti-mouse IgG HRP-linked (1:2000) anti-biotin (1:1000)
CYP3A2	Μονοκλωνικό (mouse) (Dr Susumu Imaoka)	2 ώρες (θερμ. δωματίου)	(1:1000)	5% άπαχο γάλα	anti-mouse IgG HRP-linked (1:2000) anti-biotin (1:1000)
CYP2C11	Μονοκλωνικό (mouse) (Dr Susumu Imaoka)	2 ώρες (θερμ. δωματίου)	(1:2500)	5% άπαχο γάλα	anti-mouse IgG HRP-linked (1:2000) anti-biotin (1:1000)
CYP2D1	Μονοκλωνικό (mouse) (Dr Susumu Imaoka)	2 ώρες (θερμ. δωματίου)	(1:1600)	5% άπαχο γάλα	anti-mouse IgG HRP-linked (1:2000) anti-biotin (1:1000)
t-Akt	Πολυκλωνικό (rabbit) (Cell Signaling)	12 ώρες (4°C)	(1:375)	5% BSA	anti-rabbit IgG HRP-linked (1:2000) anti-biotin (1:1000)
phospho-Akt (Ser473)	Πολυκλωνικό (rabbit) (Cell Signaling)	12 ώρες (4°C)	(1:375)	5% BSA	anti-rabbit IgG HRP-linked (1:2000) anti-biotin (1:1000)
t-P70S6 kinase	Πολυκλωνικό (rabbit) (Cell Signaling)	12 ώρες (4°C)	(1:375)	5% BSA	anti-rabbit IgG HRP-linked (1:2000) anti-biotin (1:1000)
phospho-P70S6 kinase (Thr389)	Πολυκλωνικό (rabbit) (Cell Signaling)	12 ώρες (4°C)	(1:375)	5% BSA	anti-rabbit IgG HRP-linked (1:2000) anti-biotin (1:1000)
t-STAT5a/b	Μονοκλωνικό (mouse) (Santa Cruz)	12 ώρες (4°C)	(1:1000)	5% BSA	anti-mouse IgG HRP-linked (1:2000) anti-biotin (1:1000)
phospho- STAT5b (Tyr694)	Μονοκλωνικό (rabbit) (Cell Signaling)	12 ώρες (4°C)	(1:1000)	5% BSA	anti-rabbit IgG HRP-linked (1:2000) anti-biotin (1:1000)
FKHR (H-128) (t-FoxO1)	Πολυκλωνικό (rabbit) Santa Cruz	12 ώρες (4°C)	(1:300)	5% BSA	anti-rabbit IgG HRP-linked (1:2000) anti-biotin (1:1000)
phospho-FKHR (phospho- FoxO1) (Ser 256)	Μονοκλωνικό (rabbit) Santa Cruz	12 ώρες (4°C)	(1:250)	5% BSA	anti-rabbit IgG HRP-linked (1:2000) anti-biotin (1:1000)
GAPDH	Μονοκλωνικό (mouse) (Chemicon Inc.)	3 ώρες (4°C)	(1:20000)	5% άπαχο γάλα	anti-mouse IgG HRP-linked (1:2000) anti-biotin (1:1000)
Actin (I-19)	Μονοκλωνικό (mouse) (Santa Cruz)	12 ώρες (4°C)	(1:200)	5% άπαχο γάλα	anti-mouse IgG HRP-linked (1:2000) anti-biotin (1:1000)

Πίνακας 3: Χαρακτηριστικά των πρωτογενών και δευτερογενών αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην ανοσοαποτύπωση κατά Western Blot.

9. Μεταγραφή του RNA σε cDNA και προσδιορισμός έκφρασης mRNA με τη μέθοδο RT-PCR

9.1. Μεταγραφή του RNA σε cDNA με τη μέθοδο της Αντίστροφης Μεταγραφής (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμερισμού αντίστροφης μεταγραφής είναι μια υψηλής ευαισθησίας μέθοδος για την μελέτη της έκφρασης του γονιδιώματος (mRNA) από ιστό ή κυτταρικές σειρές. Σύμφωνα με την τεχνική αυτή, ειδικές εναρκτήριες αλληλουχίες [Oligo p(dT)₁₅ primer] χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA) από το ολικό mRNA του γονιδίου που έχει απομονωθεί. Για να έρθει εις πέρας αυτή η αντίδραση, απαιτείται η παρουσία του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση (reverse transcriptase). Η αντίστροφη μεταγραφάση χρησιμοποιεί το RNA ως μήτρα για να συνθέσει τον κάθε κλώνο του DNA. Το δίκλωνο DNA που είναι το προϊόν αυτής της αντίδρασης, στη συνέχεια ενισχύεται με την μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), κατά την οποία το γονιδίωμα πολλαπλασιάζεται εκατομμύρια φορές.

Υλικά:

- Συσκευή CFX96 Real-Time System (C1000 Thermal Cycler, Bio-Rad, USA)
- DEPC-treated H₂O (Invitrogen, USA)
- 100mM dNTP Set (Invitrogen)
- SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen)
- Oligo p(dT)₁₅ primer for cDNA (Roche, USA)
- 5x First Strand Buffer & 100mM DTT Solution (Invitrogen)
- PCR Tube Strips (Bio-Rad)

Σε αποστειρωμένους σωληνίσκους erpendorf παρασκευάστηκαν τα εξής:

- **Μείγμα Α**, επαρκούς ποσότητας για x δείγματα. Για κάθε δείγμα έγινε προσθήκη 10μl DEPC/H₂O, 1μl μείγματος dNTP set και 1μl oligo p(dT)₁₅ primer.

- **Μείγμα Β**, επαρκούς ποσότητας για x δείγματα. Για κάθε δείγμα έγινε προσθήκη 4μl 5x First strand buffer και 2μl 100mM DTT solution.

- **Μείγμα Γ**, επαρκούς ποσότητας για x δείγματα. Για κάθε δείγμα έγινε προσθήκη 0.75μl DEPC/d.d. H₂O και 0.25μl SuperScriptII (το οποία προστίθεται στο τέλος της διαδικασίας λόγω της μεγάλης ευαισθησίας του ενζύμου!).

Η ακριβής διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

α) Προσθήκη 12μl **Μείγματος Α** σε κάθε σωληνίσκο (PCR Tube Strip) και εν συνεχεία 1μl δείγματος RNA (συγκέντρωσης 1μg/μl) και φυγοκέντρωση σε φυγόκεντρο (Centrifuge 5430, Eppendorf, USA) στις 2000 στροφές για 1 λεπτό.

β) Επώαση στους 65°C για 5 λεπτά και ψύξη (cooling) στους 4°C για 1 λεπτό.

γ) Προσθήκη 6μl **Μείγματος Β** σε κάθε σωληνίσκο και φυγοκέντρωση στις 2000 στροφές για 1 λεπτό.

δ) Επώαση στους 42°C για 2 λεπτά. Κατά τη διάρκεια της επώασης, έγινε προσθήκη της αντίστροφης μεταγραφάσης στο SuperScript II στο Μείγμα Γ, ώστε να μειωθεί η πιθανότητα απενεργοποίησής της.

ε) Προσθήκη 1μl **Μείγματος Γ** σε κάθε σωληνίσκο, όσο το δυνατόν πιο γρήγορα.

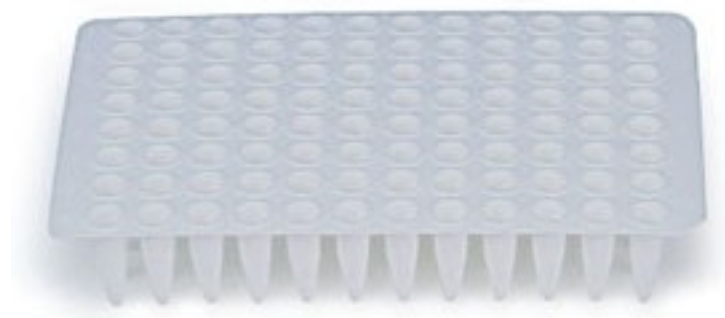
στ) Επώαση στους 42°C για 1 ώρα και 58 λεπτά,

ζ) επώαση στους 70°C για 15 λεπτά και ψύξη (cooling) στους 4°C για 5 λεπτά.

η) Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας, προσθήκη 80μl DEPC/d.d. H₂O σε κάθε σωληνίσκο (ούτως ώστε η τελική συγκέντρωση του cDNA να είναι **1μg/100μl**) και αποθήκευση στους -20°C (για σχετικά άμεση χρήση) ή στους -80°C (για μακροχρόνια αποθήκευση).

9.2. Προσδιορισμός έκφρασης mRNA με τη μέθοδο της Αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real Time PCR)

Η Real Time PCR επιτρέπει την παρακολούθηση του πολλαπλασιασμού των προϊόντων κατά τη διάρκεια της αντίδρασης (real time) σε ηλεκτρονικό υπολογιστή. Για την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης χρησιμοποιούνται ζεύγη εκκινητών, τα οποία είναι ειδικά για το κάθε γονίδιο το οποίο μελετάται. Οι αντιδράσεις PCR γίνονται σε συσκευή C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad), μέσα σε ειδικά Multiplate PCR πιάτα (Bio- Rad) 96 θέσεων (βλ. **Εικόνα 17**).



Εικόνα 17: Multiplate PCR πιάτο 96-θέσεων

Υλικά:

- Συσκευή CFX96 Real-Time System (C1000 Thermal Cycler, Bio-Rad, USA)
- SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA)
- DEPC-treated water (Invitrogen)
- Εκκινητές (forward και reverse primers) για τα γονίδια προς εξέταση (VBC-Genomics, Austria)
- Multiplate 96-Well PCR Plates (Bio-Rad)
- Microseal 'B' Adhesive Seals, Optical (Bio-Rad)

Για τη μελέτη cDNA προερχόμενου από RNA που είχε απομονωθεί από ιστό ήπατος, σε κάθε πηγαδάκι του πιάτου PCR, έγινε προσθήκη των εξής:

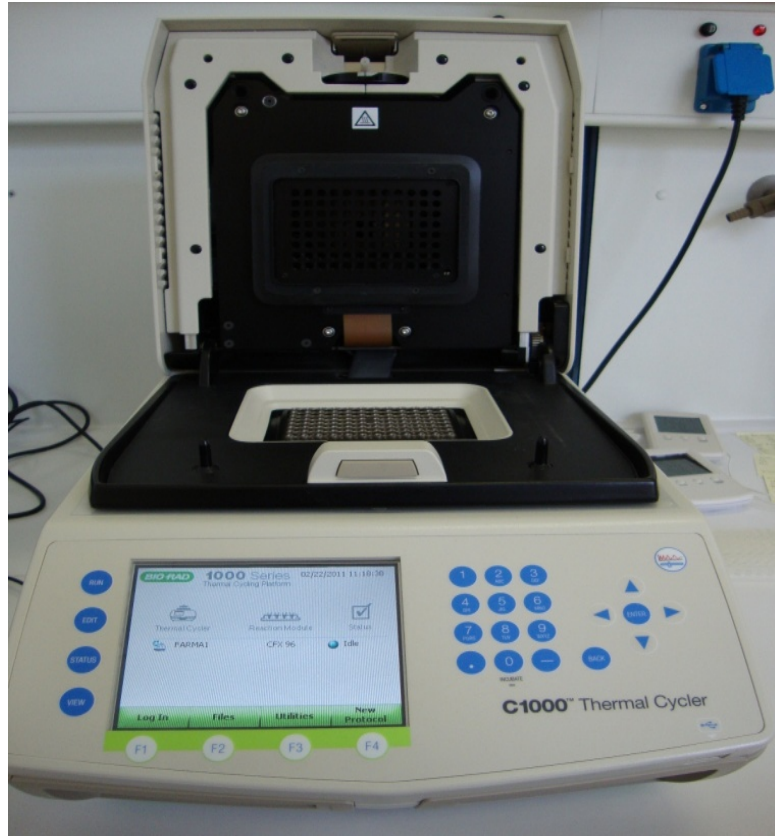
- 1μl εκκινητή forward συγκεκριμένου γονιδίου
- 1μl εκκινητή reverse συγκεκριμένου γονιδίου
- 5μl SYBR Green PCR Master Mix
- 2μl DEPC-treated water
- 1μl δείγματος cDNA

Κάθε δείγμα μετρήθηκε εις διπλούν.

Για τη μελέτη cDNA προερχόμενου από RNA που είχε απομονωθεί από πρωτογενή ηπατοκύτταρα, σε κάθε πηγαδάκι του πιάτου PCR έγινε προσθήκη των εξής:

- 1μl εκκινητή forward συγκεκριμένου γονιδίου
- 1μl εκκινητή reverse συγκεκριμένου γονιδίου
- 5μl SYBR Green PCR Master Mix
- 3μl δείγματος cDNA. Κάθε δείγμα μετρήθηκε εις διπλούν.

Ακολούθως, το πιάτο PCR καλύφθηκε με ειδική αυτοκόλλητη μεμβράνη (Microseal 'B' Adhesive Seal, Biorad), έγινε φυγοκέντρηση στις 3000 στροφές για 3 λεπτά και το πιάτο τοποθετήθηκε στην ειδική βάση της συσκευής PCR (**Εικόνα 18**).



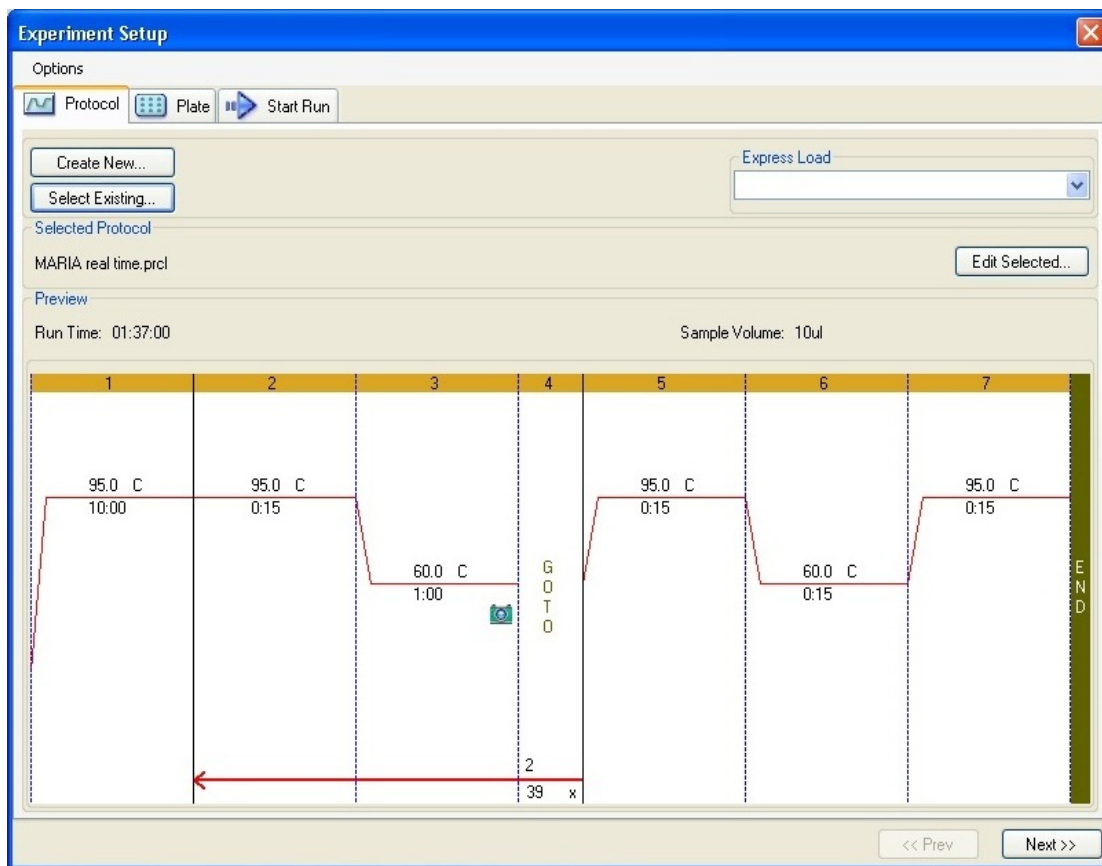
Εικόνα 18: CFX96 Real-Time System (C1000 Thermal Cycler, Bio-Rad)

Ο έλεγχος της διαδικασίας της PCR έγινε μέσω του προγράμματος (Bio-Rad CFX Manager) του Η/Υ, στον οποίο ήταν συνδεδεμένη η συσκευή C1000 Thermal Cycler. Οι θερμικές συνθήκες ήταν οι εξής (βλ. Πίνακα 4 και Εικόνα 19):

ΣΤΑΔΙΟ	ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ (°C)	ΧΡΟΝΙΚΗ ΔΙΑΡΚΕΙΑ
1	95	10 λεπτά
2	95	15 δευτερόλεπτα
3	60	1 λεπτό
4	95	15 δευτερόλεπτα
5	60	15 δευτερόλεπτα
6	95	15 δευτερόλεπτα

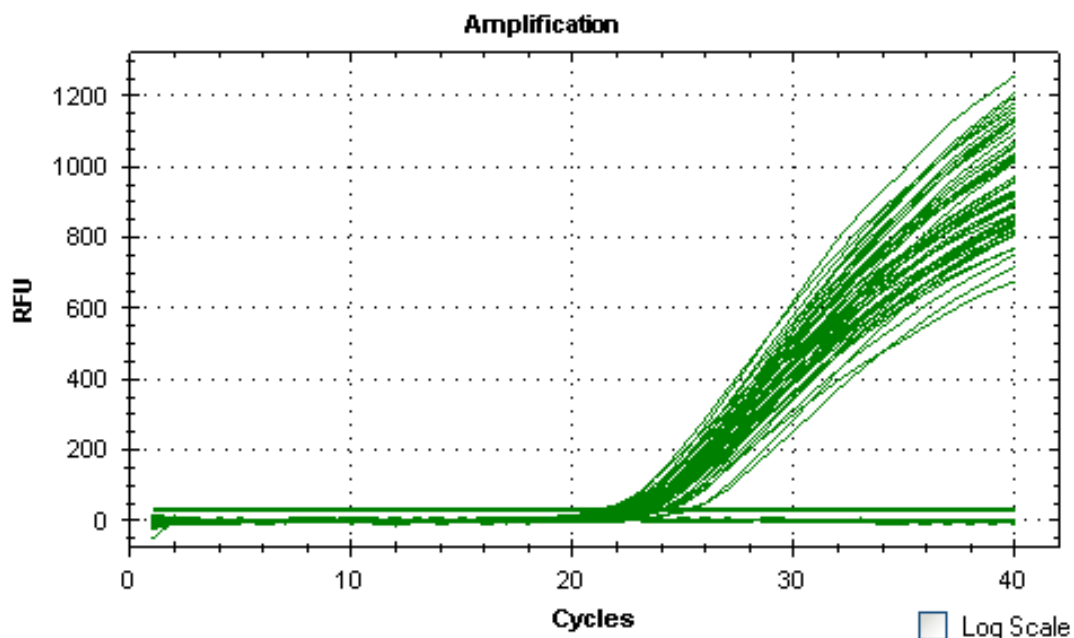
} 40 κύκλοι

Πίνακας 4: Αναλυτικό πρόγραμμα αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο.



Εικόνα 19: Αναλυτικό πρόγραμμα αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο.

Η συνολική διάρκεια της διαδικασίας ήταν 1 ώρα και 37 λεπτά. Όταν ολοκληρώθηκε η διαδικασία της PCR, το πρόγραμμα του H/Y εμφάνισε τις C(t) του κάθε δείγματος, καθώς και την καμπύλη της αντίδρασης PCR (Εικόνα 20) που αντιστοιχούσε σε κάθε δείγμα.



Εικόνα 20: Χαρακτηριστικό γράφημα real-time PCR.

Για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων, έγινε μέτρηση PCR με εκκινητή το house-keeping γονίδιο της β-ακτίνης (Rn_Actb_1_SG QuantiTect Primer Assay, Qiagen, USA). Οι τιμές των C(t) του κάθε γονιδίου προς μελέτη αφαιρέθηκαν από τις αντίστοιχες τιμές C(t) της β-ακτίνης και η τιμή που προέκυψε ήταν η σχετική τιμή που αντιστοιχούσε στην έκφραση του mRNA του αντίστοιχου γονιδίου. Οι διάφοροι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν παρατίθενται στον **Πίνακα 5**.

Γονίδιο	Αλληλουχία βάσεων εκκινητή
CYP3A1	F: 5'-GGAAATTCGATGTGGAGTGCC-3' R: 5'-AGGTTTGCCTTTCTCTTGCC-3'
CYP3A2	F: 5'-GTCAAACGCCTGTGTTTGCC-3' R: 5'-ATCAGGGTGAGTGGCCAGGA-3'
CYP2D1	F: 5'-TGGACCTCAGTAACATGCCA-3' R: 5'-GATGCAAGGATCACACCTTG-3'
CYP2D2	F: 5'-GGTGGACTTTGAGAACATGCC-3' R: 5'-TTGCATCTCTGCTAGGAAGG-3'
CYP2C11	F: 5'-AGGACATCGGCCAATCAA-3' R: 5'-GGGTAAACTCAGACTGCGGA-3'
CAR	F: 5'-GCAGATGGTTGTCCTTTAGG-3' R: 5'-CCCTACCCACTCCCTGCCCC-3'
PXR	F: 5'-GAGCTCTGGGCAGAACATC-3' R: 5'-ACACGGCAGATTTGAAGACC-3'
RXRα	F: 5'-TCAATGGCGTCCTCAAGGTTC-3' R: 5'-TGTCACGGCAGGTGTAGGTTCAG-3'
HNF1α	F: 5'-GGGAAGACTTCGCGCCACCC-3' R: 5'-CCTCTCGCTGCTTGCGGACG-3'
HNF4α	F: 5'-GCCCCAAAACATGCGCTGAG-3' R: 5'-GCAGATGGTTGTCCTTTAGG-3'
eNOS	F: 5'-CTGCTGCCCGAGATATCTTC-3' R: 5'-CAGGTA CTGCAGTCCCTCCT-3'
iNOS	F: 5'-CGTGTGCCTGCTGCCTTCCTGCTGT-3' R: 5'-GTAATCCTCAACCTGCTCCTCACTC-3'

Πίνακας 5: Νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των εκκινητών (primers) των γονιδίων.

10. Στατιστική Ανάλυση

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με το πρόγραμμα SPSS-14 για Microsoft Windows.

Για την ανάλυση των μετρήσεων στις μελέτες πρόκλησης στρες περιορισμού (Restraint Stress) ή στρες μητρικής αποστέρησης (MDS), χρησιμοποιήθηκε ανάλυση μεταβλητότητας κατά μία διεύθυνση (one-way ANOVA) με παράγοντα την επίδραση του RS (σύγκριση ομάδων "μαρτύρων" και ομάδων "στρες περιορισμού"). Η στατιστική επεξεργασία της αυθόρμητης κινητικής δραστηριότητας και των μεταβλητών κινητικότητας στη μελέτη MDS, έγινε με τη μέθοδο ανάλυσης διακύμανσης μονής κατεύθυνσης (one-way ANOVA), με παράγοντα την επίδραση του MDS.

Για την στατιστική ανάλυση των μετρήσεων από τους φαρμακολογικούς χειρισμούς *in vivo* και *in vitro*, χρησιμοποιήθηκε ανάλυση μεταβλητότητας κατά μια διεύθυνση (one-way ANOVA) ή κατά δύο διευθύνσεις (two-way ANOVA), ανάλογα με τον αριθμό των ομάδων που είχαν συμπεριληφθεί σε κάθε μελέτη.

Η τιμή του $p < 0.05$ καθορίστηκε ως όριο για την αποδοχή της στατιστικής σημαντικότητας.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

- 1. Ρόλος του στρες και των αδρενεργικών οδών
στη ρύθμιση της έκφρασης των κυτοχρωμάτων *CYPs***

1.1. Επίπεδα ορμονών μετά από έκθεση επιμύων σε στρες

Τόσο οι επίμυες που εκτέθηκαν σε RS (βλ. Πίνακα 1), όσο και οι επίμυες που αντέδρασαν στο στρες της μητρικής αποστέρησης (MDR) (βλ. Πίνακα 2), παρουσίασαν υψηλότερα επίπεδα κορτικοστερόνης στο πλάσμα, σε σύγκριση με τους επίμυες που δεν εκτέθηκαν σε στρες (μάρτυρες).

Πίνακας 1

Ομάδα	Επίπεδα κορτικοστερόνης στο πλάσμα (pg/ml)
Μάρτυρες	139.1 ± 37.6
RS	295.9 ± 40.9 *

Επίπεδα κορτικοστερόνης στο πλάσμα επιμύων. RS, στρες περιορισμού. Οι τιμές εκφράζονται σε mean ± SE; * αντιστοιχεί σε στατιστική σημαντικότητα p<0.05.

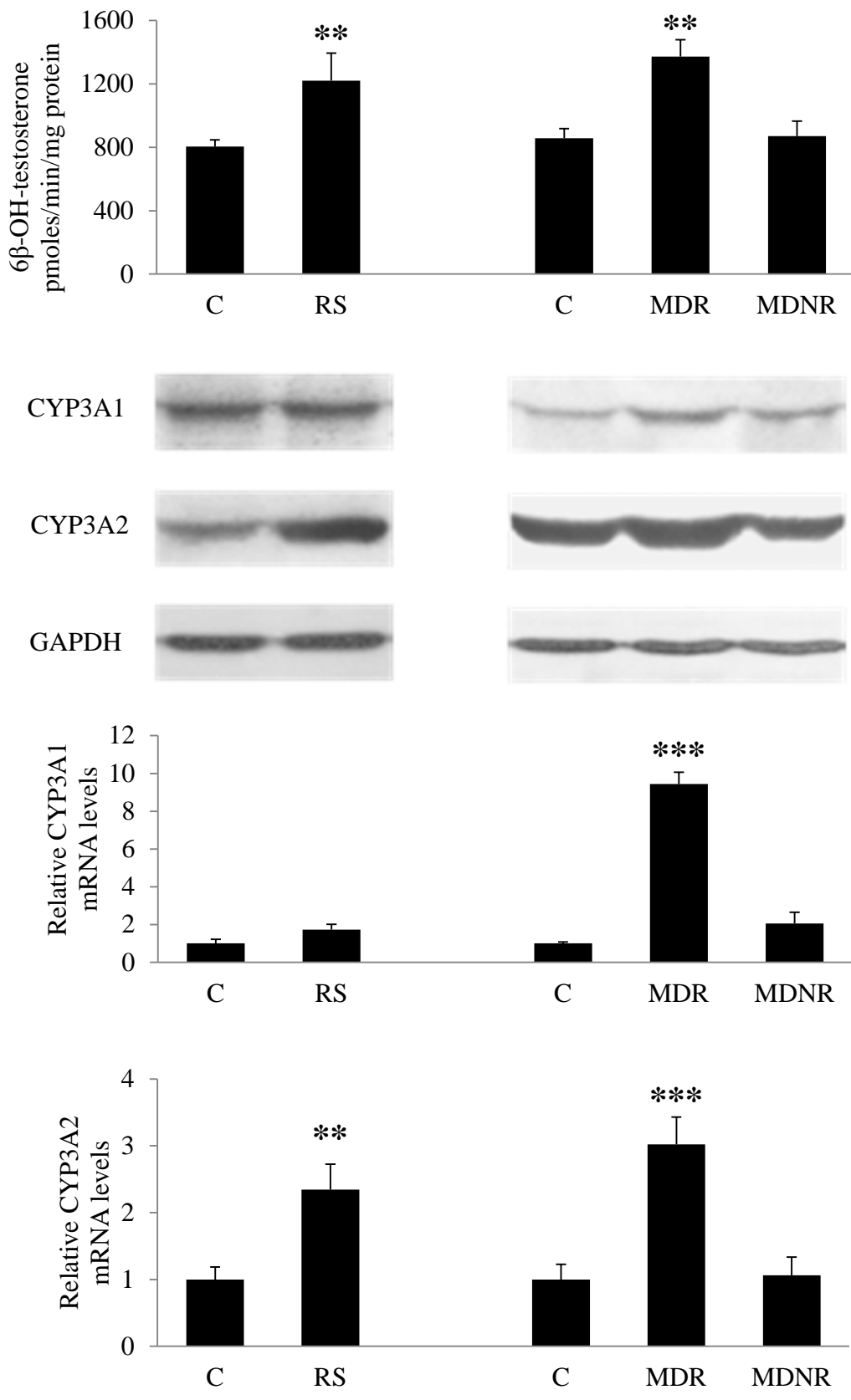
Πίνακας 2

Ομάδα	Επίπεδα κορτικοστερόνης στο πλάσμα (pg/ml)
Μάρτυρες	124.2 ± 30.8
MDR	370.5 ± 80.4 ***
MDNR	169.3 ± 48.9

Επίπεδα κορτικοστερόνης στο πλάσμα επιμύων. MDR, επίμυες αντιδρώντες στο στρες μητρικής αποστέρησης; MDNR, επίμυες μη-αντιδρώντες στο στρες μητρικής αποστέρησης. Οι τιμές εκφράζονται σε mean ± SE; *** αντιστοιχεί σε στατιστική σημαντικότητα p<0.001.

1.2. In vivo διερεύνηση της επίδρασης του στρες στην έκφραση των CYPs

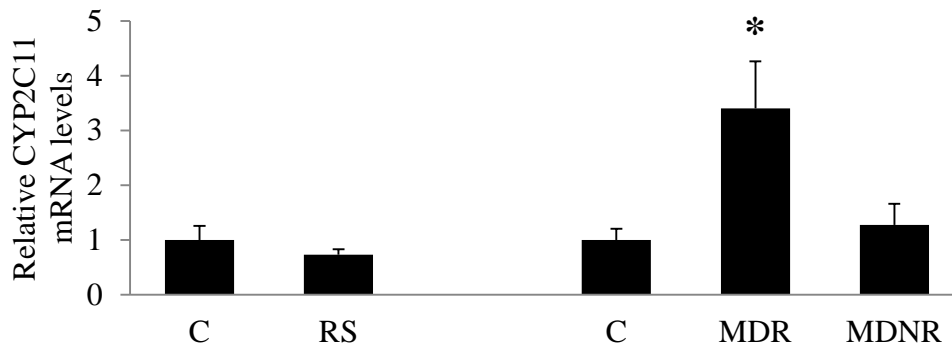
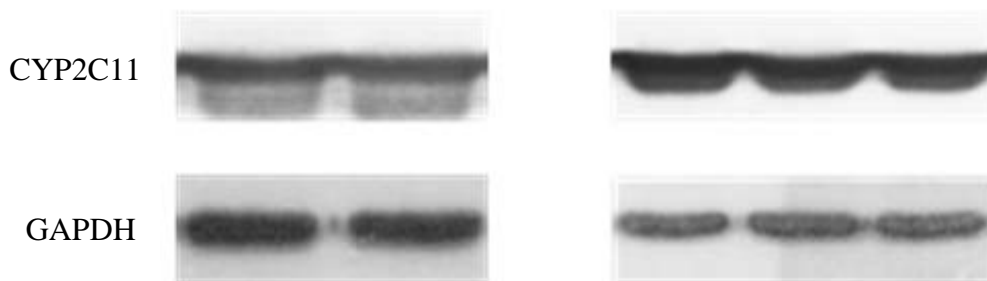
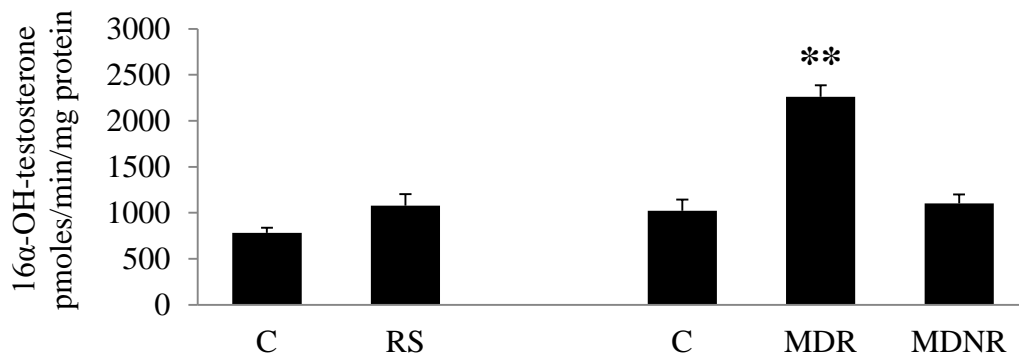
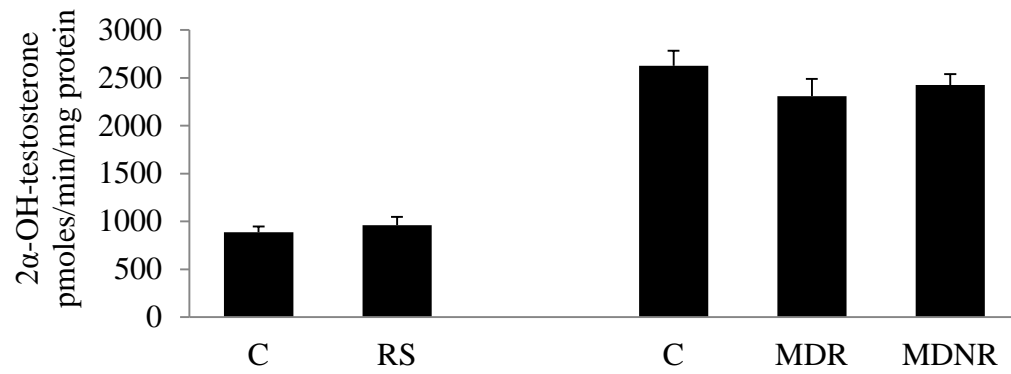
1.2.1. CYP3A1/2



Σε σύγκριση με τους μάρτυρες (C), έκθεση των επιμύων σε RS προκάλεσε επαγωγή της έκφρασης του *CYP3A2* σε επίπεδο mRNA, αποπρωτεΐνης και ενζυμικής δραστηριότητας (6β-υδροξυλίωση της τεστοστερόνης).

Οι επίμυες, οι οποίοι αντέδρασαν στο στρες μητρικής αποστέρησης (MDR) εμφάνισαν επαγωγή των ηπατικών κυτοχρωμάτων *CYP3A1* και *CYP3A2* σε σύγκριση με τους μάρτυρες. Ειδικότερα, παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση των ισομορφών *CYP3A1* και *CYP3A2* σε επίπεδο mRNA, αποπρωτεΐνης και 6β-υδροξυλίωσης της τεστοστερόνης. Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι η μεταβολή στα επίπεδα mRNA του *CYP3A1* στο ήπαρ των επιμύων MDR ήταν πολύ μεγαλύτερη από την αντίστοιχη των επιμύων RS.

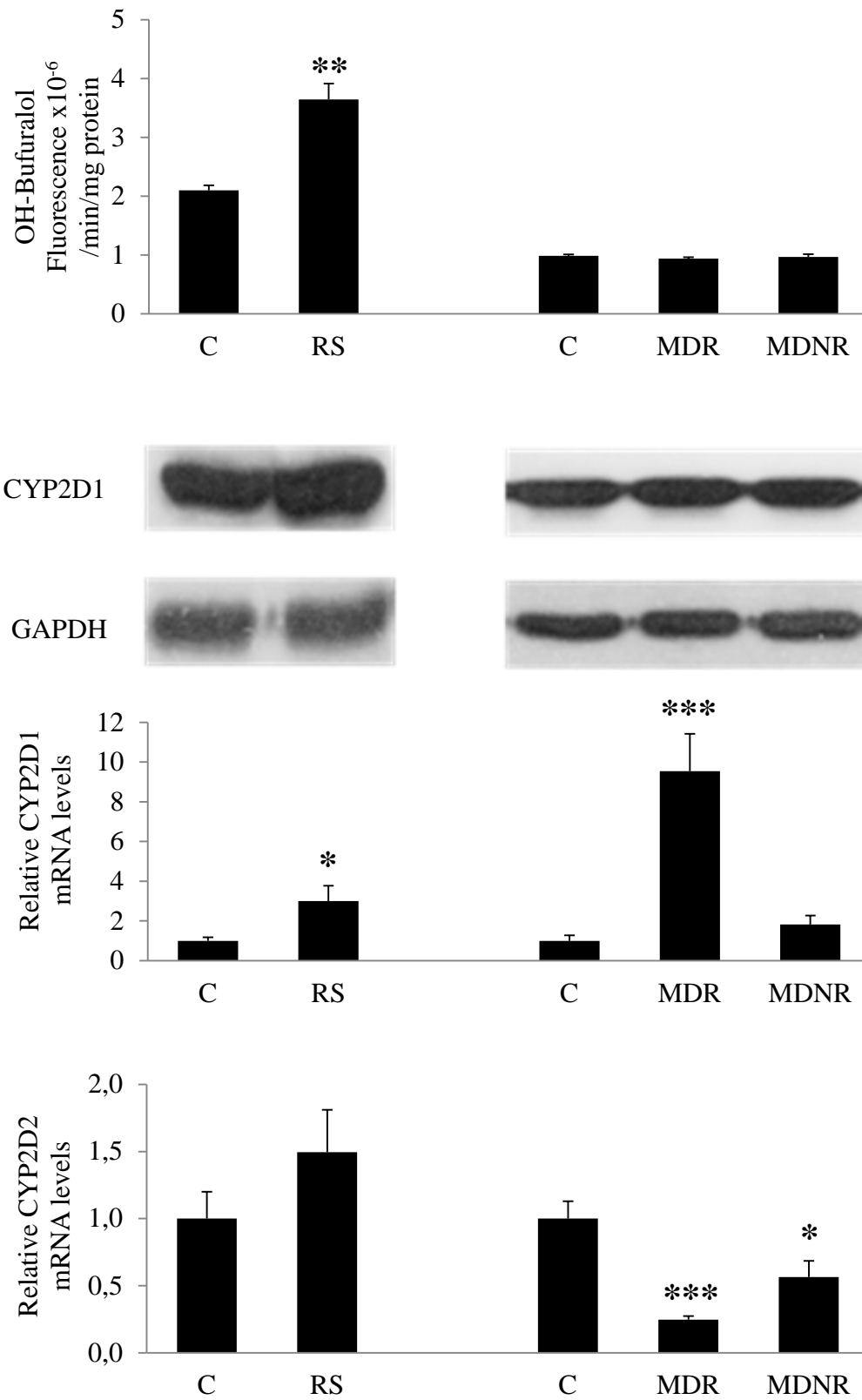
1.2.2. CYP2C11



Η έκθεση σε RS δεν προκάλεσε μεταβολές στην 2α- και 16α-υδροξυλίωση της τεστοστερόνης, η οποία καταλύεται από ισομορφές της υποοικογένειας CYP2C. Αλλαγές δεν παρατηρήθηκαν ούτε στα επίπεδα αποπρωτεΐνης και mRNA του CYP2C11.

Έκθεση σε MDS οδήγησε σε αύξηση της ενζυμικής δραστηριότητας του CYP2C11 (16α-υδροξυλίωση της τεστοστερόνης) και των επιπέδων mRNA του *CYP2C11* στους επίμυες MDR, συγκριτικά με τους μάρτυρες αλλά και στους επίμυες που δεν αντέδρασαν στο στρες μητρικής αποστέρησης (MDNR). Η 2α-υδροξυλίωση της τεστοστερόνης δεν παρουσίασε καμία μεταβολή μετά την έκθεση σε RS ή MDS.

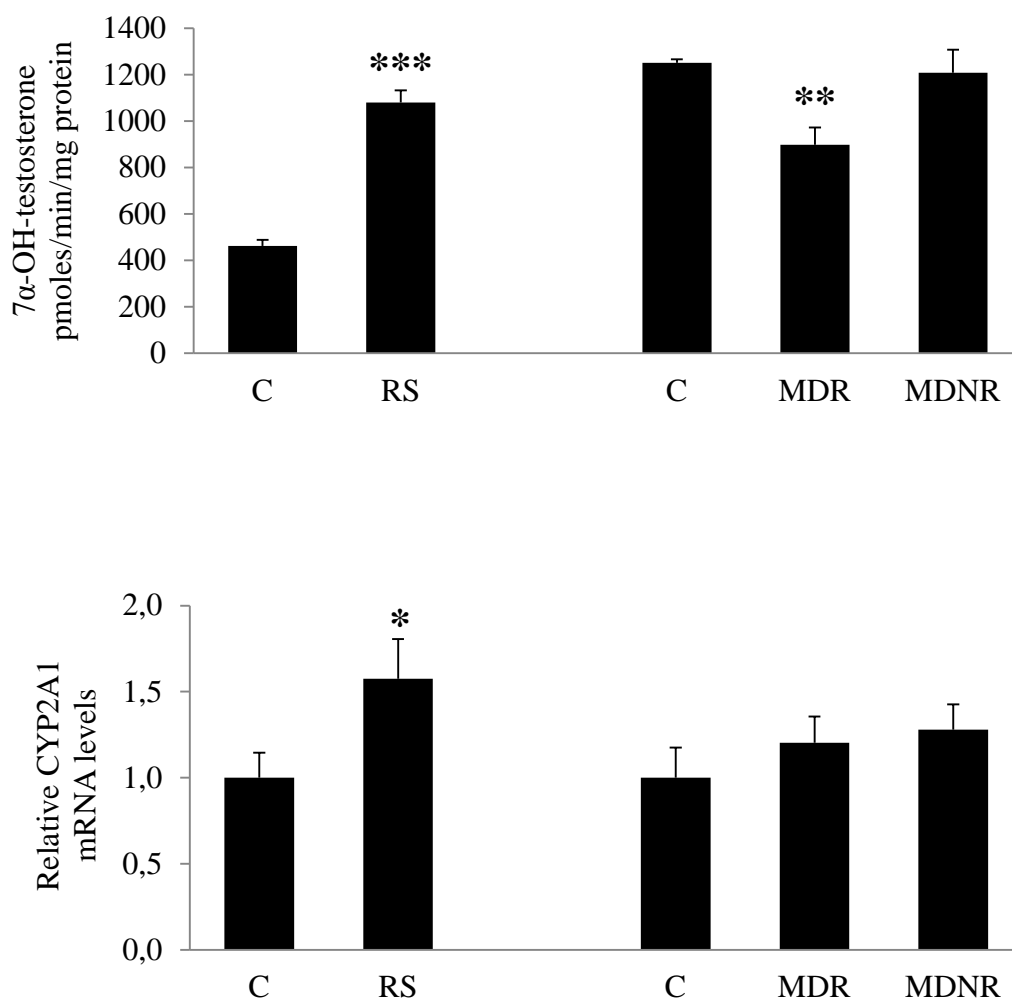
1.2.3. CYP2D1/2



Έκθεση επιμύων σε RS οδήγησε σε αύξηση της ηπατικής έκφρασης του *CYP2D1*. Η αύξηση αυτή παρατηρήθηκε τόσο σε επίπεδο υδροξυλίωσης της μπουφουραλόλης (καταλύεται από το *CYP2D*), όσο και σε επίπεδο αποπρωτεΐνης και mRNA του *CYP2D1*. Τα επίπεδα mRNA του *CYP2D2* δεν εμφάνισαν σημαντική διαφορά μετά από δοκιμασία RS.

Παρά το γεγονός ότι τα επίπεδα mRNA του *CYP2D1* αυξήθηκαν σημαντικά στους επίμυες MDR, δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές σε επίπεδο αποπρωτεΐνης και ενζυμικής δραστηριότητας (1'-υδροξυλίωση της μπουφουραλόλης). Επίσης, τα επίπεδα mRNA του *CYP2D2* στους επίμυες MDR ήταν χαμηλότερα σε σύγκριση με τους μάρτυρες.

1.2.4. CYP2A1

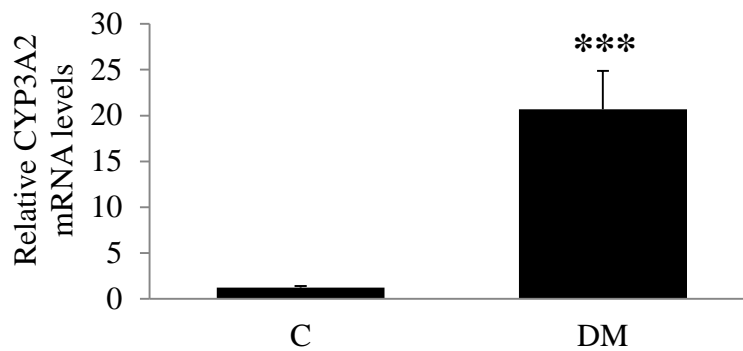
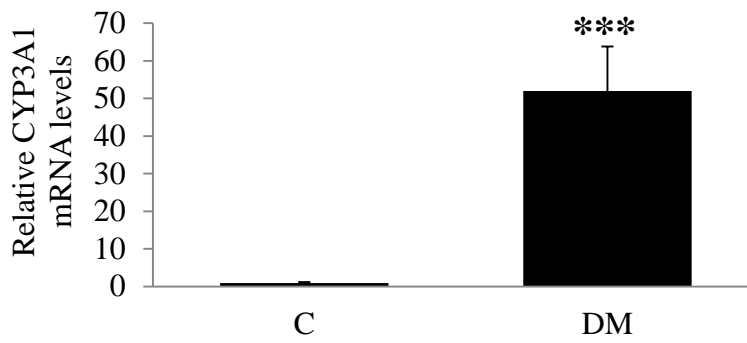
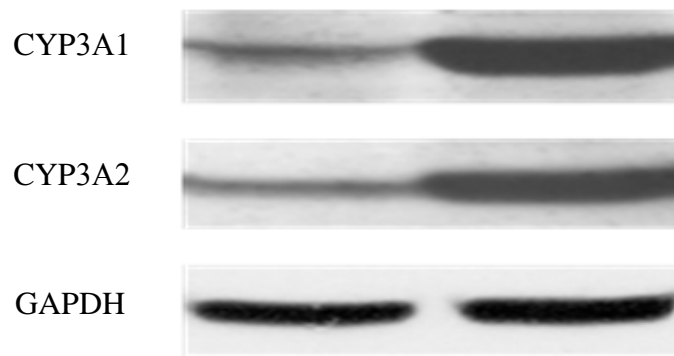
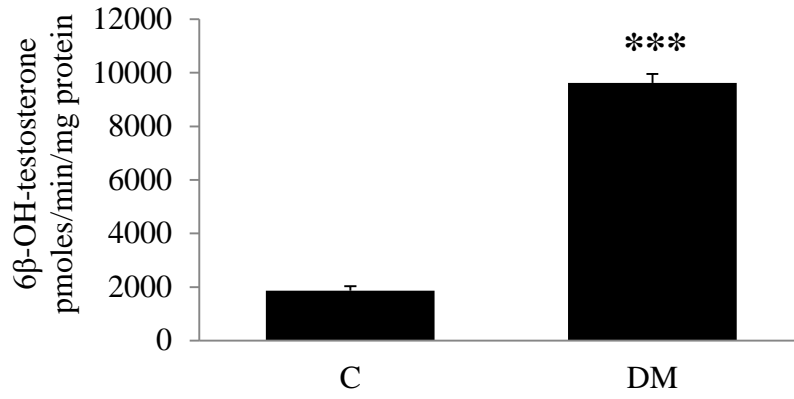


Έκθεση επιμύων σε RS οδήγησε σε αύξηση των επιπέδων mRNA του *CYP2A1* στο ήπαρ. Η αύξηση αυτή επίσης, παρατηρήθηκε και σε επίπεδο 7α-υδροξυλίωσης της τεστοστερόνης (καταλύεται από το *CYP2A1*).

Δεν παρατηρήθηκε σημαντική μεταβολή του *CYP2A1* σε επίπεδο mRNA στο ήπαρ επιμύων MDR, ενώ η *CYP2A1* δραστηριότητα στους MDR επίμυες σημείωσε μικρή μείωση σε σχέση με τους μάρτυρες.

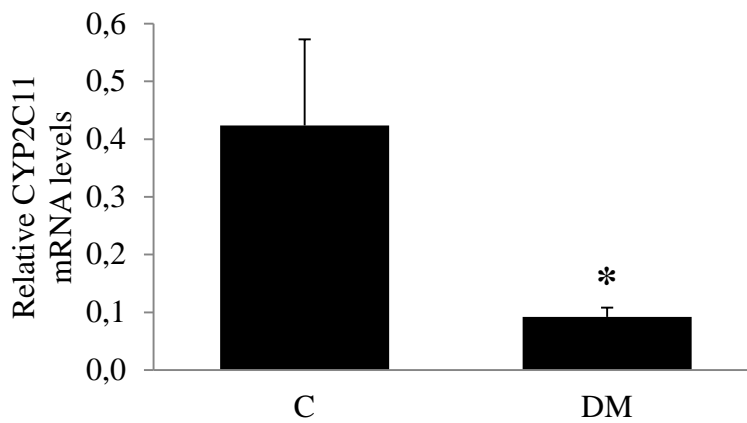
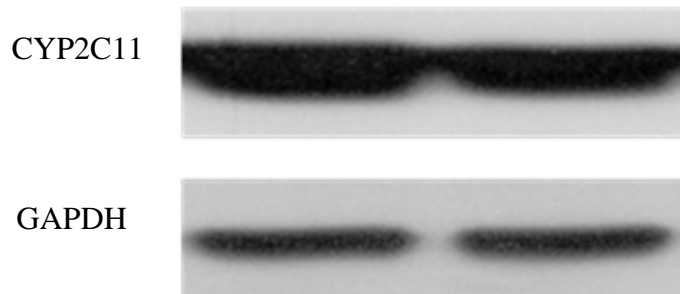
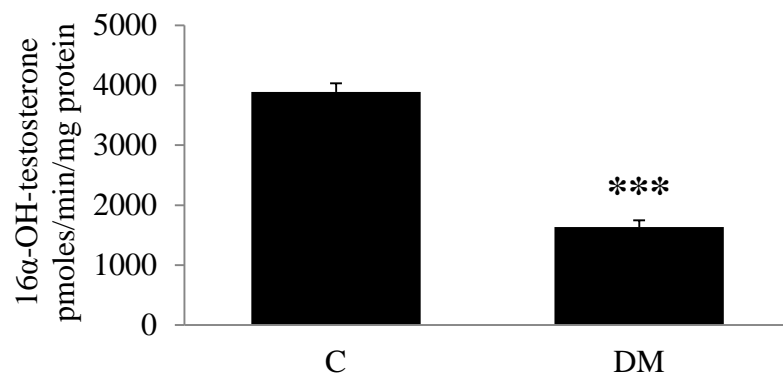
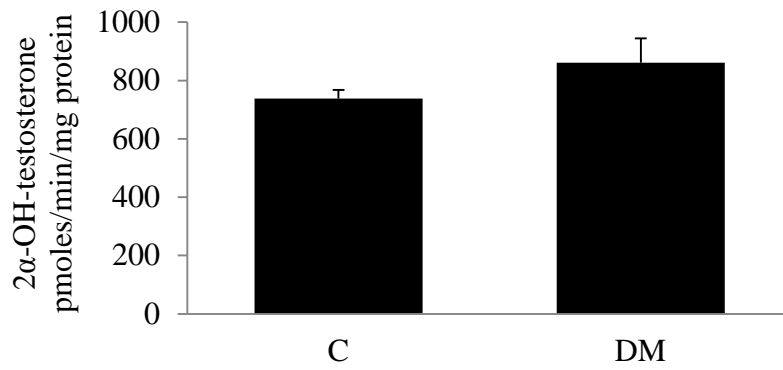
1.3. *In vivo* διερεύνηση της επίδρασης των γλυκοκορτικοειδών στην έκφραση των CYPs

1.3.1. CYP3A1/2



Η χορήγηση δεξαμεθαζόνης (DM) σε επίμυες επιβεβαίωσε την ισχυρή επαγωγική δράση των γλυκοκορτικοειδών στην έκφραση των *CYP3A1/2*, σε σχέση με τους μάρτυρες (C). Η αύξηση της έκφρασης των δύο ισομορφών του CYP3A παρατηρήθηκε σε επίπεδο δραστηριότητας των ενζύμων (6β-υδροξυλίωση της τεστοστερόνης) και σε επίπεδο αποπρωτεΐνης και mRNA των *CYP3A1/2*.

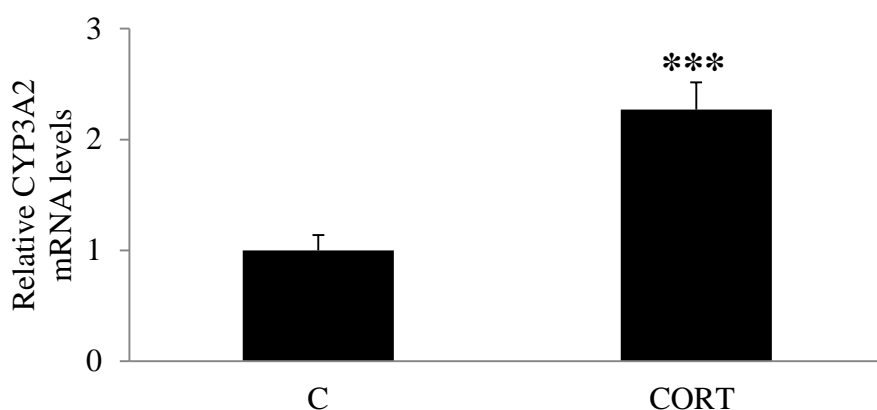
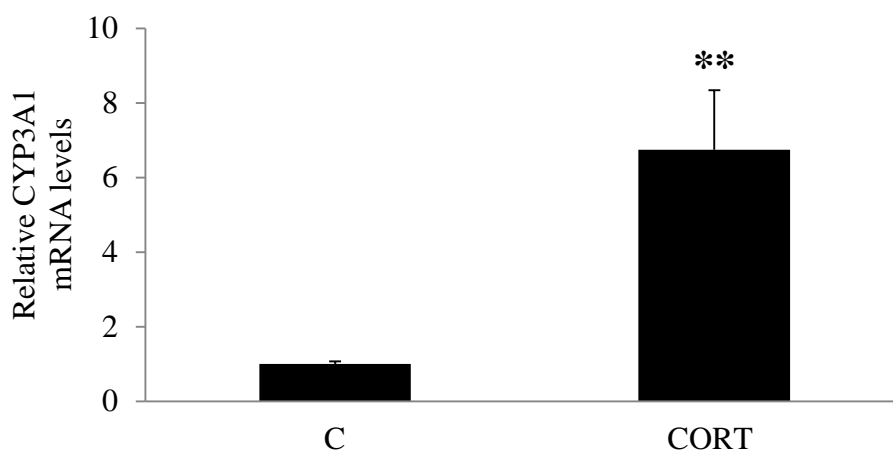
1.3.2. CYP2C11

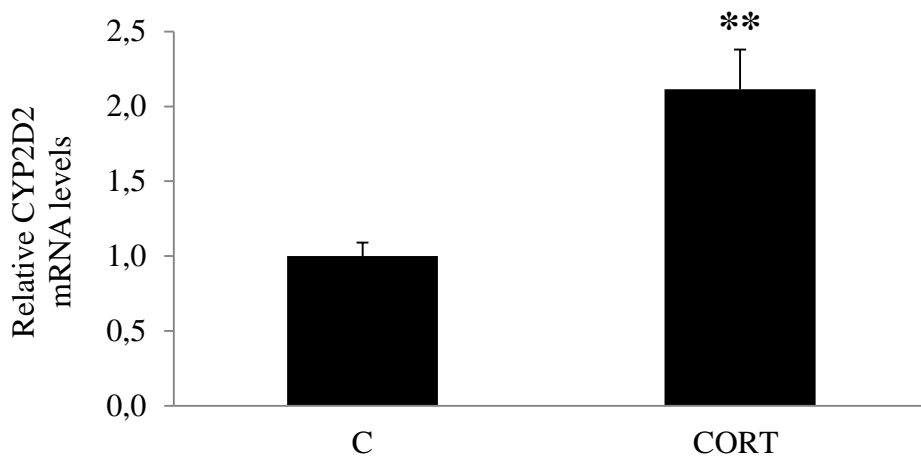
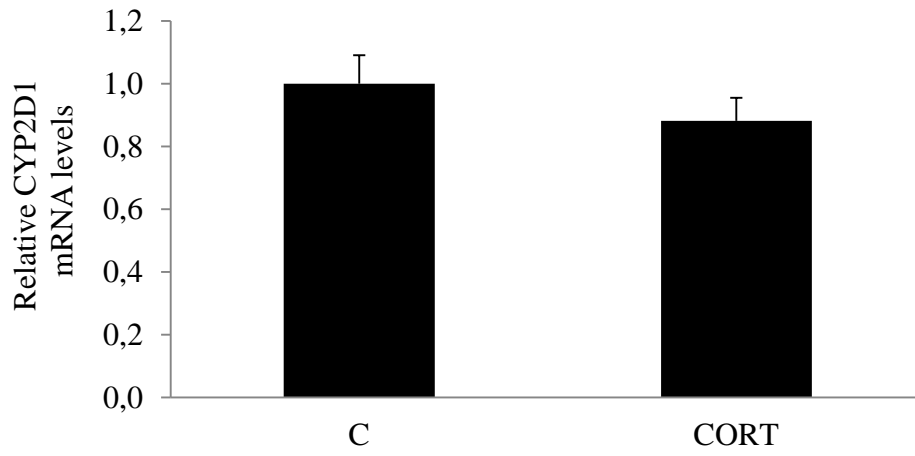
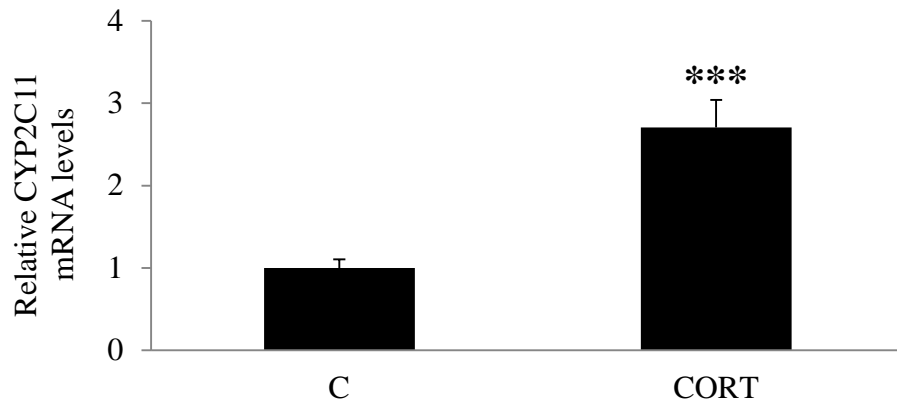


Η χορήγηση DM σε επίμυες προκάλεσε μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας του CYP2C11 (16α-υδροξυλίωση της τεστοστερόνης), καθώς και μείωση των επιπέδων της CYP2C11 αποπρωτεΐνης και mRNA σε σχέση με τους μάρτυρες (C). Η 2α-υδροξυλίωση της τεστοστερόνης δεν εμφάνισε σημαντική μεταβολή.

1.4. *In vitro* διερεύνηση της επίδρασης των γλυκοκορτικοειδών στην έκφραση των *CYPs*

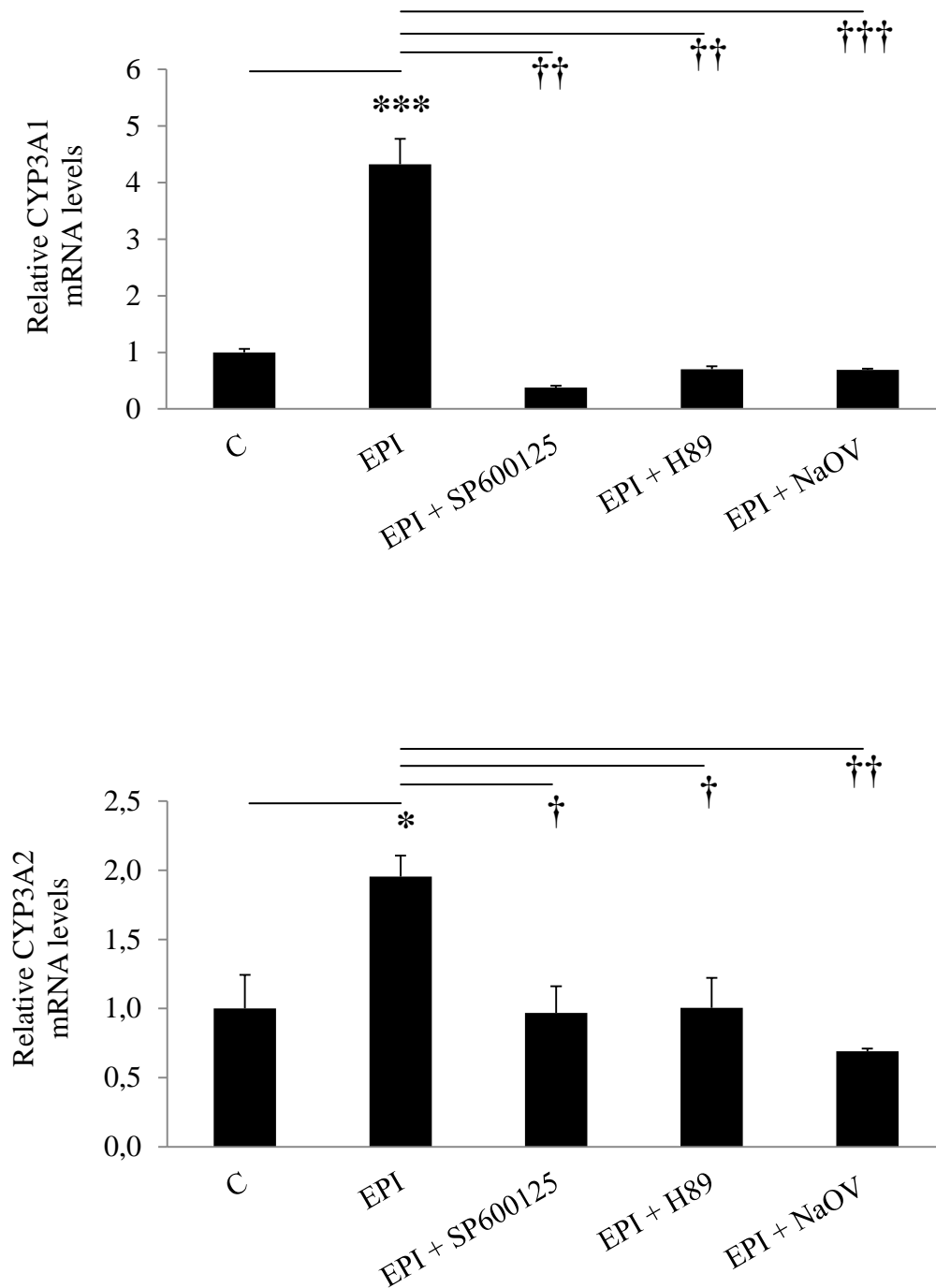
Η έκθεση καλλιεργείων πρωτογενών ηπατοκυττάρων στο γλυκοκορτικοειδές κορτικοστερόνη (CORT) οδήγησε σε ισχυρή αύξηση των επιπέδων mRNA του *CYP3A1*, του *CYP3A2*, του *CYP2C11* και του *CYP2D2*. Αντιθέτως, η κορτικοστερόνη δεν προκάλεσε μεταβολές στα επίπεδα mRNA του *CYP2D1*.



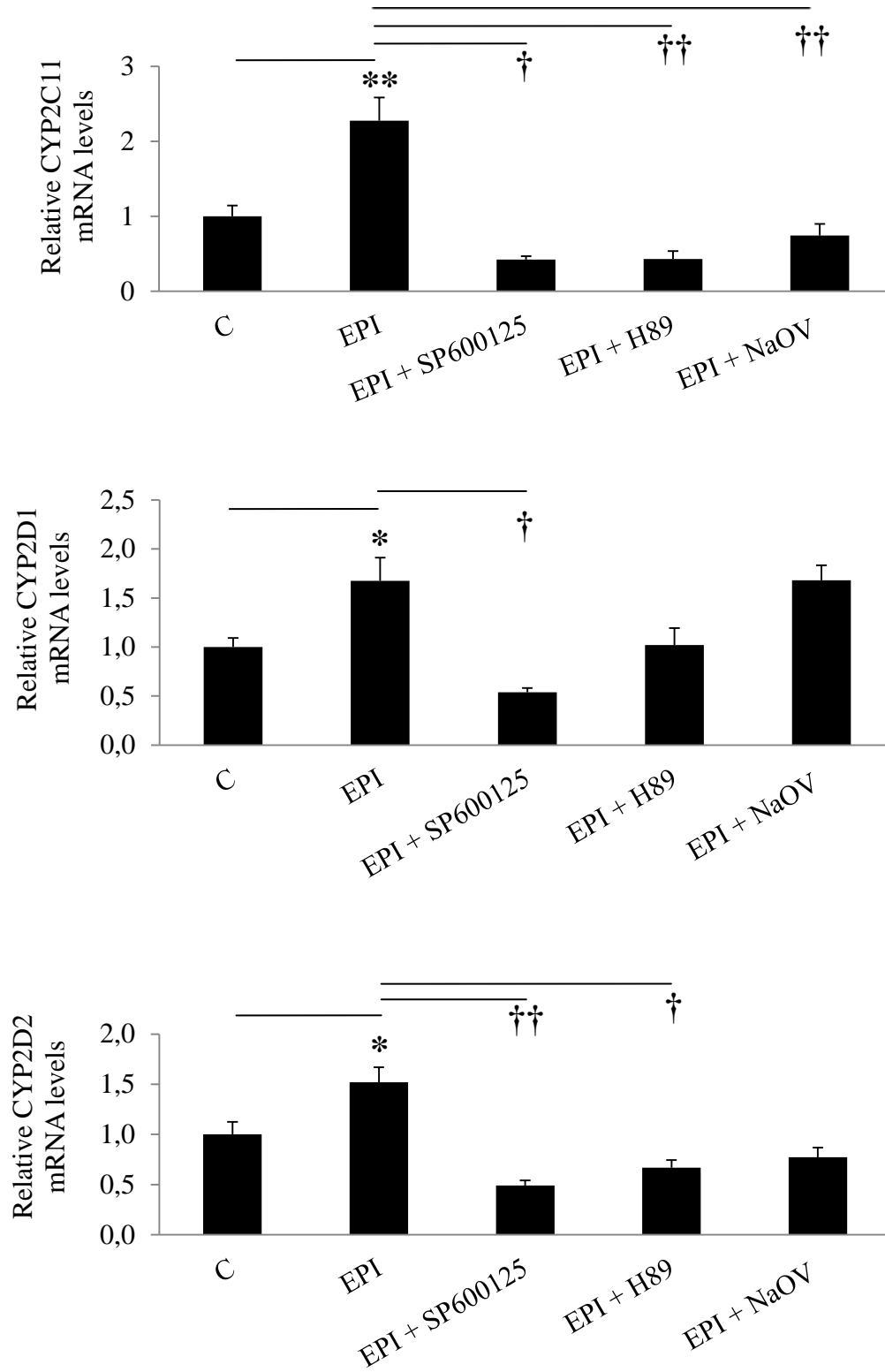


1.5. *In vitro* διερεύνηση του ρόλου της EPI στην έκφραση των CYPs

Έκθεση πρωτογενών ηπατοκυττάρων σε επινεφρίνη (EPI) οδήγησε σε αύξηση της έκφρασης των *CYP3A1/2*. Προηγούμενη έκθεση των ηπατοκυττάρων είτε σε SP600125 (αναστολέα JNK), είτε σε H89 ή NaOV (αναστολείς cAMP/PKA) εμπόδιζε την επαγωγική δράση της EPI.



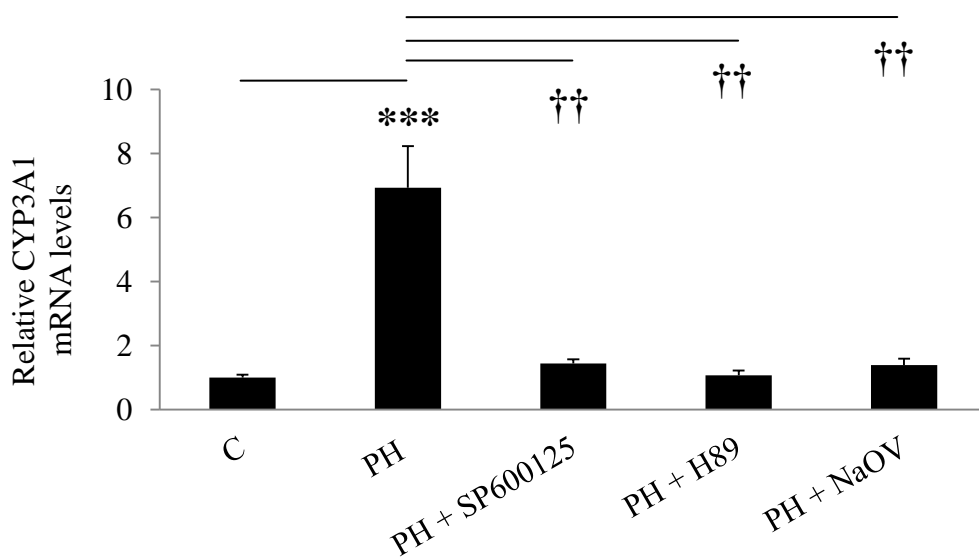
Παρόμοια ήταν τα αποτελέσματα από την επίδραση της EPI στην έκφραση των *CYP2C11* και *CYP2D1/2*. Η EPI προκαλεί επαγωγή των ανωτέρω ισομορφών σε επίπεδο mRNA και ο SP600125 την εμποδίζει.



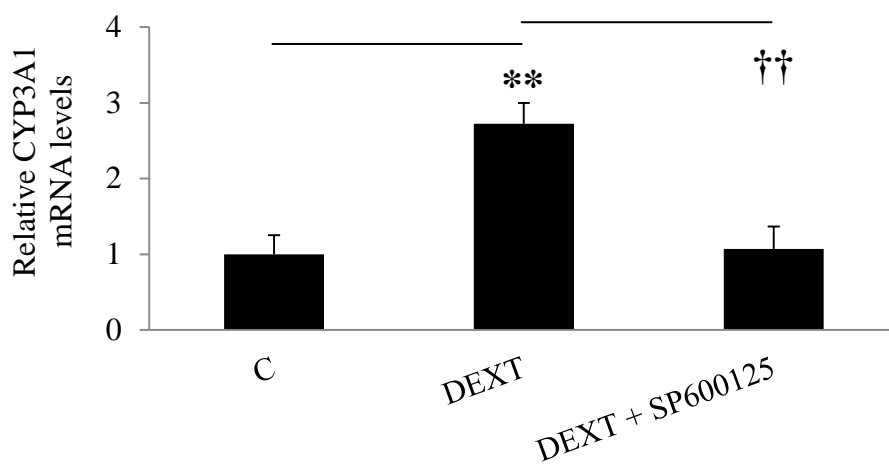
1.6. *In vitro* διερεύνηση του ρόλου των αδρενεργικών οδών στην έκφραση των *CYPs*

1.6.1. *CYP3A1*

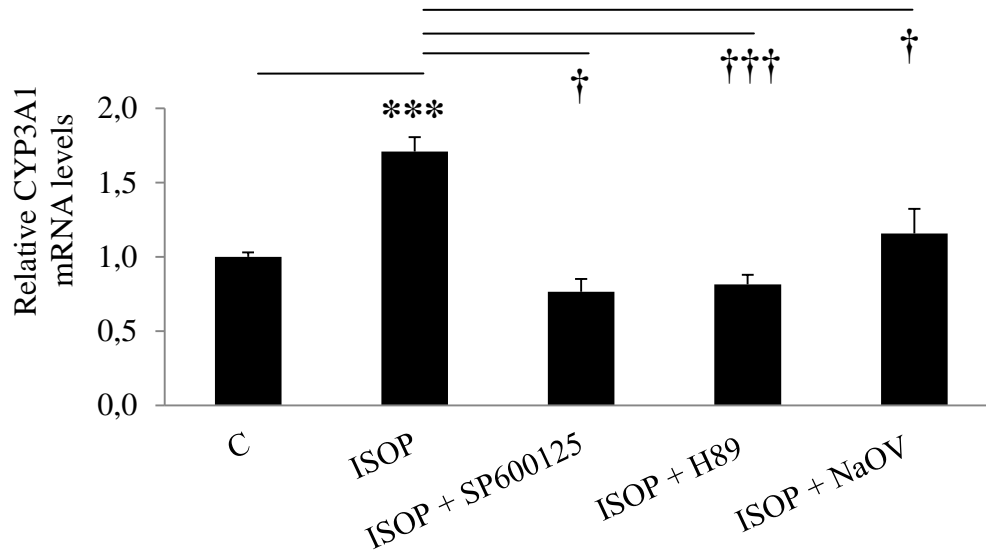
Έκθεση καλλιιεργειών πρωτογενών ηπατοκυττάρων σε PH προκάλεσε την ισχυρή αύξηση των επιπέδων mRNA του *CYP3A1*. Η επαγωγική αυτή δράση της PH αναστράφηκε όταν τα κύτταρα εκτέθηκαν πριν την PH σε SP600125, H89 ή NaOV.



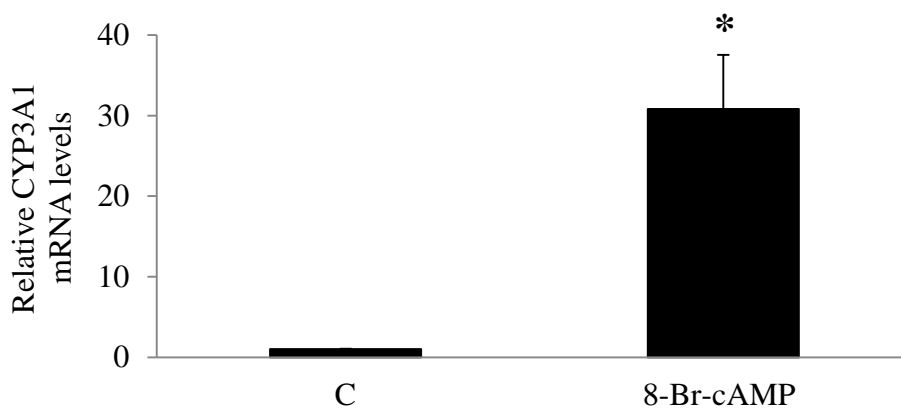
Διέγερση των α_2 -αδρενεργικών υποδοχέων των πρωτογενών ηπατοκυττάρων με DEXT προκάλεσε σημαντική αύξηση της έκφρασης του *CYP3A1*, την οποία εμπόδισε προηγούμενη έκθεση σε SP600125.



Διέγερση των β-αδρενεργικών υποδοχέων με ISOP αύξησε τα επίπεδα mRNA του *CYP3A1*, ενώ προηγούμενη έκθεση των ηπατοκυττάρων σε SP600125, H89 ή NaOV δέσμευσε την επαγωγική δράση της ISOP.

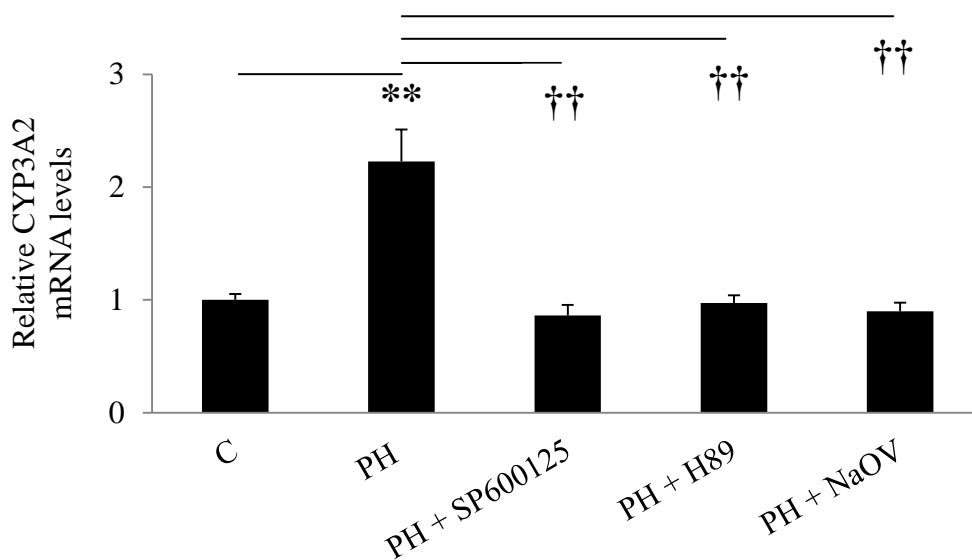


Διέγερση του μονοπατιού σηματοδότησης cAMP/PKA των πρωτογενών ηπατοκυττάρων με 8-bromo-cAMP (συνθετικό ανάλογο του cAMP), αύξησε σημαντικά τα επίπεδα του *CYP3A1* mRNA.

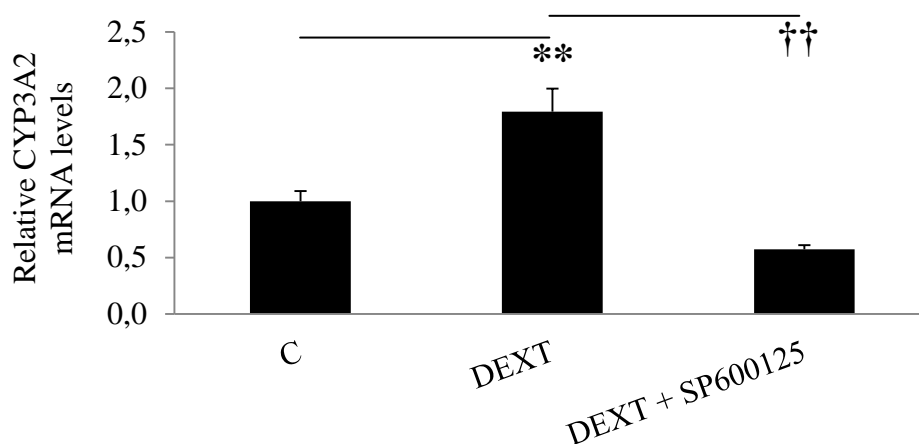


1.6.2. CYP3A2

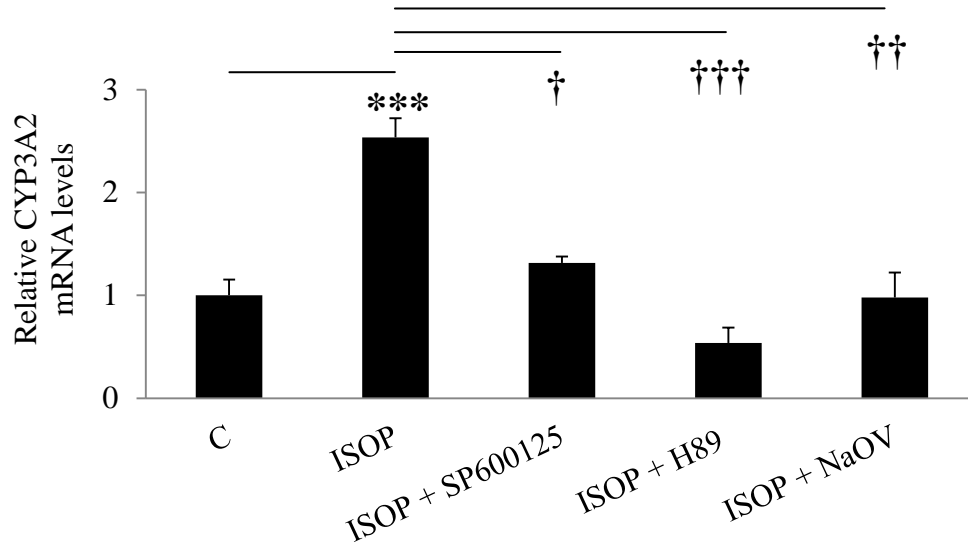
Διέγερση των α_1 -αδρενεργικών υποδοχέων των πρωτογενών ηπατοκυττάρων με PH προκάλεσε σημαντική αύξηση των επιπέδων mRNA του *CYP3A2*. Προηγούμενη έκθεση των ηπατοκυττάρων σε SP600125, H89 ή NaOV μείωσε αυτή την επαγωγική δράση.



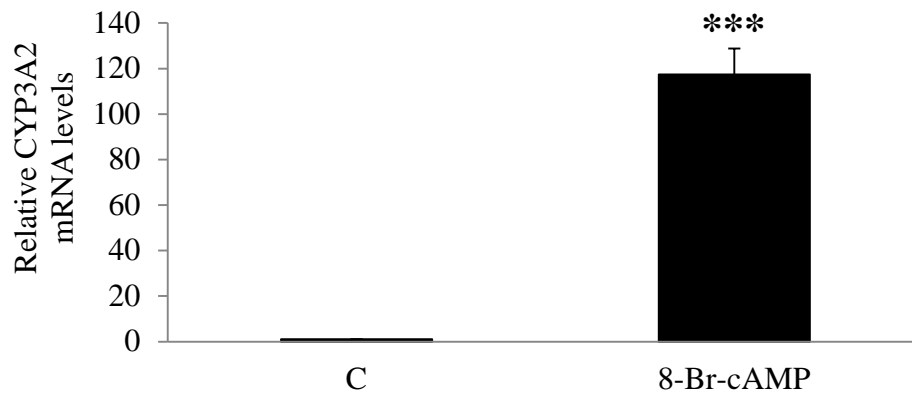
Διέγερση των α_2 -αδρενεργικών υποδοχέων των πρωτογενών ηπατοκυττάρων με DEXT οδήγησε σε σημαντική αύξηση την έκφραση του *CYP3A2*. Η επίδραση αυτή της DEXT δεσμεύτηκε πλήρως με χορήγηση SP600125.



Διέγερση των β-αδρενεργικών υποδοχέων με ISOP αύξησε τα επίπεδα mRNA του *CYP3A2*, ενώ προηγούμενη χορήγηση SP600125, H89 ή NaOV εμπόδισε πλήρως την επαγωγική δράση της ISOP.

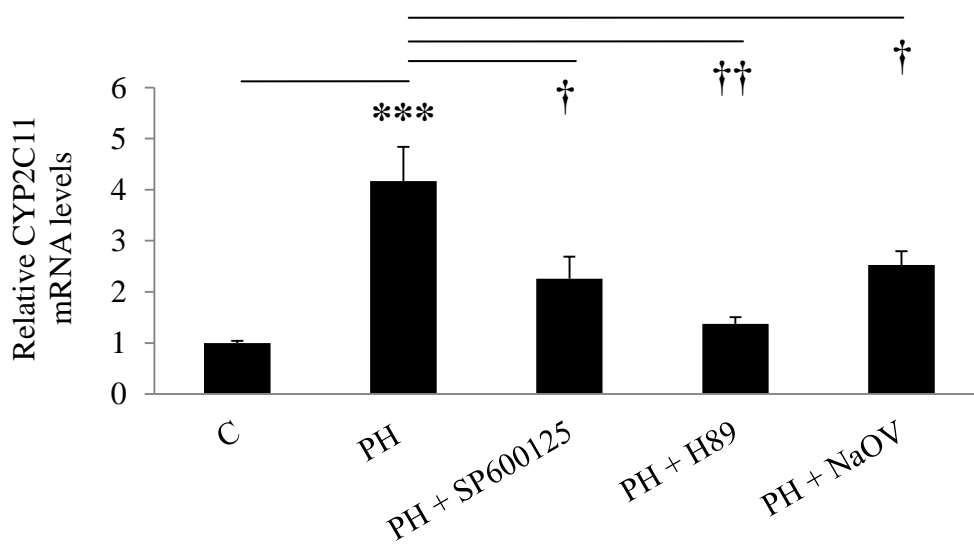


Επώαση των πρωτογενών ηπατοκυττάρων με 8-bromo-cAMP (συνθετικό ανάλογο του cAMP) αύξησε δραματικά τα επίπεδα mRNA του *CYP3A2*.

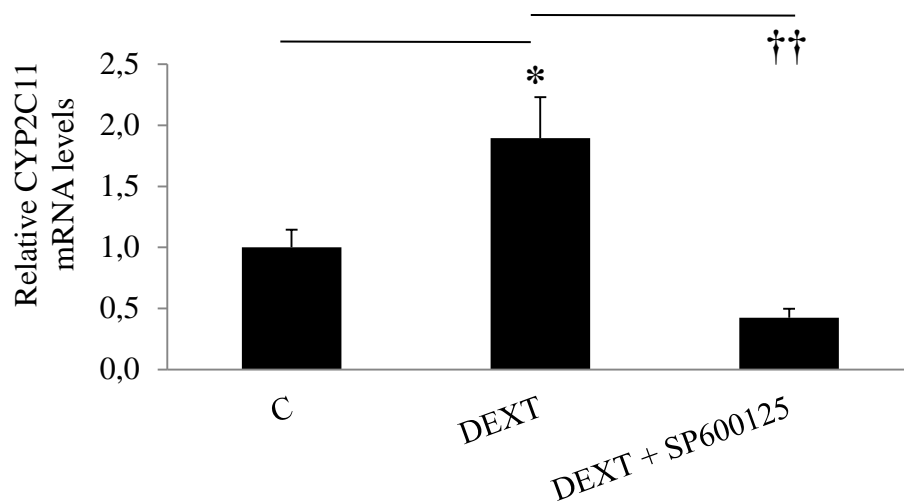


1.6.3. CYP2C11

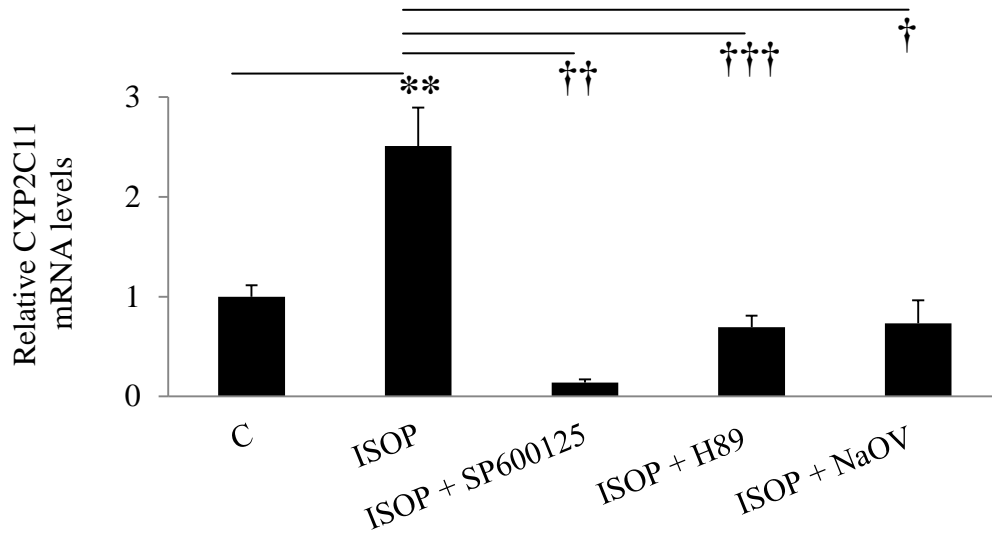
Η απ' ευθείας διέγερση των α_1 -αδρενεργικών υποδοχέων των πρωτογενών ηπατοκυττάρων με PH προκάλεσε σημαντική αύξηση των επιπέδων mRNA του *CYP2C11*. Αυτή η αύξηση εμποδίστηκε από τους αναστολείς SP600125, H89 ή NaOV.



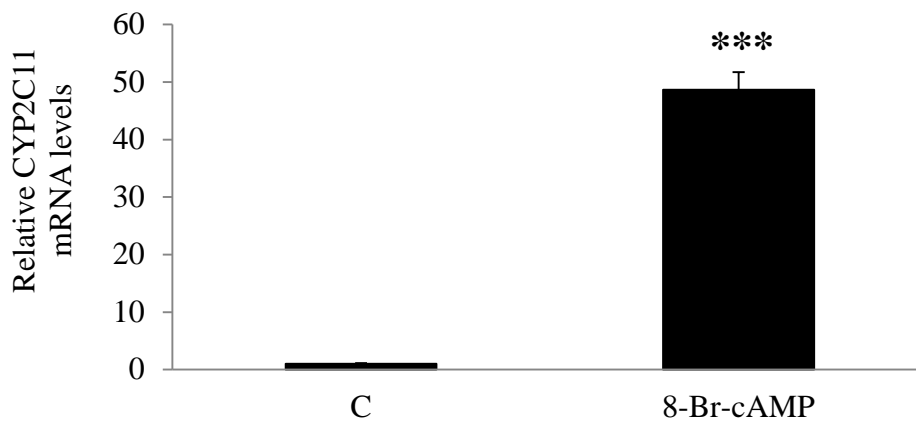
Διέγερση των α_2 -αδρενεργικών υποδοχέων των πρωτογενών ηπατοκυττάρων με DEXT, προκάλεσε αύξηση των επιπέδων mRNA του *CYP2C11*, επίδραση η οποία δεσμεύτηκε με SP600125.



Έκθεση ηπατοκυττάρων σε ISOP προκάλεσε επαγωγή στην έκφραση του *CYP2C11*, η οποία όμως αναστάλη από τους SP600125, H89 ή NaOV.

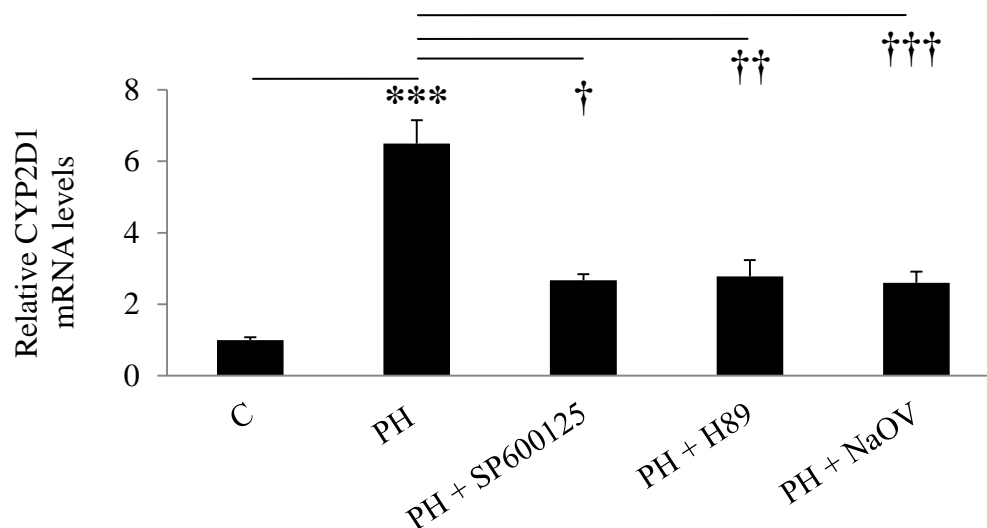


Έκθεση των πρωτογενών ηπατοκυττάρων σε 8-bromo-cAMP, αύξησε σημαντικά (48 φορές) τα επίπεδα mRNA του *CYP2C11*.

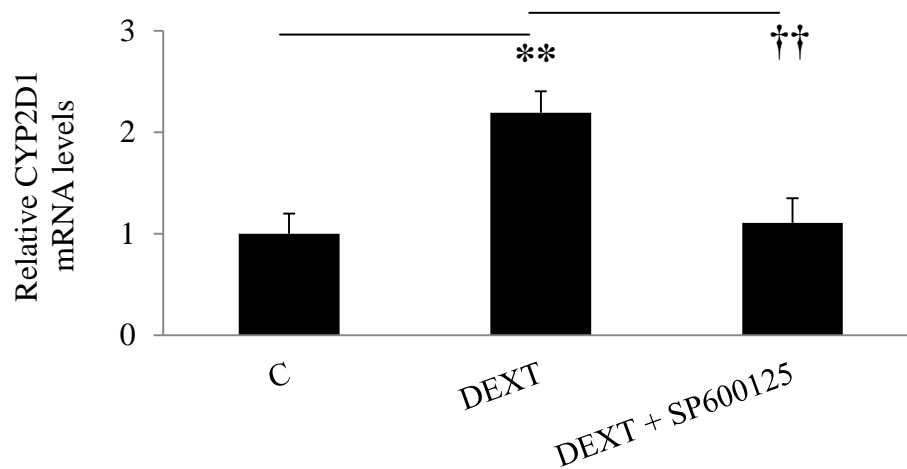


1.6.4. CYP2D1

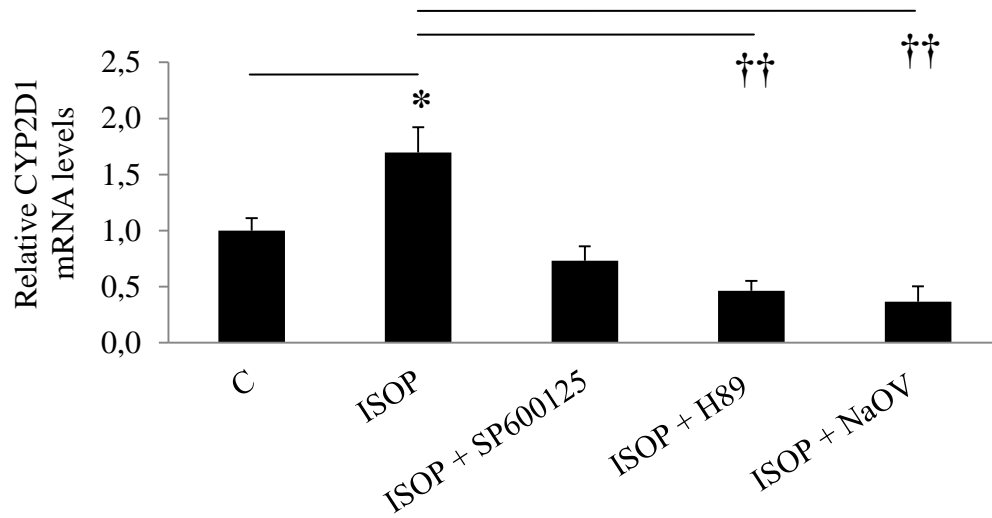
Διέγερση των α_2 -αδρενεργικών υποδοχέων με PH αύξησε σημαντικά τα επίπεδα mRNA του *CYP2D1*. Το γεγονός αυτό αναστράφη από τον αναστολέα της JNK, SP600125, ή τους αναστολείς cAMP/PKA, H89 ή NaOV.



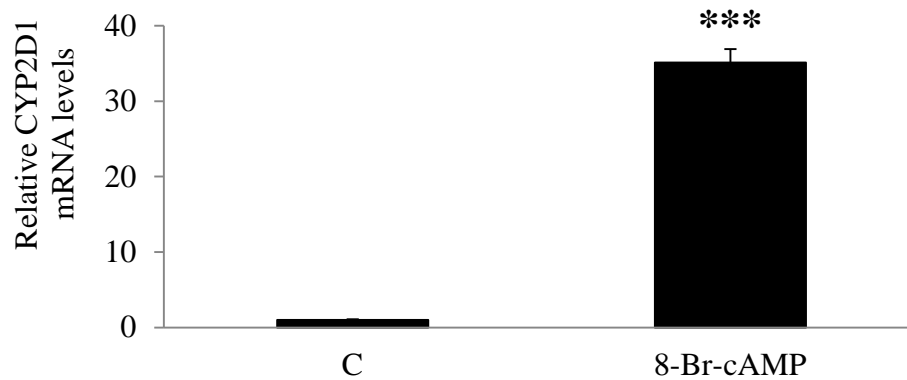
Έκθεση των κυττάρων σε DEXT προκάλεσε αύξηση των επιπέδων mRNA του *CYP2D1*, επίδραση η οποία αναστράφηκε από τον αναστολέα JNK, SP600125.



Διέγερση των β-αδρενεργικών υποδοχέων με ISOP αύξησε ελαφρά τα επίπεδα mRNA του *CYP2D1*, επίδραση που απέτρεξαν οι αναστολείς του cAMP/PKA, H89 και NaOV.

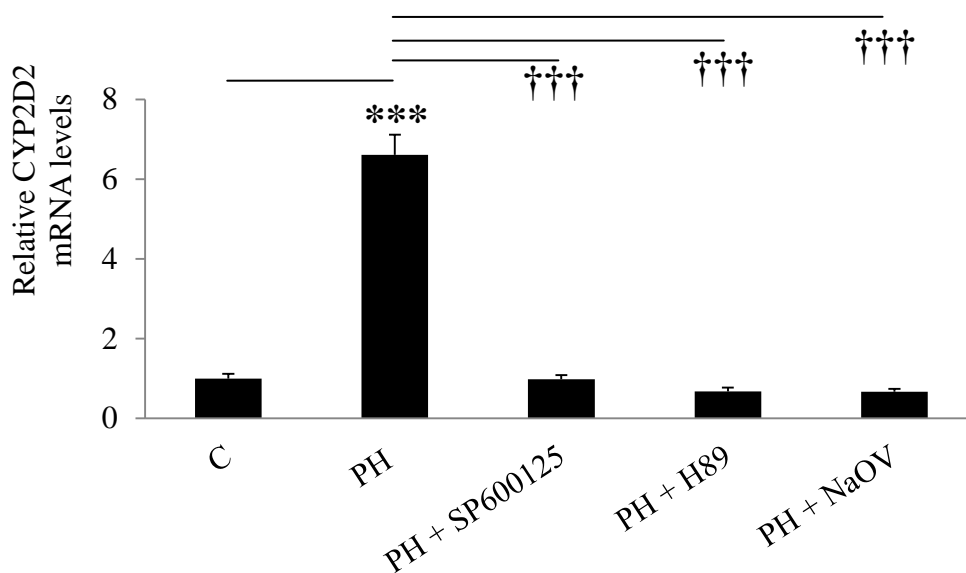


Χορήγηση του 8-bromo-cAMP σε πρωτογενή ηπατοκύτταρα αύξησε σημαντικά τα επίπεδα mRNA του *CYP2D1*.

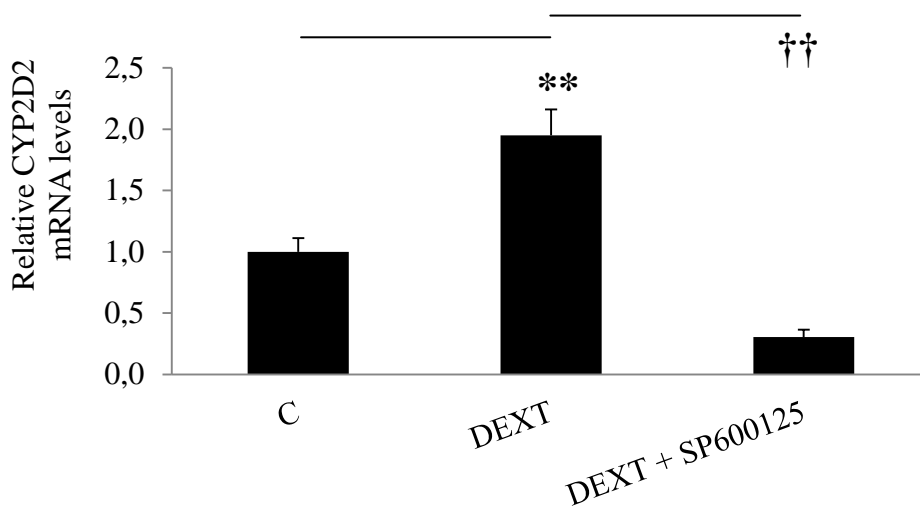


1.6.5. CYP2D2

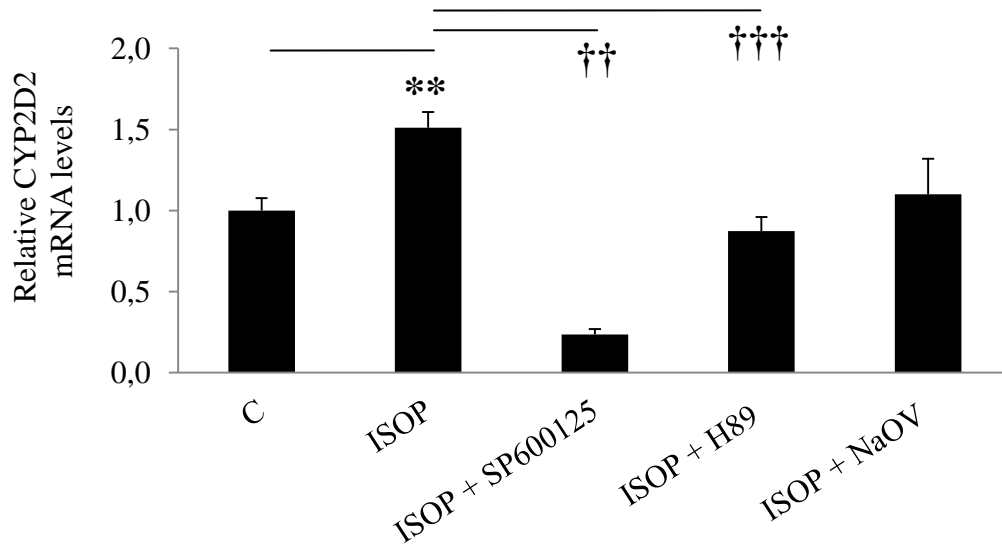
Έκθεση των ηπατοκυττάρων σε PH προκάλεσε σημαντική αύξηση των επιπέδων mRNA του *CYP2D2*. Η επίδραση αυτή ανεστράφη πλήρως από τους αναστολείς SP600125, H89 ή NaOV.



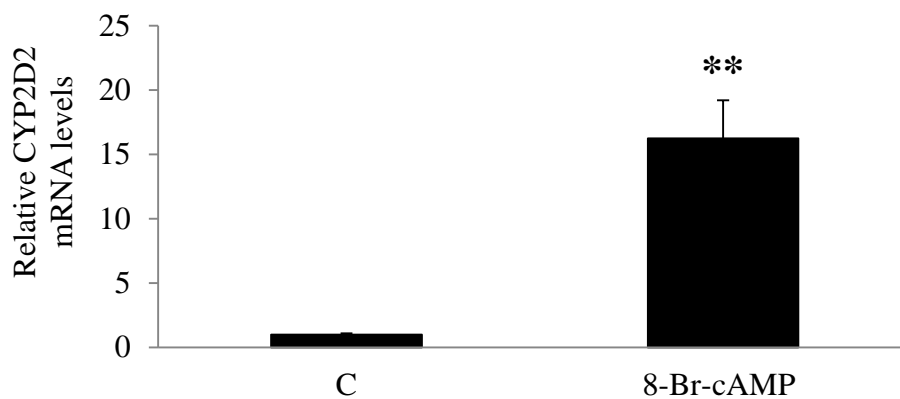
Διέγερση των α_2 -αδρενεργικών υποδοχέων με DEXT προκάλεσε αύξηση των επιπέδων mRNA του *CYP2D2*, επίδραση που ανεστράφη από τον SP600125.



Έκθεση των πρωτογενών ηπατοκυττάρων των β-αδρενεργικών υποδοχέων σε ISOP αύξησε τα επίπεδα mRNA του *CYP2D2*. Αυτή η αύξηση εμποδίστηκε από τους αναστολείς SP600125 και H89.

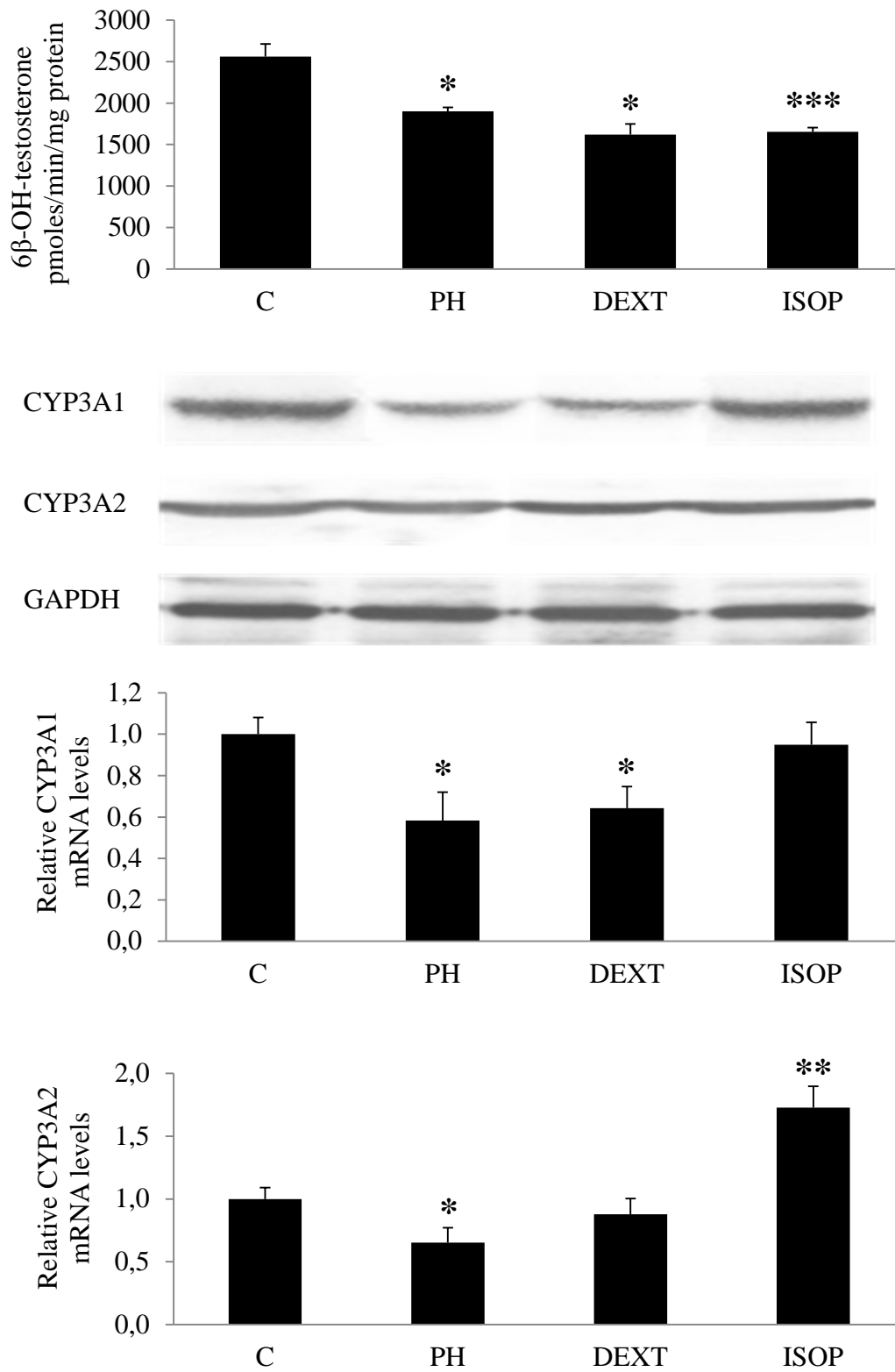


Το 8-bromo-cAMP αύξησε σημαντικά τα επίπεδα mRNA του *CYP2D2* στα πρωτογενή ηπατοκύτταρα.



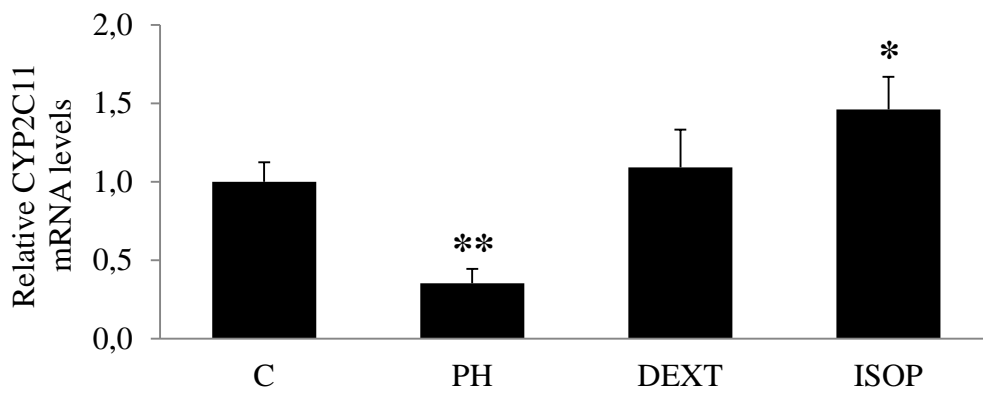
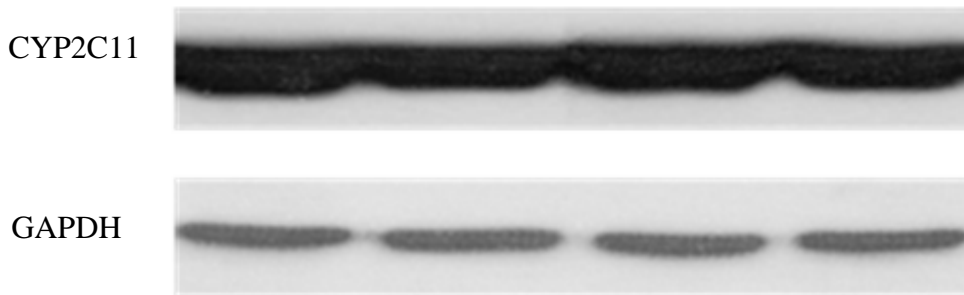
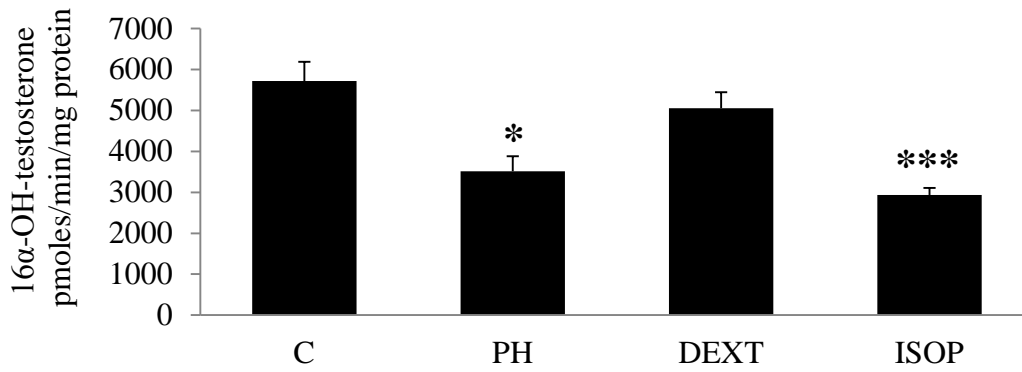
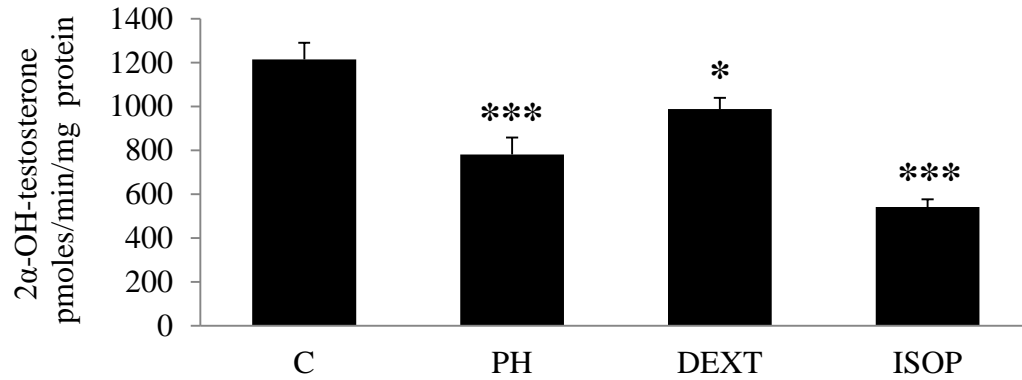
1.7. *In vivo* διερεύνηση του ρόλου των αδρενεργικών οδών στην έκφραση των CYPs

1.7.1. CYP3A1/2



Η χορήγηση ουσιών που δρουν ως αγωνιστές των αδρενεργικών υποδοχέων, όπως η φαινyleφρίνη (PH, α_1 -αγωνιστής), η δεξμεντετομιδίνη (DEXT, α_2 -αγωνιστής) και η ισοπρεναλίνη (ISOP, β_1/β_2 -αγωνιστής) προκάλεσε μεταβολές στην έκφραση των *CYP3A1/2*. Ειδικότερα, η χορήγηση PH ή DEXT, κατέστειλε την 6β-υδροξυλίωση της τεστοστερόνης, και τα επίπεδα αποπρωτεΐνης και mRNA των *CYP3A1/2*, σε σύγκριση με τους μάρτυρες (C). Διέγερση των β-αδρενεργικών υποδοχέων με ISOP, μείωσε την 6β-υδροξυλίωση της τεστοστερόνης, αλλά τα επίπεδα αποπρωτεΐνης των *CYP3A1/2* δεν φάνηκε να μεταβάλλονται. Τα επίπεδα mRNA του *CYP3A2* εμφάνισαν αύξηση.

1.7.2. CYP2C11

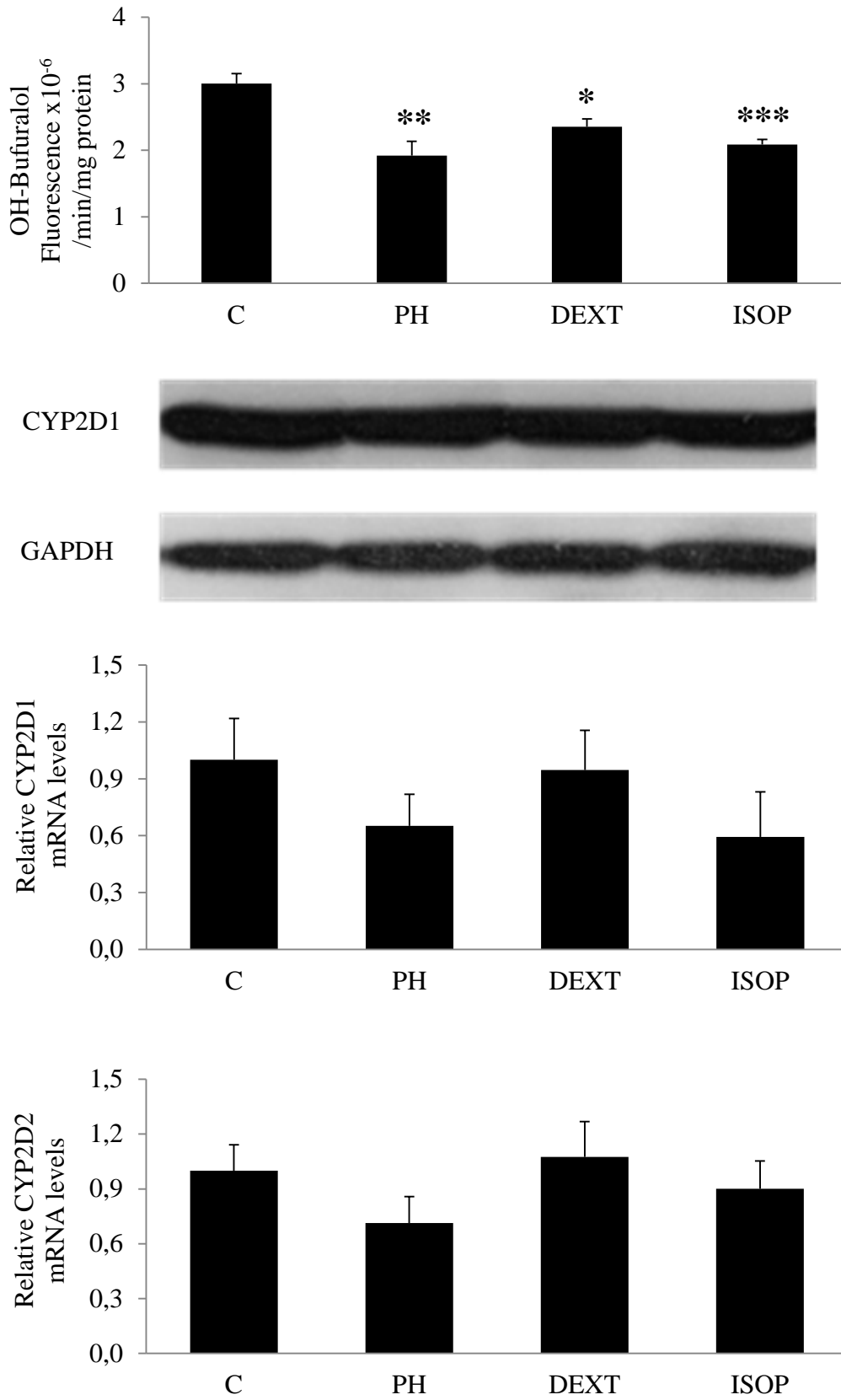


Χορήγηση ΡΗ προκάλεσε καταστολή της έκφρασης του *CYP2C11* στο ήπαρ επιμύων. Πιο συγκεκριμένα, η 2α- και 16α-υδροξυλίωση της τεστοστερόνης (καταλύεται από το CYP2C) μειώθηκε, όπως επίσης και τα επίπεδα αποπρωτεΐνης και mRNA του CYP2C11.

Χορήγηση DEXT προκάλεσε μικρή μείωση της 2α-υδροξυλίωσης της τεστοστερόνης, χωρίς όμως να μεταβάλλει τα επίπεδα αποπρωτεΐνης ή mRNA του CYP2C11.

Η ISOP, αύξησε ασθενώς τα επίπεδα mRNA του *CYP2C11* στο ήπαρ, χωρίς όμως αυτή η αύξηση να ακολουθείται από αντίστοιχη μεταβολή των επιπέδων αποπρωτεΐνης (μικρή μείωση) και ενζυμικής δραστηριότητας του CYP2C11 (μείωση της 2α- και 16α-OH-τεστοστερόνης).

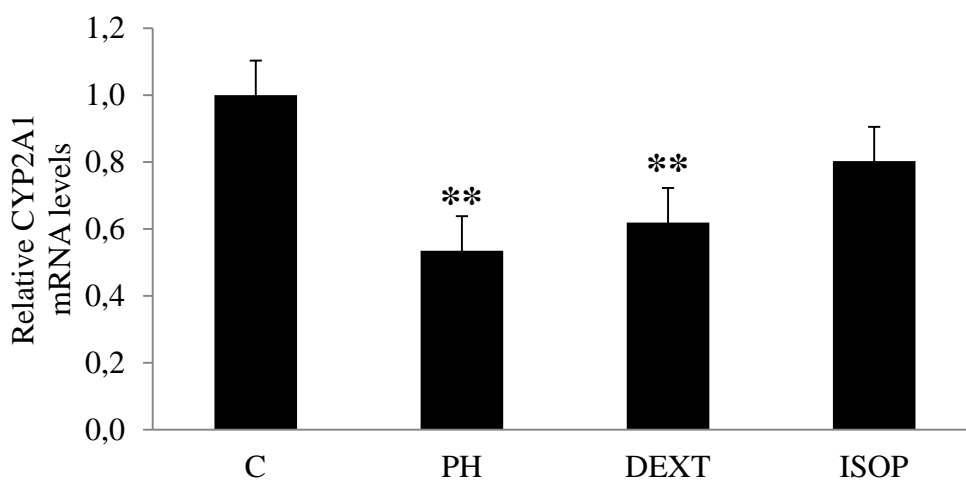
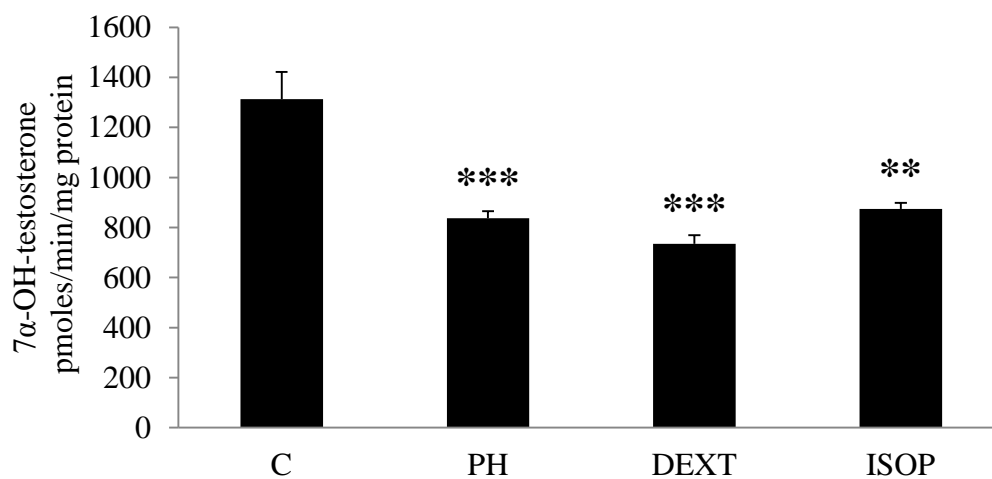
1.7.3. CYP2D1/2



Η διέγερση των α_1 -, α_2 - και β -αδρενεργικών υποδοχέων με PH, DEXT και ISOP αντίστοιχα, προκάλεσε μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας του CYP2D, όπως προκύπτει από τα επίπεδα υδροξυλίωσης της μπουφουραλόλης. Παρ' όλα αυτά, οι αγωνιστές των αδρενεργικών υποδοχέων δεν προκάλεσαν μεταβολές σε επίπεδο αποπρωτεΐνης ή mRNA του CYP2D.

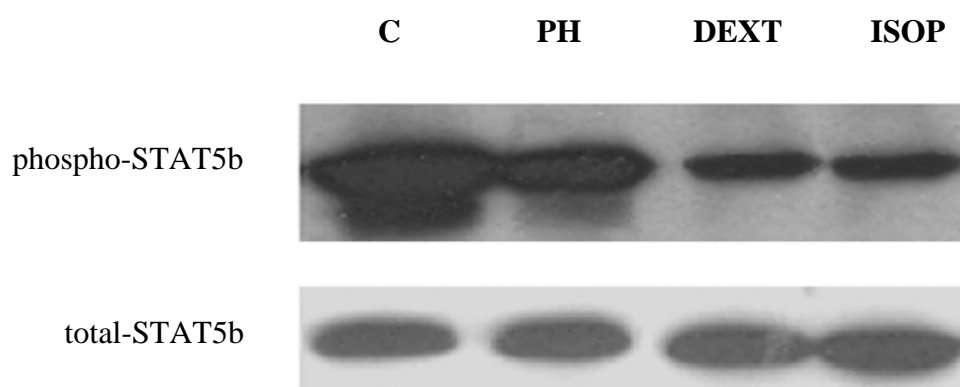
1.7.4. CYP2A1

Η χορήγηση PH ή DEXT οδήγησε στη μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας του CYP2A1 (7α-υδροξυλίωση της τεστοστερόνης) αλλά και των επιπέδων mRNA του CYP2A1. Η αγωγή των επιμύων με ISOP προκάλεσε μείωση της 7α-υδροξυλίωσης της τεστοστερόνης.

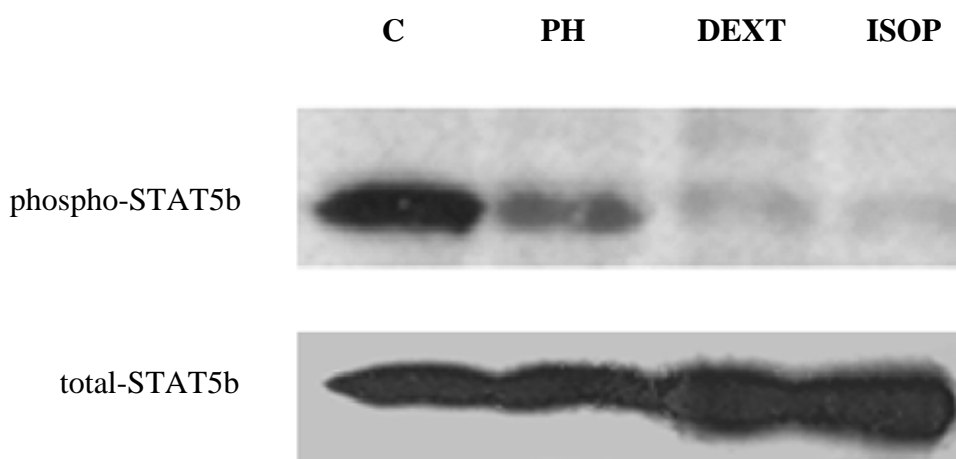


1.8. *In vivo* διερεύνηση της επίδρασης των αδρενεργικών οδών στην ενεργοποίηση του STAT5b

Χορήγηση των αδρενεργικών αγωνιστών PH, DEXT ή ISOP στους επίμυες προκάλεσε μείωση στην φωσφορυλίωση του STAT5b τόσο στον πυρήνα, όσο και στο κυτταρόπλασμα, γεγονός που φαίνεται να συνδέεται με την καταστολή της έκφρασης των *CYPs* που παρατηρήθηκε στο ήπαρ τους.



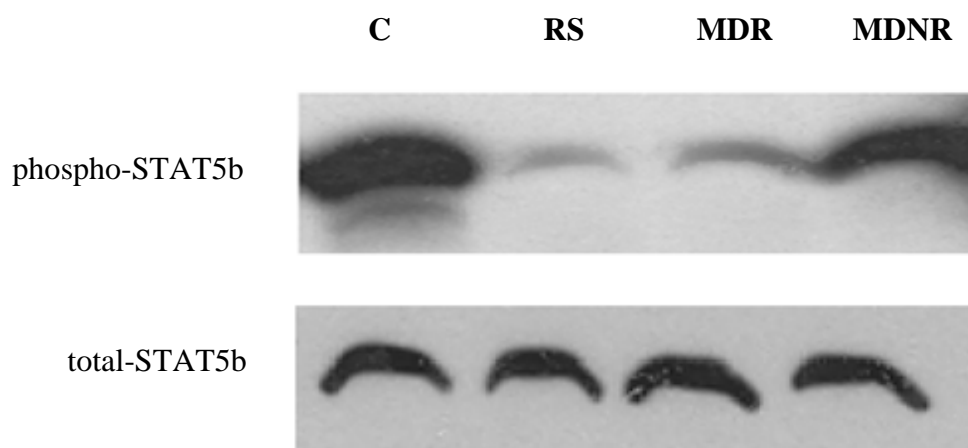
A. Πυρηνικές πρωτεΐνες



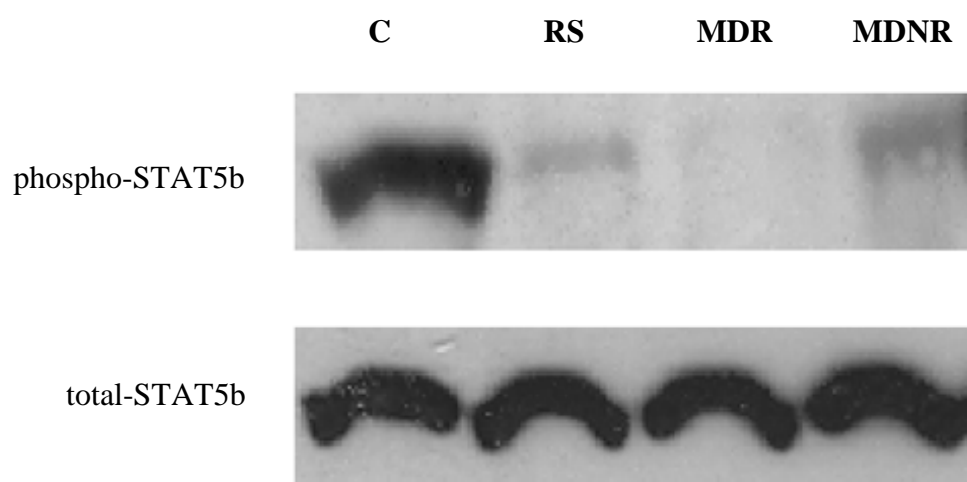
B. Κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες

1.9. *In vivo* διερεύνηση της επίδρασης του στρες στην ενεργοποίηση του STAT5b

Έκθεση των επιμύων είτε σε RS είτε σε MDS, προκάλεσε την καταστολή των φωσφορυλίωσης του STAT5b στον πυρήνα (A) αλλά και στο κυτταρόπλασμα (B). Αυτό το αποτέλεσμα φαίνεται να συνδέεται με την επαγωγική δράση του στρες στην έκφραση των *CYPs*.



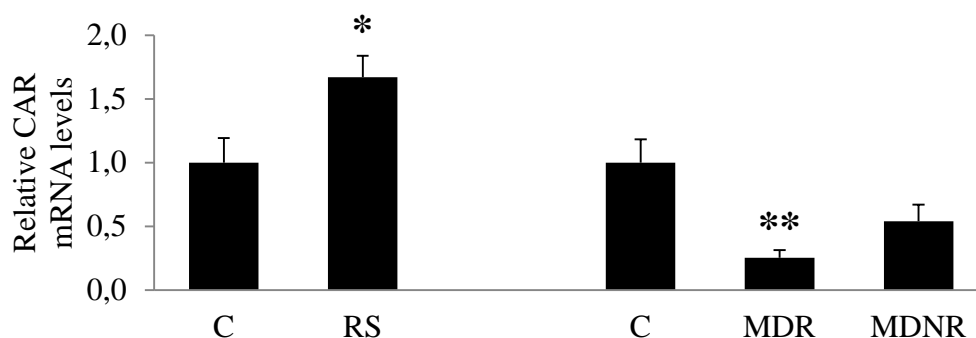
A. Πυρηνικές πρωτεΐνες



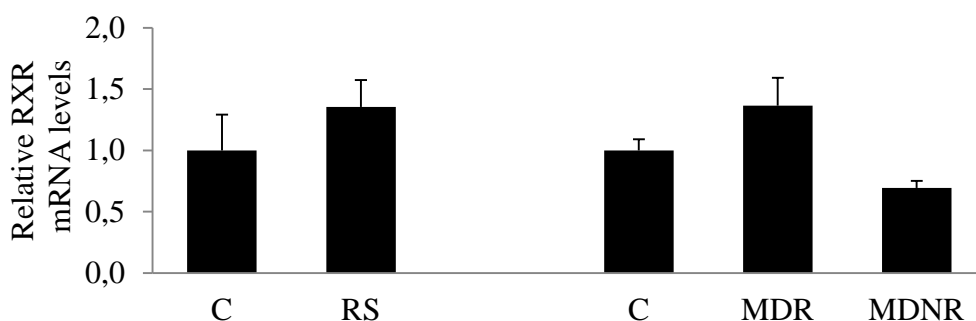
B. Κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες

1.10. *In vivo* διερεύνηση της επίδρασης του στρες στην έκφραση των πυρηνικών μεταγραφικών παραγόντων που ρυθμίζουν τα *CYPs*

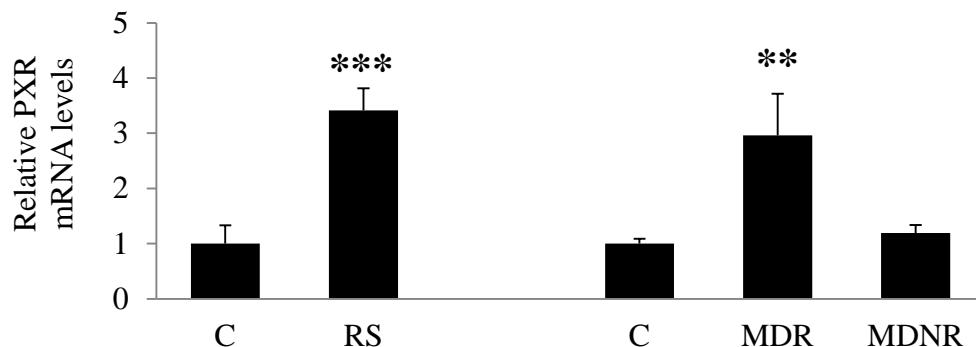
Τα επίπεδα mRNA του *CAR* αυξήθηκαν στο ήπαρ των επιμύων που εκτέθηκαν σε RS. Αντιθέτως, η έκθεση στο MDS κατέστειλε τα επίπεδα mRNA του *CAR* στους MDR επίμυες.



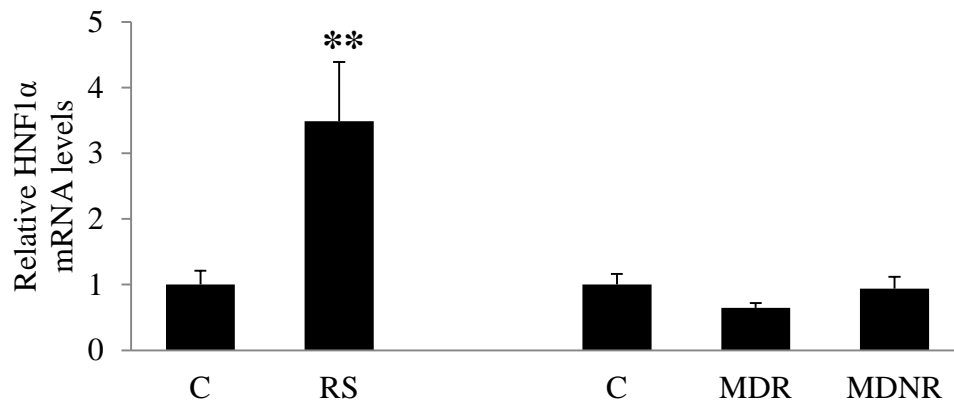
Δεν παρατηρήθηκαν μεταβολές στα επίπεδα mRNA του ηπατικού *RXR* μετά από RS ή MDS.



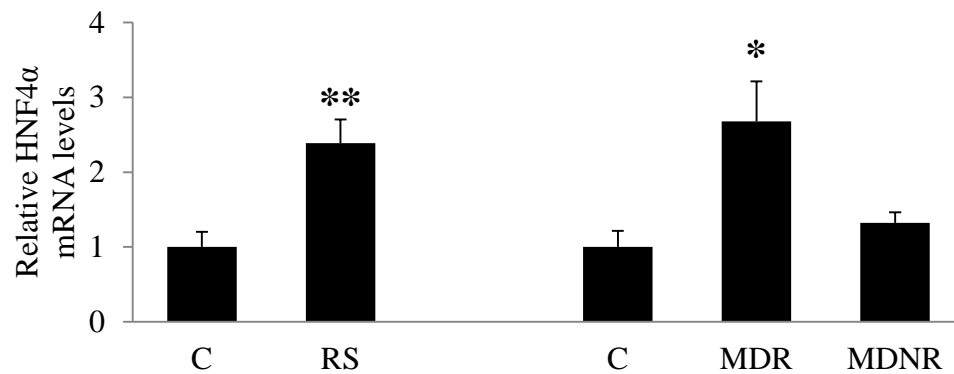
Τα επίπεδα mRNA του *PXR* αυξήθηκαν τόσο στους επίμυες που εκτέθηκαν σε RS, όσο και στους επίμυες MDR.



Τα επίπεδα mRNA του ηπατικού *HNF1α* παρουσίασαν σημαντική αύξηση, ενώ αντίθετα το MDS δε φάνηκε να προκαλεί το ίδιο αποτέλεσμα.

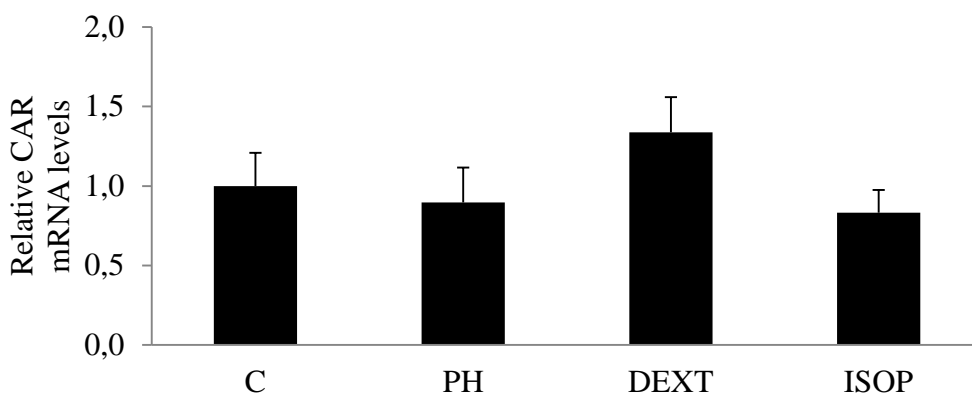


Τόσο οι επίμνες που εκτέθηκαν σε RS, όσο και οι επίμνες MDR, διαπιστώθηκε ότι έχουν αυξημένα επίπεδα ηπατικού *HNF4α*, σε σύγκριση με τους μάρτυρες.

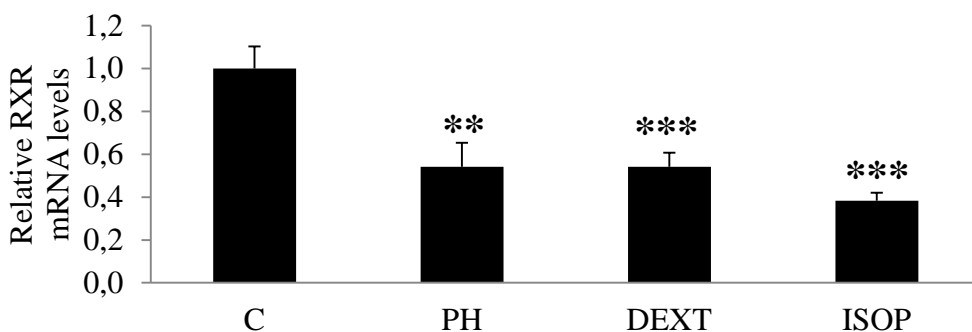


1.11. *In vivo* διερεύνηση του ρόλου των αδρενεργικών οδών στην έκφραση των πυρηνικών μεταγραφικών παραγόντων που ρυθμίζουν τα *CYPs*

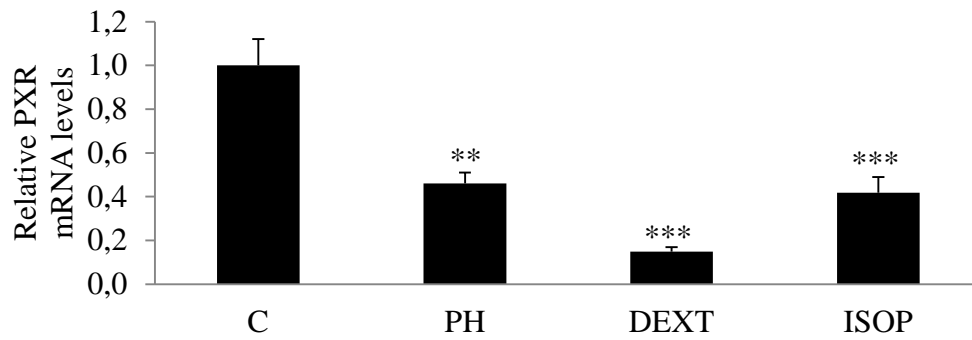
Τα επίπεδα mRNA του *CAR* δεν παρουσίασαν μεταβολές μετά από την χορήγηση α - και β -αδρενεργικών αγωνιστών.



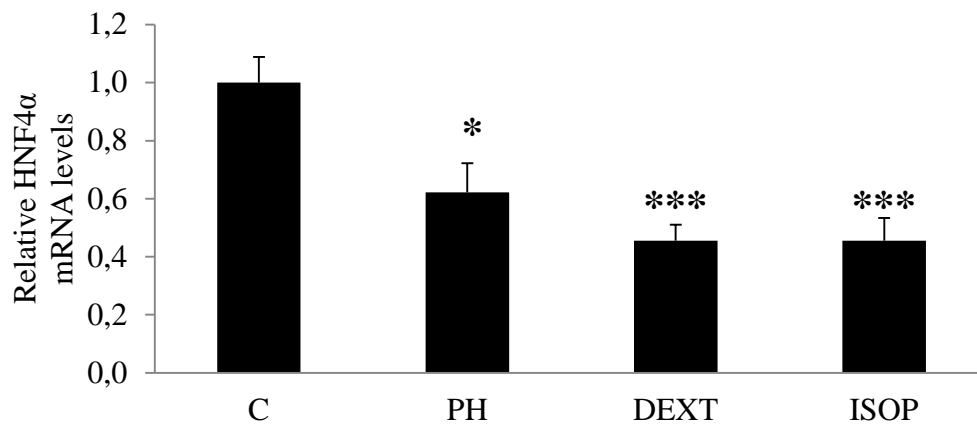
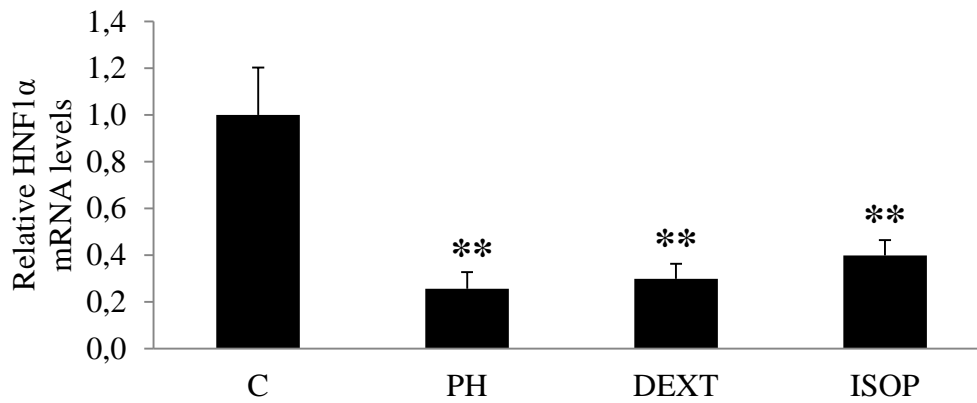
Αντιθέτως, τα επίπεδα mRNA του *RXR* εμφάνισαν μείωση μετά από χορήγηση PH, DEXT ή ISOP.



Το ίδιο προφίλ εμφάνισαν και τα επίπεδα mRNA του *PXR*, με σημαντική μείωση έπειτα από χορήγηση των α - και β -αδρενεργικών αγωνιστών.

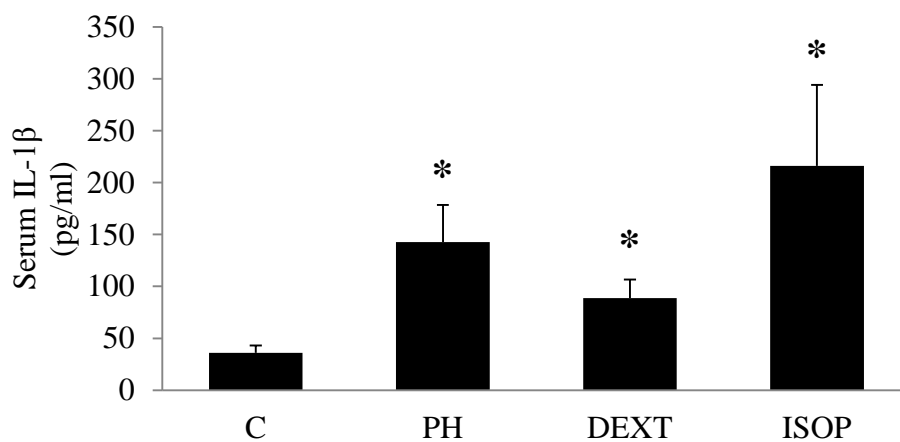
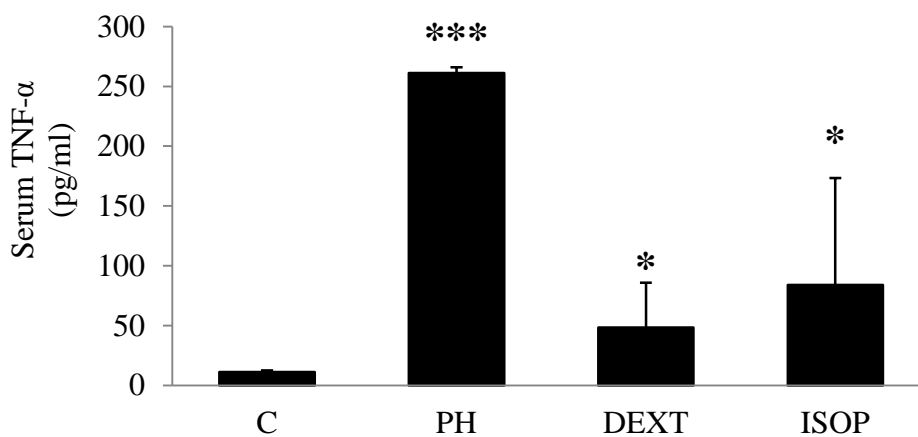


Και οι τρεις αδρενεργικοί αγωνιστές προκάλεσαν σημαντική μείωση των επιπέδων mRNA του *HNF1 α* και του *HNF4 α* .



1.12. *In vivo* διερεύνηση του ρόλου των αδρενεργικών οδών στην μεταβολή των επιπέδων των κυτοκινών

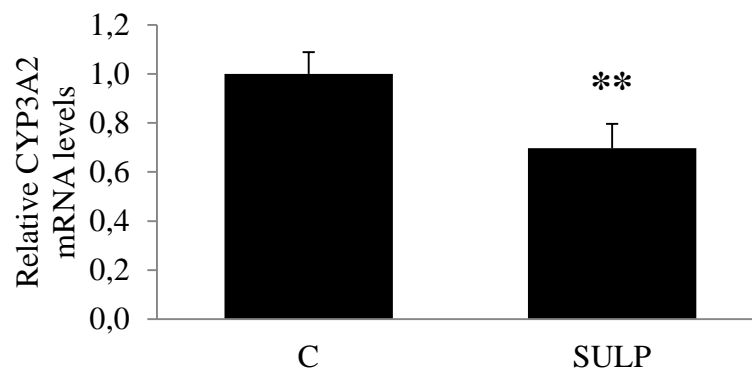
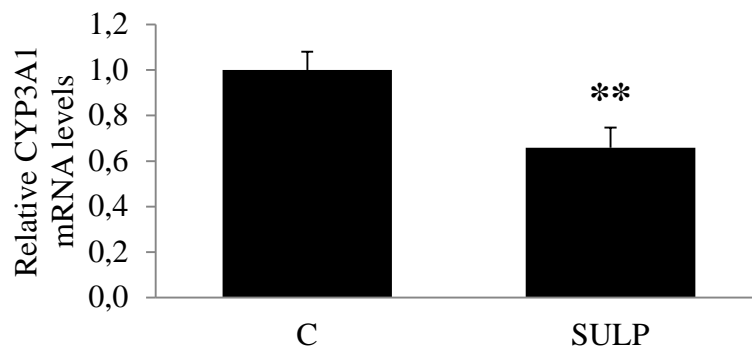
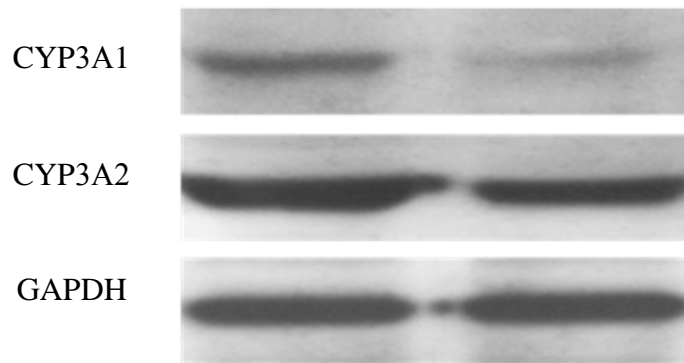
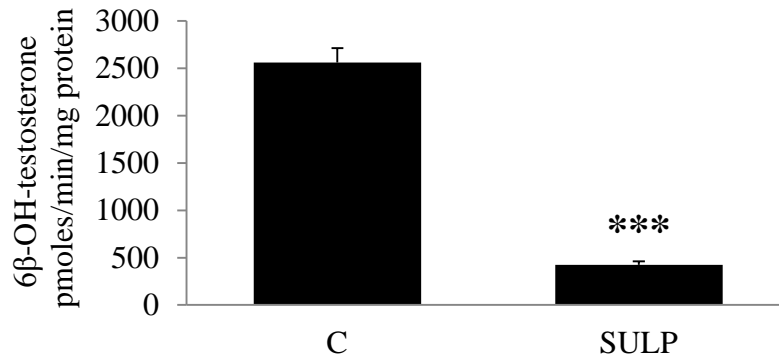
Η χορήγηση PH, DEXT ή ISOP οδήγησε σε σημαντική αύξηση των επιπέδων του TNF- α και της IL-1 β στο πλάσμα.



2. Ρόλος των D₂-ντοπαμινεργικών οδών στη ρύθμιση της έκφρασης των κυτοχρωμάτων CYPs

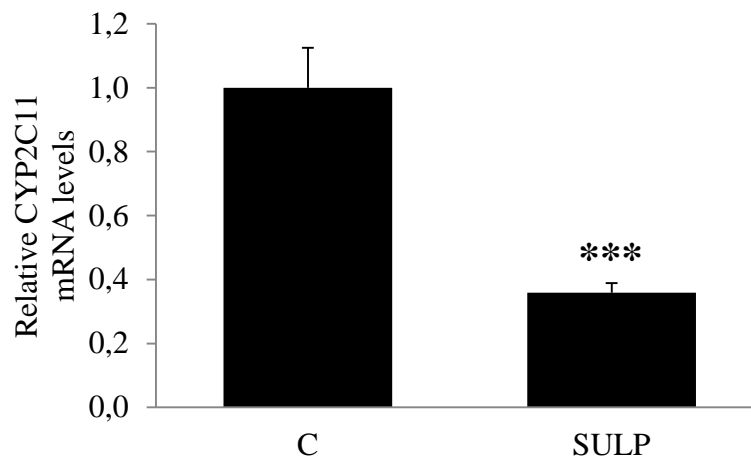
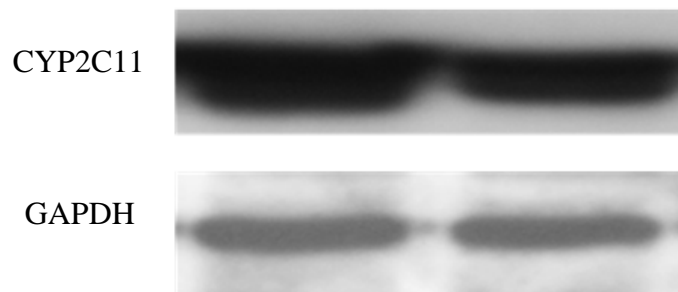
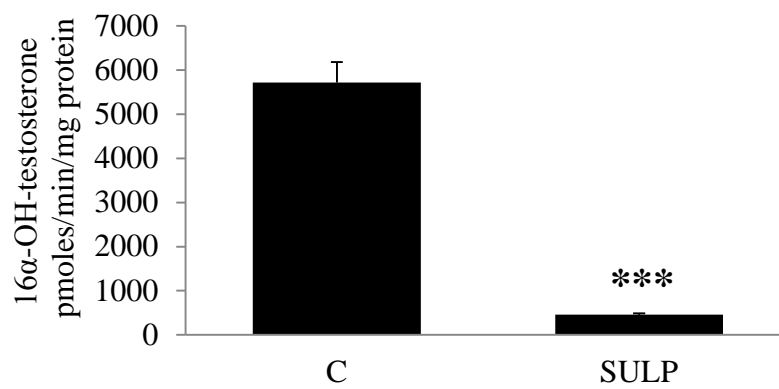
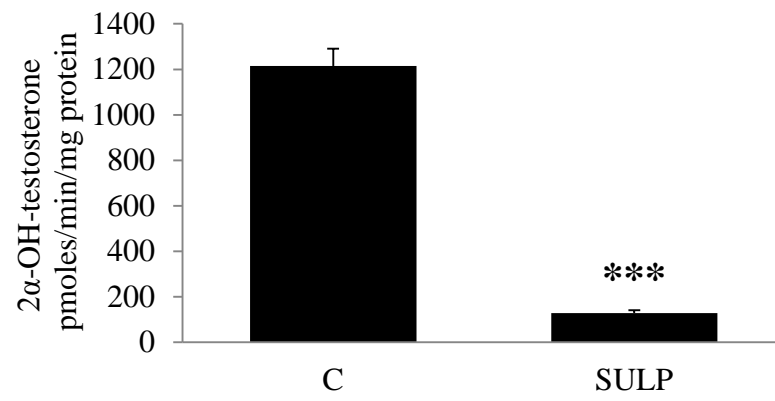
2.1. *In vivo* διερεύνηση της επίδρασης των D₂-ντοπαμινεργικών οδών στην έκφραση των CYPs

2.1.1. CYP3A1/2



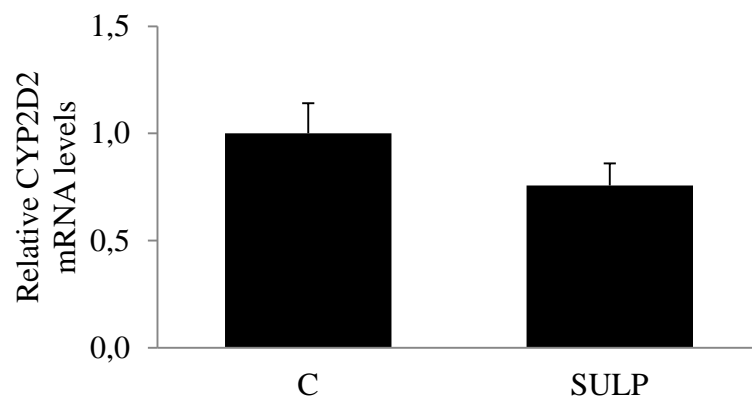
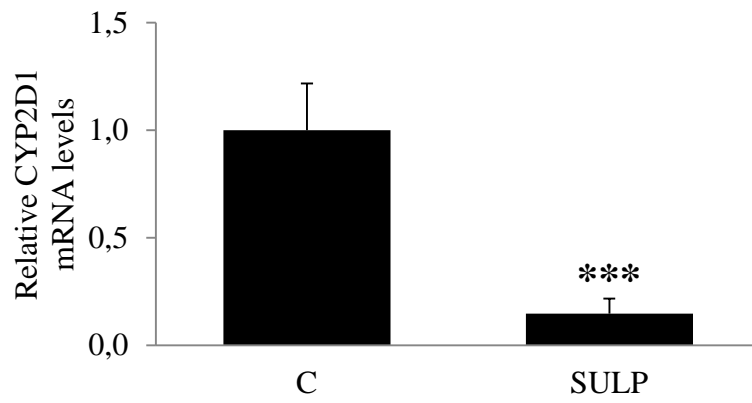
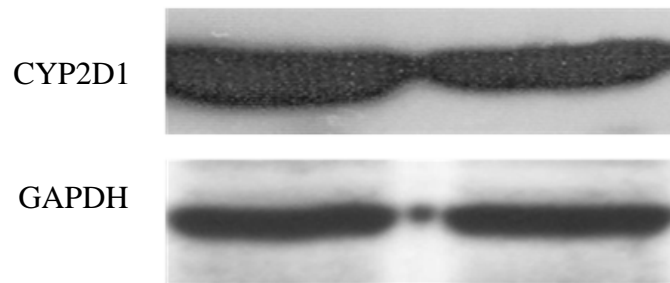
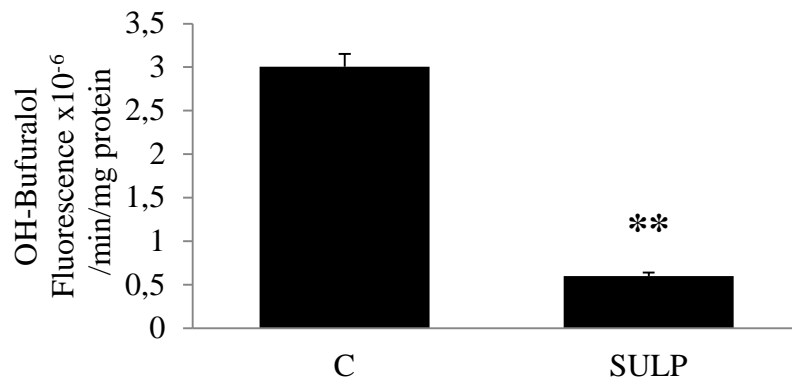
Χορήγηση σουλπιρίδης (SULP), D₂-ντοπαμινεργικού ανταγωνιστή, σε επίμυες προκάλεσε την καταστολή της έκφρασης των CYP3A1/2. Ειδικότερα, κατέστειλε την 6β-υδροξυλίωση της τεστοστερόνης (καταλύεται από το CYP3A), τα επίπεδα αποπρωτεΐνης και mRNA των CYP3A1 και CYP3A2.

2.1.2. CYP2C11



Η σουλπριδίδη κατέστειλε την έκφραση του ηπατικού CYP2C11 στο ήπαρ επιμύων. Πιο συγκεκριμένα, προκάλεσε ισχυρή μείωση της 2α- και 16α-υδροξυλίωσης της τεστοστερόνης (καταλύεται από το CYP2C) και σημαντική μείωση των επιπέδων της αποπρωτεΐνης και του mRNA του CYP2C11.

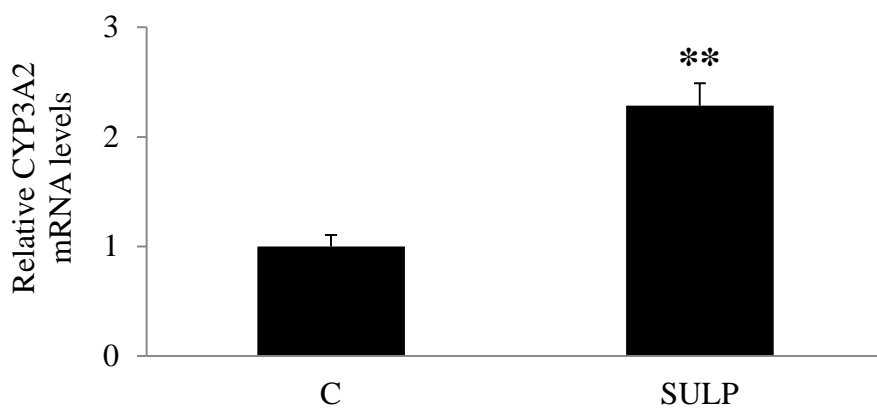
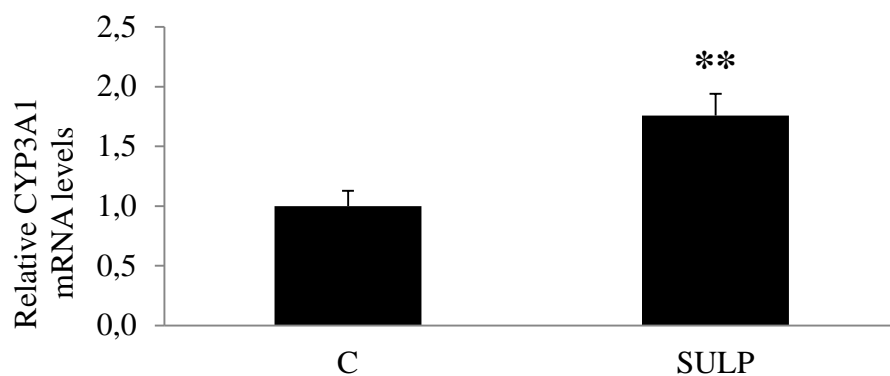
2.1.3. CYP2D1/2

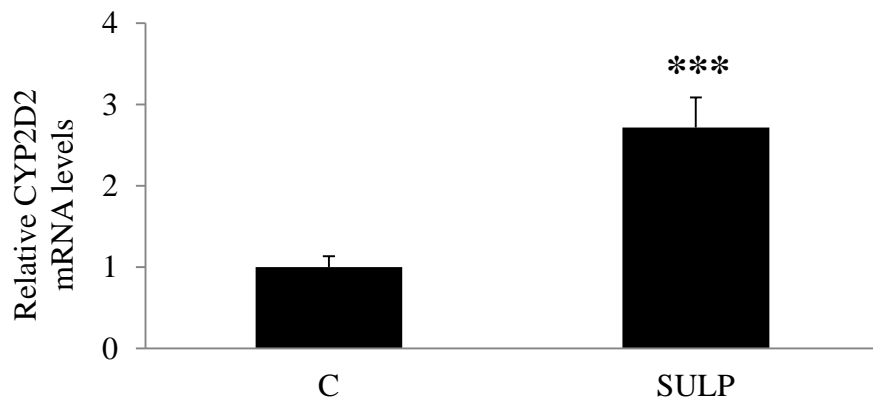
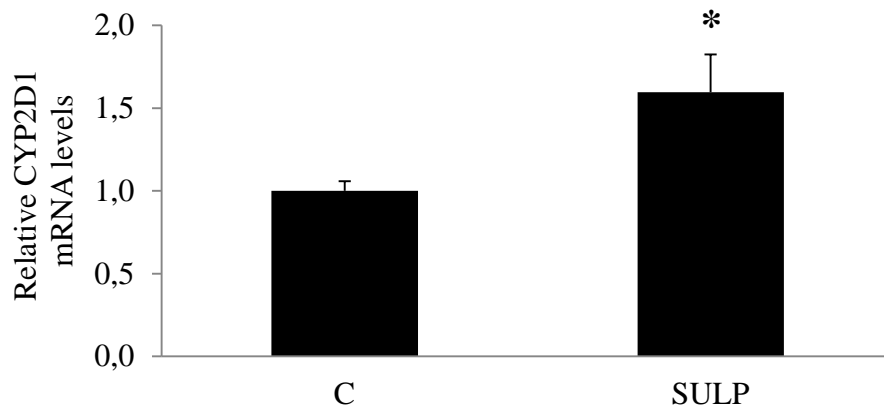
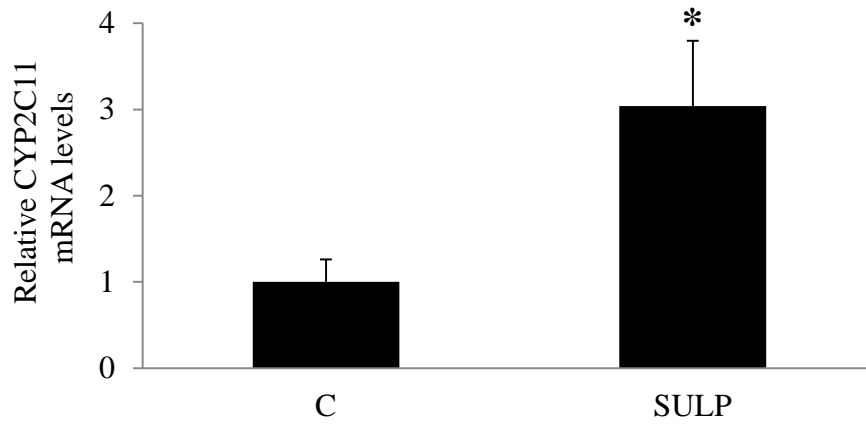


Σε σύγκριση με τους μάρτυρες, η αναστολή των D₂-ντοπαμινεργικών υποδοχέων με Sulp, οδήγησε σε σημαντική μείωση της υδροξυλίωσης της μπουφουραλόλης (καταλύεται από το CYP2D), των επιπέδων αποπρωτεΐνης και mRNA του CYP2D1.

2.2. *In vitro* διερεύνηση του ρόλου των D₂-ντοπαμινεργικών οδών στην έκφραση των CYPs

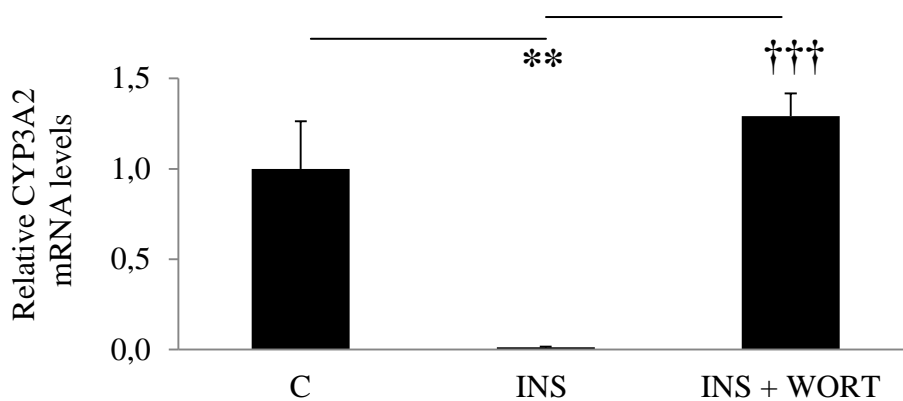
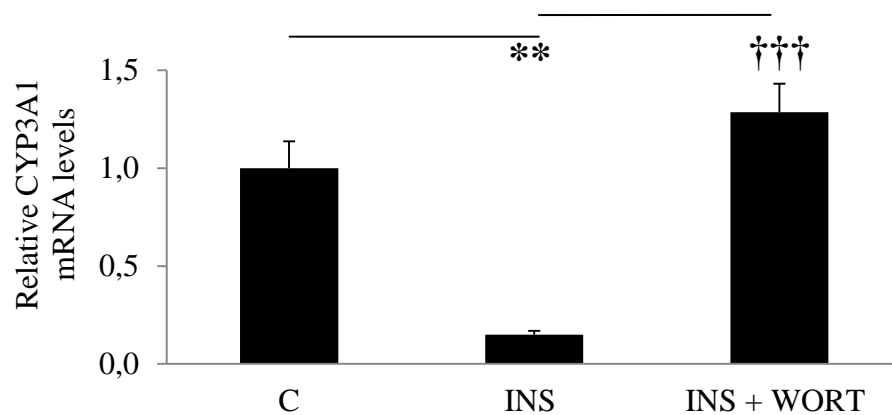
Η δέσμευση των ηπατικών D₂-ντοπαμινεργικών υποδοχέων με SULP προκαλεί σημαντική αύξηση των επιπέδων mRNA των *CYP3A1*, *CYP3A2*, *CYP2C11*, *CYP2D1* και *CYP2D2*.

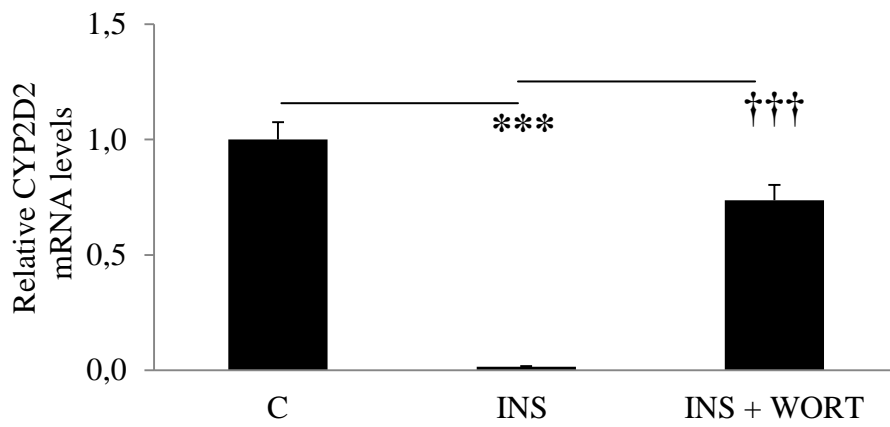
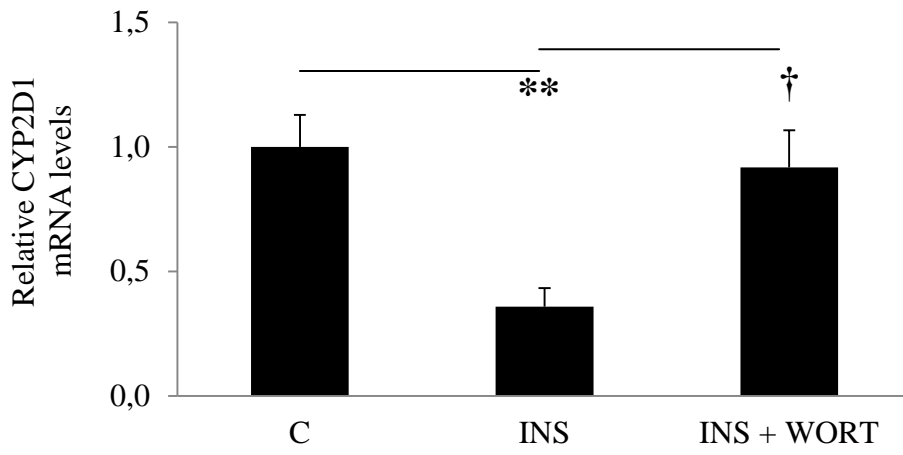
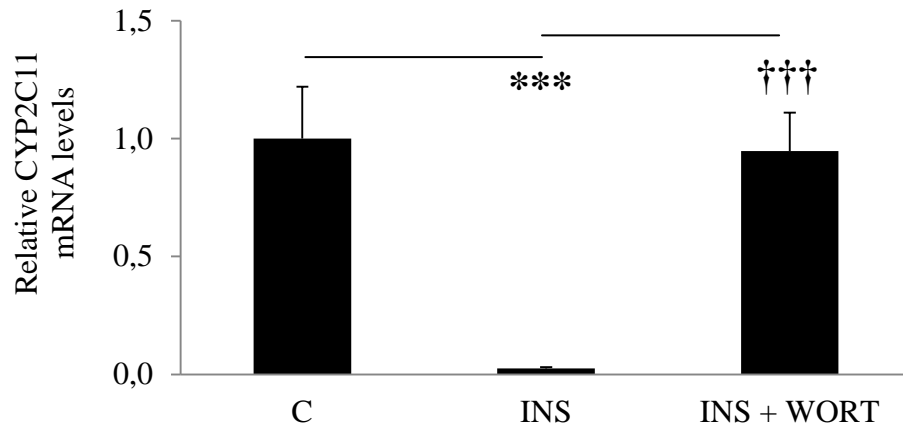




2.3. *In vitro* διερεύνηση του ρόλου της ινσουλίνης στην έκφραση των *CYPs*

Η έκθεση πρωτογενών ηπατοκυττάρων σε ινσουλίνη (INS) προκαλεί ισχυρή καταστολή του *CYP3A1*, *CYP3A2*, *CYP2C11*, *CYP2D1* και *CYP2D2*. Η καταστολή αυτή αντιστρέφεται - σε όλες τις περιπτώσεις - όταν τα κύτταρα εκτίθενται σε WORT πριν την έκθεση σε INS.

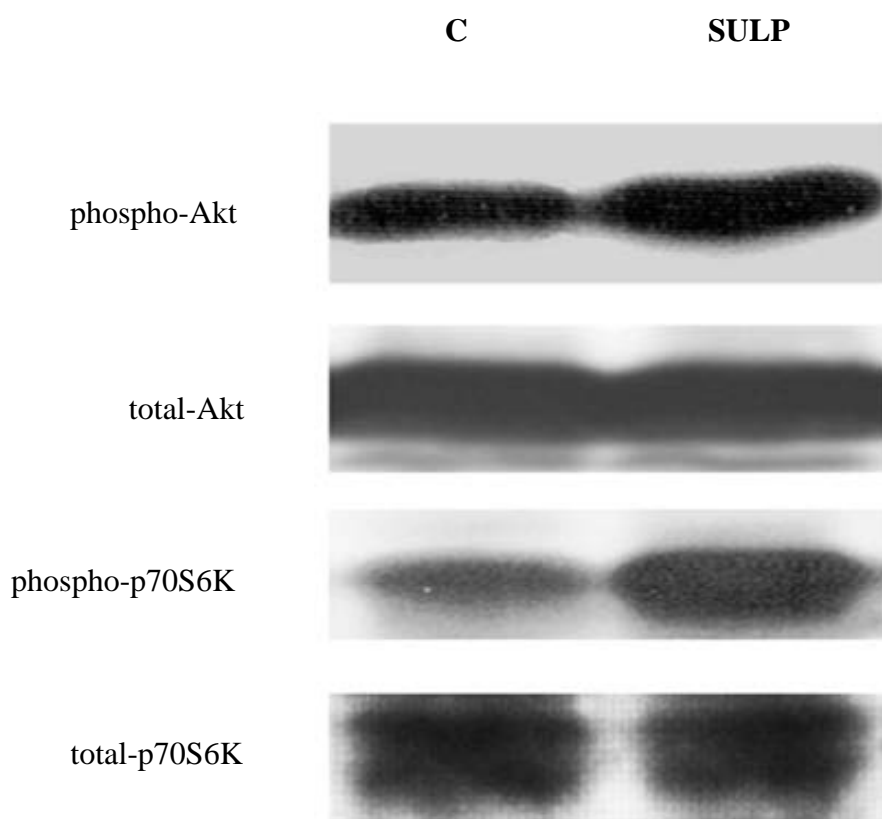




2.4. *In vivo* διερεύνηση της εμπλοκής του μονοπατιού της PI3K/Akt στη ρύθμιση της έκφρασης των *CYPs*

Η αναστολή των D₂-ντοπαμινεργικών υποδοχέων με Sulp, αύξησε σημαντικά τα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης Akt στις ολικές κυτταρικές πρωτεΐνες του ήπατος.

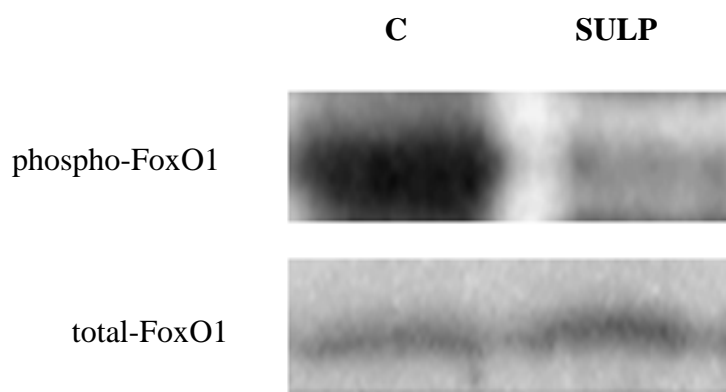
Η phospho-p70S6K, η οποία βρίσκεται downstream της Akt, βρέθηκε ισχυρά αυξημένη σε ολικές κυτταρικές πρωτεΐνες μετά από αγωγή επιμύων με Sulp. Οι total-Akt και total-p70S6K σε ολικές κυτταρικές πρωτεΐνες δεν επηρεάστηκαν από την Sulp.



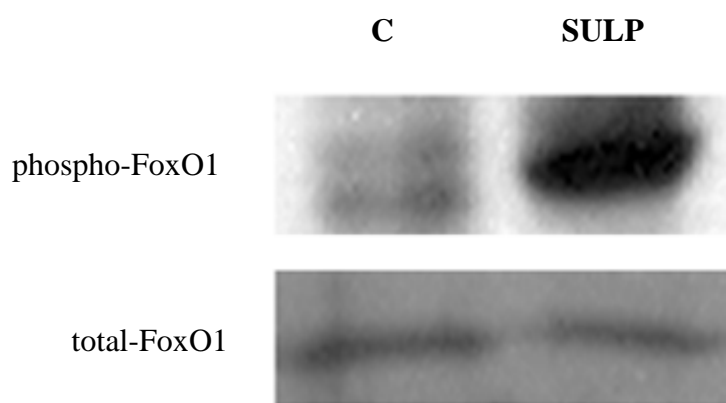
Ολικές κυτταρικές πρωτεΐνες

2.5. *In vivo* διερεύνηση της επίδρασης της Sulp στην ενεργοποίηση του FoxO1

Αγωγή επίμυων με Sulp, καταστέλλει ισχυρά την φωσφορυλίωση του FoxO1 σε δείγματα πυρηνικών πρωτεϊνών (A). Αντίθετα, την αυξάνει στις κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες (B). Το total-FoxO1 δεν επηρεάστηκε.



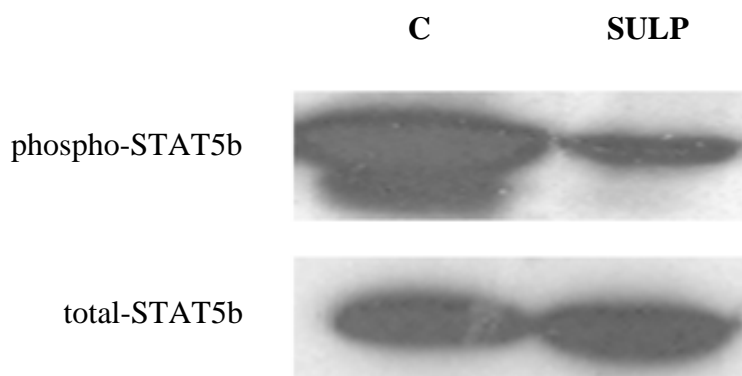
A. Πυρηνικές πρωτεΐνες



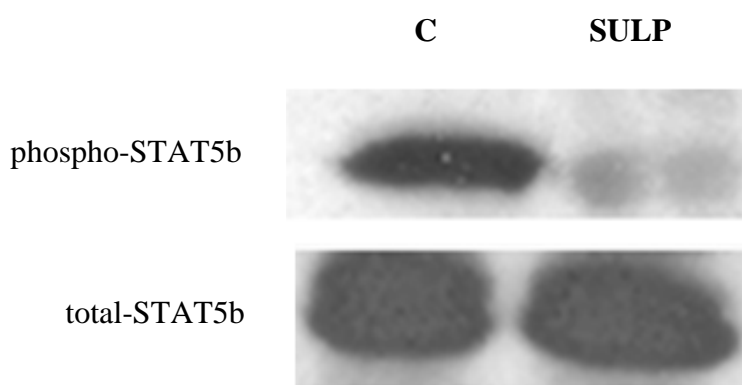
B. Κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες

2.6. *In vivo* διερεύνηση της επίδρασης της Sulp στην ενεργοποίηση του STAT5b

Η αναστολή των D₂-ντοπαμινεργικών υποδοχέων με την Sulp, κατέστειλε σημαντικά τα επίπεδα αποπρωτεΐνης του phospho-STAT5b, τόσο σε πυρηνικές (A) όσο και σε κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες (B). Το total-STAT5b χρησιμοποιήθηκε για την κανονικοποίηση.



A. Πυρηνικές πρωτεΐνες



B. Κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες

2.7. Επίπεδα ορμονών μετά από αναστολή των D₂-ντοπαμινεργικών υποδοχέων

Πίνακας 3

Ομάδα	Επίπεδα ινσουλίνης στο πλάσμα (pg/ml)	Επίπεδα γλυκόζης στο πλάσμα (mg/dl)
Μάρτυρες	0.4 ± 0.02	8.0 ± 0.25
Σουλπιρίδη	1.3 ± 0.18***	7.2 ± 0.10*

Επίπεδα ινσουλίνης και γλυκόζης στο πλάσμα επιμύων. Οι τιμές εκφράζονται σε Mean ± SE; *αντιστοιχεί σε στατιστική σημαντικότητα p<0.05, *** αντιστοιχεί σε στατιστική σημαντικότητα p<0.001.

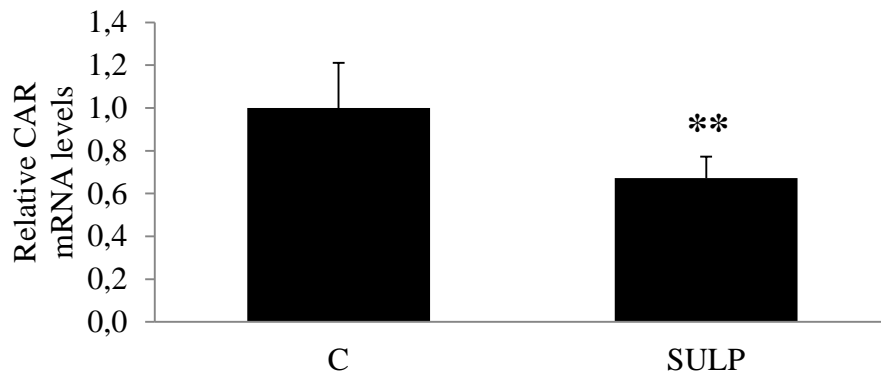
Πίνακας 4

	Μάρτυρες	Σουλπιρίδη
rGH (ng/ml)	107.95 ± 2.99	29.76 ± 9.28***
T3 (ng/dl)	111.31 ± 5.80	66.86 ± 4.80***
T4 (µg/dl)	2.59 ± 0.10	1.40 ± 0.17***
TSH (ng/ml)	1.66 ± 0.06	1.57 ± 0.08
Corticosterone (mg/ml)	166.3 ± 12.4	73.3 ± 9.5**
Prolactin (ng/ml)	35.01 ± 5.80	177.78 ± 11.89***

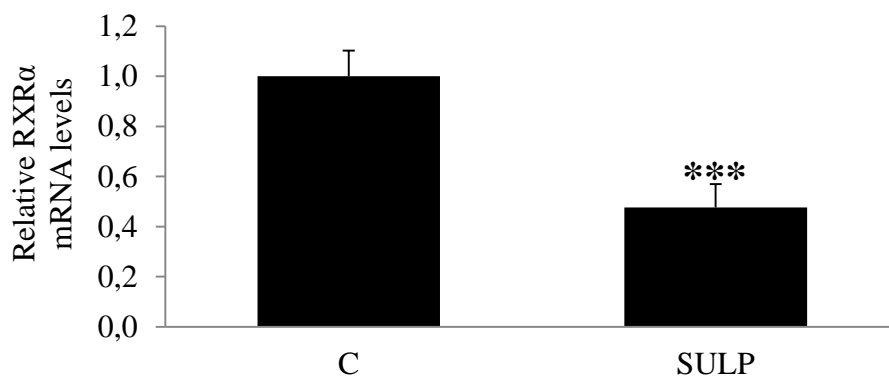
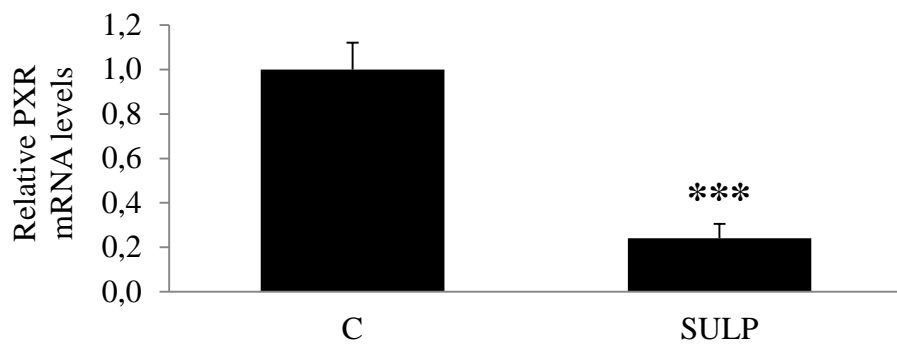
Επίπεδα ορμονών στο πλάσμα επιμύων. rGH, αυξητική ορμόνη; T3, τριϊωδοθυρονίνη; T4, θυροξίνη; TSH, θυρεοειδοτρόπος ορμόνη; corticosterone, κορτικοστερόνη; prolactin, προλακτίνη. Οι τιμές εκφράζονται σε Mean ± SE; * αντιστοιχεί σε στατιστική σημαντικότητα p<0.05, ** αντιστοιχεί σε στατιστική σημαντικότητα p<0.01, *** αντιστοιχεί σε στατιστική σημαντικότητα p<0.001.

2.8. *In vivo* διερεύνηση του ρόλου των D₂-ντοπαμινεργικών οδών στην έκφραση των πυρηνικών μεταγραφικών παραγόντων που ρυθμίζουν τα CYPs

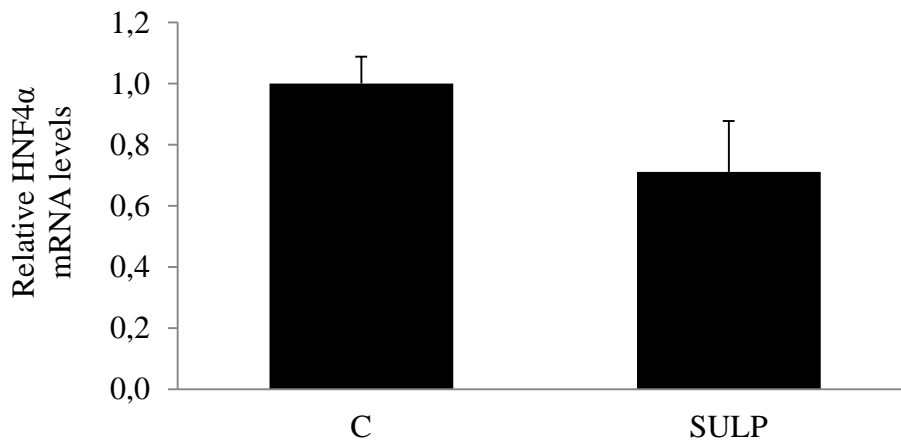
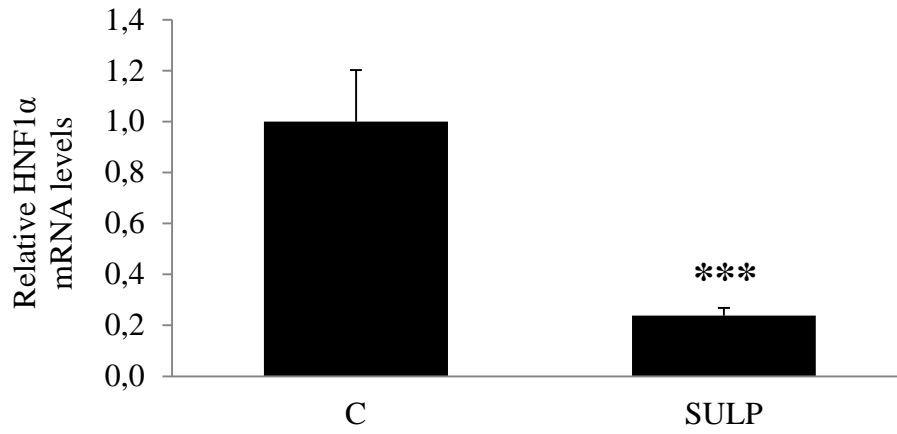
Η έκφραση του mRNA του CAR κατεστάλη μετά από χορήγηση Sulp σε επίμυες.



Επίσης, η χορήγηση Sulp προκάλεσε μείωση των επιπέδων mRNA τόσο του PXR όσο και του RXR α .

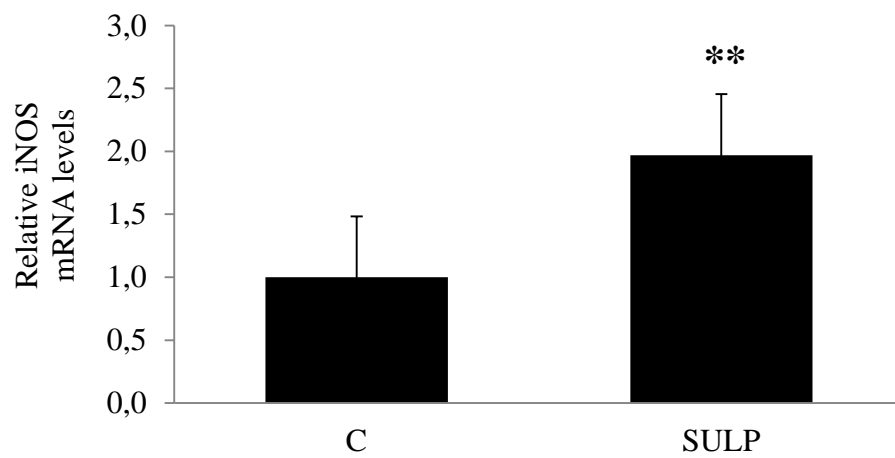
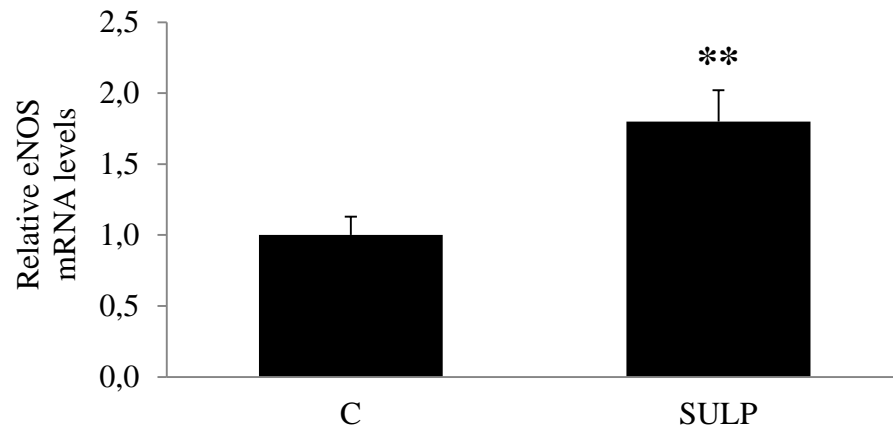


Τα επίπεδα mRNA του *HNFIα* εμφάνισαν ισχυρή καταστολή στο ήπαρ μετά από χορήγηση SULP, ενώ τα επίπεδα του *HNF4α*, δεν παρουσίασαν σημαντική μεταβολή.



2.9. *In vivo* διερεύνηση της επίδρασης του Sulp στην έκφραση του NO

Χορήγηση Sulp σε επίμυες είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων mRNA των eNOS και iNOS.



ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα μελέτη υποδεικνύει το ψυχολογικό στρες ως έναν παράγοντα υψίστης σημασίας για τη ρύθμιση γονιδίων, τα οποία κωδικοποιούν τα κυτοχρώματα CYPs. Τα ένζυμα αυτά καταλύουν το μεταβολισμό πληθώρας ενδογενών και εξωγενών (ξеноβιοτικών) ουσιών, οι οποίες περιλαμβάνουν προκαρκινογόνα, τοξικές ουσίες, ορμόνες και - το σημαντικότερο - την πλειοψηφία των πιο συχνά συνταγογραφούμενων φαρμάκων. Είναι η πρώτη φορά, που καταδεικνύεται ότι στρεσογόνα συμβάντα που λαμβάνουν χώρα σε πολύ νεαρή ηλικία, μπορούν να έχουν μακροπρόθεσμες συνέπειες στον μεταβολισμό φαρμάκων. Συγκεκριμένα, το στρες της μητρικής αποστέρησης (MDS), στο οποίο εκτέθηκαν νεαροί (ηλικίας 9 ημερών) επίμυες, προκάλεσε σοβαρές νευροβιολογικές μεταβολές, που ανιχνεύθηκαν κατά την ενηλικίωση και οι οποίες επηρέασαν το ηπατικό προφίλ μεταβολισμού φαρμάκων σε αυτά τα άτομα. Πιο συγκεκριμένα, η έκφραση των *CYP3A1/2* και *CYP2C11* αυξήθηκε στο ήπαρ των επίμυων που "απάντησαν" στο στρες της μητρικής αποστέρησης (MDR) σε σύγκριση με τους μάρτυρες. Είναι σημαντικό να αναφερθεί πάντως, ότι οι συνέπειες του στρες στα κυτοχρώματα *CYP3A*, *CYP2C* και *CYP2D* εξαρτώνται από το είδος του στρες στο οποίο εκτίθενται τα πειραματόζωα. Αυτό φανερώνεται από το εύρημα ότι οι ενήλικοι επίμυες, οι οποίοι εκτέθηκαν σε στρες περιορισμού (RS) κατ' επανάληψη δεν παρουσίασαν σημαντικές μεταβολές στην έκφραση των *CYP3A1* και *CYP2C11*. Παρ' όλα αυτά εμφάνισαν μεγάλη αύξηση στην 1'-υδροξυλίωση της μπουφουραλόλης στο ήπαρ (καταλύεται από το *CYP2D*). Από την άλλη πλευρά, το MDS δεν είχε καμία επίδραση στη δραστηριότητα του *CYP2D*. Αυτά τα ευρήματα προσθέτουν πληροφορίες στην μέχρι τώρα γνώση, η οποία βασίζεται σε μελέτες που απέδειξαν τον σημαντικό ρόλο του στρες στη ρύθμιση του *CYP1A1* και *CYP1A2* (Konstandi et al., 1998a), (Konstandi et al., 1998b), (Konstandi et al., 2000), (Konstandi et al., 2004), (Konstandi et al., 2008b).

Τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* πειράματα με κορτικοστερόνη ή το συνθετικό γλυκοκορτικοειδές, δεξαμεθαζόνη (αντιστοίχως), επιβεβαίωσαν την επαγωγική επίδραση των γλυκοκορτικοειδών στο κυτόχρωμα *CYP3A* στον επίμυ (Schuetz and Guzelian, 1984), (Watkins et al., 1985), (Wrighton et al., 1985), (El-Sankary et al., 2000). Αντίθετα, η δεξαμεθαζόνη προκάλεσε καταστολή της έκφρασης του *CYP2C11*, γεγονός που επιβεβαιώνεται από προηγούμενες μελέτες (Bergeron et al., 1998), (Iber et al., 1999), οι οποίες έδειξαν ότι χαμηλές συγκεντρώσεις γλυκοκορτικοειδών προκαλούν επαγωγή του *CYP2C11*, ενώ αντίθετα, υψηλές συγκεντρώσεις (όπως στην παρούσα

μελέτη) έχουν κατασταλτική δράση. Η επινεφρίνη, η οποία απελευθερώνεται από τα επινεφρίδια μετά από την επίδραση στρεσογόνων παραγόντων, έχει επίσης επαγωγική δράση στην έκφραση των ηπατικών *CYP3A*, *CYP2C* και *CYP2D* και η ρύθμισή τους φαίνεται να γίνεται μέσω των μονοπατιών cAMP/PKA και JNK. Λαμβάνοντας υπ' όψιν ότι η επινεφρίνη και η νορεπινεφρίνη, οι δύο βασικοί επενεργητές (effectors) της αντίδρασης στο στρες, δρουν μέσω των α - και β -αδρενεργικών υποδοχέων (Johnson et al., 1992), ένα από τα κύρια θέματα αυτής της μελέτης ήταν η διερεύνηση του ρόλου των αδρενεργικών υποδοχέων και των σχετικών μονοπατιών μεταγωγής σήματος στην ρύθμιση της έκφρασης των πιο σημαντικών κυτοχρωμάτων *CYPs*. *In vitro* πειράματα, στα οποία καλλιέργειες πρωτογενών ηπατοκυττάρων εκτέθηκαν σε άλφα- ή βήτα-αδρενεργικούς αγωνιστές, έδειξαν ότι η άμεση διέγερση των ηπατικών α_1 - and β -αδρενεργικών υποδοχέων αυξάνει την έκφραση των *CYP3A*, *CYP2C* και *CYP2D* μέσω των μονοπατιών cAMP/PKA και JNK. Η επαγωγική δράση των α_2 -αδρενεργικών υποδοχέων στα κυτοχρώματα φαίνεται να σχετίζεται κυρίως, με τα μονοπάτια που ελέγχονται από τις JNK. Αξίζει να σημειωθεί ότι έκθεση των ηπατοκυττάρων στο συνθετικό ανάλογο του cAMP, το 8-bromo-cAMP, επιβεβαίωσε προηγούμενες μελέτες που ανέφεραν την επαγωγική δράση του cAMP στα *CYPs* (Joannard et al., 2000), (Oesch-Bartlomowicz and Oesch, 2005). Αντίθετα, *in vivo* αγωγή επιμύων με τους ίδιους αδρενεργικούς αγωνιστές που χρησιμοποιήθηκαν στα *in vitro* πειράματα, προκάλεσε την καταστολή των ανωτέρω κυτοχρωμάτων *CYPs*. Συγκεκριμένα, η φαινυλεφρίνη (PH, α_1 -αγωνιστής), η δεξμεντετομιδίνη (DEXT, α_2 -αγωνιστής) και η ισοπρεναλίνη (ISOP, β -αγωνιστής) κατέστειλαν την έκφραση των *CYP3A*, *CYP2C* και *CYP2D*.

Η ασυμφωνία των ευρημάτων που προέκυψαν από τα *in vivo* και τα *in vitro* πειράματα, όσον αφορά τον ρόλο των αδρενεργικών υποδοχέων στην ρύθμιση των *CYPs*, πιθανόν να οφείλεται στην πολυπλοκότητα του συστήματος των αδρενοϋποδοχέων και την διασπορά τους σε διάφορους ιστούς του οργανισμού. Έχει διαπιστωθεί ότι οι αδρενεργικοί υποδοχείς εκφράζονται στο ΚΝΣ και την περιφέρεια (Exton, 1985), (Johnson, 1998) και ελέγχουν διάφορες λειτουργίες, συμπεριλαμβανομένης της αρτηριακής πίεσης, της ανοσολογικής απάντησης, της έκκρισης κατεχολαμινών και διαφόρων ορμονών, μεταξύ άλλων (Kvetnansky et al., 2009). Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η αυξητική ορμόνη (GH), οι θυρεοειδικές ορμόνες (TH), η προλακτίνη (PRL) και τα γλυκοκορτικοειδή αποτελούν σημαντικούς

ρυθμιστές της έκφρασης των πιο σημαντικών *CYPs* (Ram and Waxman, 1991), (Liddle et al., 1998), (Meredith et al., 2003), (Khan et al., 2009), (Takahashi et al., 2010). Η έκκρισή τους βρίσκεται, σε μεγάλο βαθμό, υπό τον έλεγχο των κατεχολαμινών (Tuomisto and Mannisto, 1985). Οι α - και β -αδρενεργικοί υποδοχείς βρίσκονται επίσης, στα τοιχώματα των αγγείων και παίζουν σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης και ως εκ τούτου, της παροχής αίματος στο ήπαρ (Immink et al., 1978), γεγονός που είναι καθοριστικής σημασίας για την ρύθμιση των *CYPs*. Τεράστιας σημασίας είναι επίσης, η παρουσία α_2 - και β_2 -αδρενεργικών υποδοχέων στα β-κύτταρα του παγκρέατος. Φαίνεται, ότι αυτοί οι υποδοχείς ελέγχουν την έκκριση της ινσουλίνης σε απάντηση στα αυξημένα επίπεδα γλυκόζης στο πλάσμα. Είναι γνωστό, ότι η ινσουλίνη έχει κατασταλτική επίδραση σε ορισμένα γονίδια *CYPs* (Woodcroft and Novak, 1997).

Οι α - και β -αδρενεργικοί υποδοχείς εκφράζονται και στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως είναι τα μακροφάγα, και ρυθμίζουν την απάντηση του ανοσοποιητικού συστήματος σε διάφορα ερεθίσματα, συμπεριλαμβανομένων και εκείνων που πυροδοτούν φλεγμονή. Οι αγωνιστές των αδρενεργικών υποδοχέων, συμπεριλαμβανομένων των κατεχολαμινών (απελευθερώνονται μετά από έκθεση σε στρεσογόνους παράγοντες), διεγείρουν τους αδρενεργικούς υποδοχείς και προκαλούν την έκκριση των κυτοκινών IL-1 β , IL-6 and TNF α (Flierl et al., 2007), (Flierl et al., 2008), (Flierl et al., 2009). Τόσο *in vivo*, όσο και *in vitro* μελέτες έχουν δείξει την κατασταλτική δράση αυτών των κυτοκινών στην έκφραση των *CYP3A* και *CYP2C* (Nadin et al., 1995), (Carlson and Billings, 1996), (Jover et al., 2002), (Vuppugalla et al., 2003), (Assenat et al., 2004). Ο μηχανισμός που ευθύνεται για αυτή την επίδραση πιθανόν εμπλέκει το NO, που συνδέεται με το μόριο της αίμης των *CYPs* και δημιουργεί ένα σύμπλοκο NO/*CYP*, το οποίο είναι εξαιρετικά ασταθές (Ebel et al., 1975), (Carlson and Billings, 1996). Οι αδρενεργικοί αγωνιστές, οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη αύξησαν τα επίπεδα της IL-1 β και του TNF α στο πλάσμα και αυτή η αύξηση θα μπορούσε να εξηγήσει την καταστολή που προκαλούν οι αγωνιστές αυτοί στα *CYP3A* και *CYP2C in vivo*. Είναι προφανές πάντως, ότι το τελικό αποτέλεσμα της *in vivo* επίδρασης των αδρενεργικών αγωνιστών στην έκφραση των *CYP3A*, *CYP2C* και *CYP2D* είναι αποτέλεσμα της συνδυασμένης δράσης κεντρικών και περιφερικών αδρενεργικών μονοπατιών, τα οποία παρακάμπτον την απ' ευθείας μειωρυθμιστική δράση στα *CYPs* που πυροδοτούν τα ηπατικά αδρενεργικά μονοπάτια. Φαίνεται επίσης, ότι οι ξεχωριστές ισομορφές *CYP* απαντούν διαφορετικά στα α - και β -

αδρενεργικά μονοπάτια (Konstandi et al., 1998a), (Konstandi et al., 1998b). (Konstandi et al., 2005), (Konstandi et al., 2006).

Είναι ευρέως γνωστό ότι τα πιο σημαντικά κυτοχρώματα CYP ρυθμίζονται μέσω των πυρηνικών μεταγραφικών παραγόντων, είτε απ' ευθείας, είτε μέσω πολύπλοκων cross-talk μηχανισμών. Οι CAR, PXR, RXR, HNF1α και HNF4α, μαζί με τον STAT5b ανήκουν σε αυτή την κατηγορία ρυθμιστών της έκφρασης των CYP (Liddle et al., 1998), (Wiwi and Waxman, 2004). Συγκεκριμένα, οι CAR και PXR λαμβάνουν μέρος σε έναν μηχανισμό ρύθμισης διαφόρων μελών των υποοικογενειών CYP3A και CYP2C (Dvorak and Pavek, 2010). Η παρούσα μελέτη έδειξε ότι οι μεταβολές που προκάλεσαν το MDS και οι αδρενεργικοί αγωνιστές στην έκφραση του PXR είναι πιθανόν υπεύθυνες για τις αλλαγές στην έκφραση των CYP3A και CYP2C. Το MDS προκάλεσε επαγωγή της έκφρασης του PXR, που ενδεχομένως πυροδότησε την επαγωγή των CYP3A και CYP2C. Αντιθέτως, οι αδρενεργικοί αγωνιστές προκάλεσαν *in vivo* καταστολή του PXR, γεγονός που προφανώς συνδέεται με την καταστολή των CYPs. Αντιθέτως, το RS και το MDS δεν κατάφεραν να μεταβάλλουν την έκφραση του RXR. Οι αδρενεργικοί αγωνιστές όμως προκάλεσαν ελαφρά καταστολή του RXR, γεγονός που πιθανόν να σημαίνει ότι το RXR παίζει ρόλο στην καταστολή των CYP από αδρενεργικούς παράγοντες. Ο ρόλος του CAR στη μέσω στρες ή αδρενεργικών αγωνιστών ρύθμιση της έκφρασης των ανωτέρω CYPs δε φαίνεται να είναι ιδιαίτερα σημαντικός.

Τέλος, η παλμικά κυμαινόμενη έκκριση της GH και ο μεταγραφικός παράγοντας STAT5b, ο οποίος εξαρτάται άμεσα από την πρώτη, θεωρείται ότι παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση της έκφρασης διαφόρων ηπατικών CYP και φαίνεται να δρα σε συνδυασμό με τον HNF4α (Shimada et al., 1997), (Wiwi and Waxman, 2004), (Holloway et al., 2006). Πιο συγκεκριμένα, η ενεργοποίηση του υποκινητή του γονιδίου (gene promoter) του CYP3A4 από τους CAR και PXR φαίνεται να βρίσκεται υπό την εποπτεία του HNF4α (Gonzalez, 2008). Εξάλλου, τόσο το CYP2C όσο και το CYP2D μπορούν να ενεργοποιηθούν από τον HNF4α (Wiwi and Waxman, 2004), ενώ πέρα από τον HNF4α, στην ρύθμιση των CYP μέσω της STAT5b λαμβάνουν μέρος και άλλα μέλη της οικογένειας HNF, όπως το HNF1α (Wiwi and Waxman, 2004). Η παρούσα μελέτη έδειξε ότι οι μεταβολές που παρατηρούνται στην έκφραση των ηπατικών CYP3A, CYP2C και CYP2D μετά από έκθεση σε στρες, δε σχετίζονται με την ενεργοποίηση του STAT5b. Από την άλλη πλευρά, οι αλλαγές που παρατηρούνται μετά από διέγερση των αδρενεργικών υποδοχέων, φαίνεται να σχετίζονται με την

ενεργοποίηση του STAT5b, σε συνδυασμό με τους μεταγραφικούς παράγοντες *HNF4a* και *HNF1a*.

Προηγούμενες έρευνες έχουν καταστήσει κοινά αποδεκτό ότι τα κεντρικά και περιφερικά κατεχολαμινεργικά συστήματα παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση ενζύμων που μεταβολίζουν φάρμακα, συμπεριλαμβανομένων των *CYPs* (Konstandi et al., 2004), (Konstandi et al., 2005), (Konstandi et al., 2006). Με βάση αυτή την παρατήρηση, ο δεύτερος σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση του ρόλου των D₂-ντοπαμινεργικών υποδοχέων και των μονοπατιών που σχετίζονται με αυτούς, στην έκφραση των κυτοχρωμάτων *CYPs*. Η μελέτη αυτή εστίασε στο ρόλο των D₂-ντοπαμινεργικών υποδοχέων επειδή, μεγάλος αριθμός φαρμακευτικών ουσιών, που συνταγογραφούνται για παθήσεις όπως η Νόσος του Πάρκινσον, η Κατάθλιψη και η Σχιζοφρένεια, μεταξύ άλλων (Craig and Lin, 1981), (Bonci and Hopf, 2005), (Kabbani et al., 2011) δρουν μέσω αυτών των υποδοχέων και επομένως, επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό τα D₂-ντοπαμινεργικά συστήματα (Cooper et al., 1996). Ένας άλλος λόγος ήταν επίσης, ο σημαντικός ρόλος των D₂-ντοπαμινεργικών υποδοχέων των β-παγκρεατικών κυττάρων στον έλεγχο της έκκρισης της ινσουλίνης.

Η φαρμακολογική αναστολή των D₂-ντοπαμινεργικών υποδοχέων με σουλπριδίδη (SULP, εκλεκτικός D₂-ντοπαμινεργικός ανταγωνιστής), ουσία που χρησιμοποιείται στην θεραπεία της ψύχωσης, προκάλεσε ισχυρή καταστολή στην έκφραση των *CYP3A1/2*, *CYP2C11* και *CYP2D1*, ενώ αντιθέτως η έκφραση του *CYP2D2* δεν επηρεάστηκε σημαντικά. Η κατασταλτική αυτή δράση της SULP φαίνεται να γίνεται εμμέσως, αφού η έκθεση πρωτογενών ηπατοκυττάρων σε SULP προκάλεσε επαγωγή στα ανωτέρω κυτοχρώματα. Η υπόθεσή μας είναι ότι η καταστολή που προκαλεί η SULP στην έκφραση των *CYP3A1/2*, *CYP2C11* και *CYP2D1* είναι αποτέλεσμα της συνδυασμένης δράσης κεντρικών και περιφερικών κατεχολαμινεργικών και ορμονικών συστημάτων, η οποία έχει παρακάμψει την άμεση επαγωγική δράση του συγκεκριμένου φαρμάκου στα ηπατοκύτταρα.

Ο ρόλος της ινσουλίνης στην καταστολή των *CYPs* μέσω των D₂-ντοπαμινεργικών υποδοχέων φαίνεται να είναι καθοριστικός. Η υπόθεση αυτή βασίζεται αφ' ενός στο γεγονός ότι η ινσουλίνη έχει κατασταλτική δράση πάνω σε έναν αριθμό κυτοχρωμάτων *CYPs* (Yoshida et al., 1996), (Woodcroft and Novak, 1997), (Woodcroft and Novak, 1999) και αφ' ετέρου στο γεγονός ότι η έκκριση της ινσουλίνης βρίσκεται

υπό τον έλεγχο των D₂-ντοπαμινεργικών υποδοχέων των β-κυττάρων του παγκρέατος (Rubi et al., 2005). Ας σημειωθεί ότι αναστολή των D₂-ντοπαμινεργικών υποδοχέων οδηγεί σε αύξηση της απελευθέρωσης της ινσουλίνης (Konstandi et al., 2006). *In vitro* πειράματα με καλλιέργειες πρωτογενών ηπατοκυττάρων, τα οποία εκτέθηκαν σε ινσουλίνη, επιβεβαίωσαν ότι η ινσουλίνη έχει ισχυρή κατασταλτική δράση πάνω στα CYP3A1/2, CYP2C11 και CYP2D1/2 και αυτή η επίδραση μεσολαβείται από το μονοπάτι PI3K/Akt. Όντως, προηγούμενη έκθεση των ηπατοκυττάρων σε wortmannin (αναστολέα της PI3K, 30 λεπτά πριν την προσθήκη της ινσουλίνης), εμπόδιζε πλήρως την κατασταλτική δράση της ινσουλίνης στα CYPs.

Περαιτέρω πειράματα, φανέρωσαν ότι χορήγηση SULP στους επίμυες αυξάνει τα επίπεδα ινσουλίνης στο πλάσμα και ενεργοποιεί το μονοπάτι PI3K/Akt/FoxO1. Η ενεργοποίηση του μονοπατιού αυτού οδηγεί στη φωσφορυλίωση του FoxO1 στον πυρήνα, την μετατόπισή του στο κυτταρόπλασμα και την ως εκ τούτου, απενεργοποίησή του και επομένως τον τερματισμό της μεταγραφής των CYPs (Kim and Novak, 2007), (Kodama et al., 2004). Το μονοπάτι Akt/p70S6K δε φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στη κατασταλτική δράση της SULP πάνω στα προαναφερθέντα CYPs, αφού η ενεργοποίηση της p70S6K είναι συνδεδεμένη με την αύξηση της πρωτεϊνοσύνθεσης και της μετάφρασης γονιδίων (Kim and Novak, 2007). Ο μεταγραφικός παράγοντας FoxO1 είναι μέρος πολύπλοκων cross-talk συστημάτων μηχανισμών στους οποίους παίρνουν μέρος ο CAR, ο PXR (Kodama et al., 2004) και ο HNF4α (Hirota et al., 2003). Αυτοί οι πυρηνικοί μεταγραφικοί παράγοντες, μαζί με τους RXR και HNF1α (Liddle et al., 1998), (Wiwi and Waxman, 2004) είναι από τους σημαντικότερους ρυθμιστές της έκφρασης των ηπατικών CYP γονιδίων, συμπεριλαμβανομένων των υποοικογενειών CYP3A και CYP2C (Dvorak and Pavek, 2010). Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η SULP καταστέλλει σε μεγάλο βαθμό την έκφραση των CAR, PXR, RXRα και HNF1α, υποδηλώνοντας ότι η κατασταλτική *in vivo* δράση της SULP πιθανόν να συνδέεται με την δράση της σε αυτούς τους πυρηνικούς υποδοχείς.

In vivo χορήγηση SULP αύξησε την έκφραση των eNOS και iNOS, ενζύμων που καταλύουν την έκλυση μονοξειδίου του αζώτου (NO), που διαδραματίζει κατασταλτικό ρόλο στην ρύθμιση διαφόρων γονιδίων. Θα μπορούσαν, επομένως οι παράγοντες αυτοί να παίζουν ρόλο, τουλάχιστον κατά ένα μέρος, στην κατασταλτική επίδραση της SULP στα CYPs, είτε άμεσα, είτε έμμεσα (Hara and Adachi, 2002).

Ο ρόλος της αυξητικής ορμόνης (GH) είναι επίσης, σημαντικός για την κατασταλτική *in vivo* δράση της SULT στην έκφραση των *CYP3A*, *CYP2C* και *CYP2D*. Η SULT μείωσε τα επίπεδα της GH στο πλάσμα των επίμυων, γεγονός που ακολουθήθηκε από μειωμένη φωσφορυλίωση του STAT5b, ο οποίος είναι ο πιο σημαντικός μεταγραφικός παράγοντας που εξαρτάται από την παλμική έκκριση της GH. Τόσο η GH, όσο και ο STAT5b έχουν περιγραφεί ως σημαντικοί ρυθμιστές της έκφρασης διαφόρων κυτοχρωμάτων *CYP* (Waxman and O'Connor, 2006), (Waxman and Holloway, 2009). Η προλακτίνη (PRL), η οποία έχει κατασταλτική επίδραση στην έκφραση ορισμένων *CYPs* (Yamazoe et al., 1987), ενδεχομένως μεσολαβεί, τουλάχιστον κατά ένα μέρος, στην κατασταλτική δράση της SULT στην έκφραση των *CYPs*. Είναι γνωστό ότι η έκκριση της PRL ελέγχεται αρνητικά από την ντοπαμίνη (Fitzgerald and Dinan, 2008).

Βασιζόμενοι στα ανωτέρω ευρήματα αλλά και παλιότερες μελέτες (Konstandi et al., 2008a), προκύπτει το ερώτημα για τις μακροπρόθεσμες συνέπειες τις οποίες μπορεί να έχει η θεραπεία με φάρμακα, τα οποία είναι D₂-ντοπαμινεργικοί ανταγωνιστές. Η χορήγηση αυτών των φαρμάκων είναι δυνατόν να καταστείλλει την έκφραση των πιο σημαντικών κυτοχρωμάτων (*CYP3A*, *CYP2C* and *CYP2D*), τα οποία μεταβολίζουν την πλειοψηφία των συνταγογραφούμενων φαρμάκων, με αποτέλεσμα τον μειωμένο μεταβολισμό των τελευταίων. Αυτό το γεγονός θα μπορούσε να έχει άμεσες και πιθανόν τραγικές συνέπειες για την αποτελεσματικότητα της φαρμακοθεραπείας και την τοξικότητα των φαρμάκων. Θα μπορούσε να επηρεαστεί επίσης, ο μεταβολικός ρυθμός τοξικών ουσιών και προκαρκινογόνων. Αξίζει να σημειωθεί, ότι ψυχωσικοί ασθενείς, οι οποίοι λαμβάνουν φαρμακοθεραπεία (συνήθως D₂-ανταγωνιστές) έχουν χαμηλότερη πιθανότητα για εκδήλωση ορισμένων μορφών καρκίνου (Rassidakis et al., 1973), (Rice, 1979), (Mortensen, 1989).

Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής φωτίζουν περαιτέρω το πολύπλοκο δίκτυο παραγόντων που ρυθμίζει τα κυτοχρώματα *CYP3A*, *CYP2C* και *CYP2D*. Συμβάλλουν στη βαθύτερη κατανόηση των σηματοδοτικών μονοπατιών, τα οποία λαμβάνουν μέρος στη ρύθμιση τους και ειδικά όσον αφορά τον έλεγχο του *CYP2D*, το οποίο μέχρι τώρα θεωρούνταν να εμφανίζει αντίσταση σε ορμονικό έλεγχο (Wojcikowski and Daniel, 2009). Βασιζόμενοι στα ευρήματα αυτής της μελέτης θα μπορούσαμε να πούμε συμπερασματικά, ότι το στρες και τα φάρμακα που στοχεύουν τους αδρενεργικούς και D₂-ντοπαμινεργικούς υποδοχείς, ως αγωνιστές ή ανταγωνιστές, είναι δυνατόν να

προκαλέσουν μεταβολές στο μεταβολισμό των περισσότερων φαρμάκων, μέσω της δράσης τους στην ρύθμιση των κυτοχρωμάτων CYP3A, CYP2C και CYP2D. Θα πρέπει λοιπόν, αυτοί οι παράγοντες να λαμβάνονται σοβαρά υπ' όψιν όταν σχεδιάζεται ένα θεραπευτικό σχήμα για ασθενείς που είναι εκτεθειμένοι σε στρες ή απαιτούν συνδυασμένη φαρμακευτική αγωγή, που συμπεριλαμβάνει αδρενεργικούς ή D₂-ντοπαμινεργικούς αγωνιστές ή ανταγωνιστές.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Το ψυχολογικό στρες είναι σημαντικός παράγοντας ρύθμισης της έκφρασης των *CYP3A*, *CYP2C* και *CYP2D*. Ειδικά, η έκθεση σε στρες σε πολύ νεαρή ηλικία (στρες μητρικής αποστέρησης ή MDS) προκαλεί μακροπρόθεσμες μεταβολές στον ΥΥΕ άξονα, ο οποίος μέσω των κατεχολαμινών και των γλυκοκορτικοειδών επηρεάζει την έκφραση των *CYPs*. Επίσης, η κατά την ενηλικίωση επανειλημμένη έκθεση σε στρες (στρες περιορισμού ή RS) τροποποιεί το ηπατικό μεταβολικό προφίλ των επιμύων.
- Το στρες είναι εντελώς απρόβλεπτος παράγοντας ελέγχου της έκφρασης των πιο σημαντικών κυτοχρωμάτων. Το κάθε ισοένζυμο *CYP* φαίνεται να επηρεάζεται με διαφορετικό τρόπο (επαγωγή ή αναστολή) από ένα συγκεκριμένο μοντέλο στρες. Από την άλλη πλευρά, η μεταβολή της έκφρασης ενός ισοενζύμου *CYP* εξαρτάται πλήρως από το είδος του στρες το οποίο χρησιμοποιείται, επί παραδείγματι, το *CYP2C11* επάγεται από το MDS, αλλά δεν επηρεάζεται καθόλου από το RS.
- Η διέγερση των ηπατικών α- και β- αδρενεργικών υποδοχέων με αδρενεργικούς αγωνιστές, προκαλεί αύξηση της έκφρασης των *CYP3A*, *CYP2C* και *CYP2D* και αυτό συντελείται μέσω των μονοπατιών cAMP/PKA και JNK. Αντιθέτως, χορήγηση των ίδιων αγωνιστών των α- και β-αδρενουποδοχέων *in vivo*, προκαλεί καταστολή της έκφρασης των ανωτέρω κυτοχρωμάτων. Η διαφορά αυτή πιθανώς, οφείλεται στην συνδυασμένη δράση κεντρικών και περιφερικών αδρενεργικών μονοπατιών, όπως επίσης και στην επίδραση κυτοκινών και ορμονών (GH, TH, γλυκοκορτικοειδών, PRL), δράση που υπερκαλύπτει εκείνη των ηπατικών αδρενεργικών οδών μεταγωγής σήματος στα *CYPs*.
- Αρκετοί πυρηνικοί μεταγραφικοί παράγοντες παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της έκφρασης των υπό μελέτην *CYPs*. Η επαγωγή του *PXR* φαίνεται να σχετίζεται με την επαγωγή στην έκφραση των *CYPs* μετά από έκθεση σε RS, ενώ η μείωση της έκφρασης του *PXR* φαίνεται να συνδέεται με την μείωση της έκφρασης των *CYPs* από τους αδρενεργικούς αγωνιστές. Ο *RXR* φαίνεται να

παίζει ρόλο μόνο στην δράση των α - και β -αδρενεργικών αγωνιστών, αφού μείωση της έκφρασής του δείχνει να συσχετίζεται με την καταστολή των *CYPs*. Ο CAR δεν δείχνει να έχει σημαντικό ρόλο ούτε μετά από την έκθεση στο στρες, αλλά ούτε και κατά τη διέγερση των αδρενεργικών υποδοχέων από τους αγωνιστές που χρησιμοποιήθηκαν.

- Ο παράγοντας STAT5b δε φαίνεται να παίζει ρόλο στην ρύθμιση της έκφρασης των *CYPs* μετά από έκθεση σε στρες. Αντιθέτως, οι μεταβολές που παρατηρούνται στην έκφραση των *CYPs*, μετά από φαρμακολογικούς χειρισμούς με α - και β -αγωνιστές, φαίνεται να συνδέονται με εκείνες των STAT5b, σε συνδυασμό με μεταβολές στον HNF4 α και HNF1 α .
- Η αναστολή των ηπατικών D₂-ντοπαμινεργικών υποδοχέων με SULP προκάλεσε επαγωγή των *CYPs*, ενώ αντίθετα, συστηματική χορήγηση SULP κατέστειλε ισχυρά τα *CYPs*. Η δράση αυτή *in vivo*, προφανώς είναι απότοκη της συνδυασμένης επίδρασης κεντρικών και περιφερικών D₂-ντοπαμινεργικών συστημάτων, τα οποία επηρεάζουν διάφορα ορμονικά συστήματα, με κεντρικό ρόλο την επίδρασή τους στην έκλυση της ινσουλίνης.
- Η SULP δρα ανταγωνιστικά στους D₂-ντοπαμινεργικούς υποδοχείς του παγκρέατος και προκαλεί αύξηση των επιπέδων ινσουλίνης, η οποία ενεργοποιεί το μονοπάτι Akt/PI3K/FoxO1. Η φωσφορυλίωση του FoxO1 προκαλεί την έξοδό του από τον πυρήνα και ως εκ τούτου την απενεργοποίησή του και την καταστολή της έκφρασης των *CYPs*.
- Η αναστολή των D₂-υποδοχέων με SULP επηρεάζει σημαντικά την έκφραση των πυρηνικών υποδοχέων, καταστέλλοντας τους CAR, PXR, RXR και HNF1 α . Η καταστολή των *CYPs* από SULP θα μπορούσε να συνδέεται, με αυτή της την ενέργεια.

- Τέλος, η Sulp αναστέλλοντας τους D₂-ντοπαμινεργικούς υποδοχείς, προκαλεί ελάττωση της έκκρισης της GH, γεγονός που καταστέλλει την φωσφορυλίωση του STAT5b. Η καταστολή της ενεργοποίησης του STAT5b στον πυρήνα οδηγεί στην μειωρύθμιση των CYPs.
- Τα ευρήματα της παρούσας εργασίας είναι σημαντικά για την κατανόηση των μηχανισμών ρύθμισης της έκφρασης των CYP3A, CYP2C και CYP2D. Για πρώτη φορά παρέχονται σημαντικές πληροφορίες για την ρύθμιση αυτών των κυτοχρωμάτων από το στρες, τα αδρενεργικά- και τα D₂-ντοπαμινεργικά μονοπάτια. Παρ' όλα αυτά, θεωρείται απαραίτητη η περαιτέρω πειραματική μελέτη των μηχανισμών που ρυθμίζουν τη μεταβολική ικανότητα του ήπατος, με έμφαση στα κυτοχρώματα που μεταβολίζουν την πλειονότητα των συνταγογραφούμενων φαρμάκων, αλλά και η κλινική διερεύνηση των συνεπειών που συνεπάγεται η επίδραση των συστημάτων του στρες στα CYPs.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα ηπατικά κυτοχρώματα CYPs (P450s) είναι μια μεγάλη υπερ-οικογένεια πρωτεϊνών, οι οποίες εντοπίζονται σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς. Η σημασία τους είναι τεράστια, αφού μεταβολίζουν μια τεράστια ποικιλία ενδογενών ουσιών αλλά και ξενοβιοτικών. Οι πιο σημαντικές υποοικογένειες κυτοχρωμάτων CYP είναι η CYP3A, η CYP2C και η CYP2D, εξαιτίας του ρόλου τους στο μεταβολισμό της πλειονότητας των πιο συχνά συνταγογραφούμενων φαρμάκων. Η γνώση όσον αφορά τους παράγοντες, που μπορούν να προκαλέσουν επαγωγή ή αναστολή των κυτοχρωμάτων CYP είναι εξαιρετικής σημασίας, αφού κάθε μεταβολή στην έκφραση και την δραστικότητα τους μπορεί να έχει σοβαρότατες συνέπειες στην αποτελεσματικότητα της φαρμακευτικής αγωγής αλλά και στην φαρμακοτοξικότητα. Η αναστολή των ηπατικών CYPs μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένα επίπεδα ενός φαρμάκου-υποστρώματος στο πλάσμα και στην ανάπτυξη τοξικών εκδηλώσεων. Αντίθετα, η επαγωγή των CYPs μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένη αποτελεσματικότητα ή ακόμη και πλήρη αποτυχία της φαρμακοθεραπείας. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση στον επίμυ της επίδρασης του στρες στη ρύθμιση της έκφρασης των πιο σημαντικών για τον μεταβολισμό φαρμάκων κυτοχρωμάτων, των CYP3A, CYP2C και CYP2D. Επίσης, διερευνήθηκε ο ρόλος των αδρενεργικών υποδοχέων, των γλυκοκορτικοειδών καθώς και των μονοπατιών μεταγωγής σήματος (cAMP/PKA, JNK, GH/STAT5b) στη ρύθμιση των ανωτέρω κυτοχρωμάτων. Μελετήθηκε επίσης, ο ρόλος των D₂-ντοπαμινεργικών υποδοχέων στη ρύθμιση της έκφρασης των CYP γονιδίων καθώς και η συμμετοχή του μονοπατιού μεταγωγής σήματος PI3K/Akt/FoxO1, αλλά και του μεταγραφικού παράγοντα STAT5b. Για την ερευνητική προσέγγιση αυτών των θεμάτων, έγιναν τόσο *in vivo* πειράματα με ενήλικες αρσενικούς επίμυες, όσο και *in vitro* πειράματα με καλλιέργειες πρωτογενών ηπατοκυττάρων, που απομονώθηκαν από το ήπαρ επιμύων. Οι μέθοδοι, οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν συμπεριλαμβάνουν την Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC) για την μέτρηση την ενζυμικής δραστικότητας των υπό μελέτην CYP3A, CYP2C και CYP2D, την ανοσοαποτύπωση κατά Western για την εκτίμηση των μεταβολών σε επίπεδο αποπρωτεΐνης, καθώς και την μέθοδο real-time polymerase chain reaction (RT-PCR, q-PCR) για την ποσοτική εκτίμηση των επιπέδων mRNA των ανωτέρω CYP γονιδίων.

Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης κατέδειξαν ότι το ψυχολογικό στρες είναι ένας παράγοντας τεράστιας σημασίας για τη ρύθμιση της έκφρασης των *CYPs*. Πιο συγκεκριμένα, το στρες της μητρικής αποστέρησης, στο οποίο εκτέθηκαν οι επίμυες σε πολύ μικρή ηλικία προκάλεσε την αύξηση της έκφρασης των *CYP3A1/2* και *CYP2C11*, ενώ το *CYP2D* δεν επηρεάστηκε σημαντικά. Αντιθέτως, το στρες περιορισμού προκάλεσε σημαντικές μεταβολές στην έκφραση του *CYP3A2*, του *CYP2D* και μικρότερες μεταβολές στο *CYP2A*. Επιπροσθέτως, επιβεβαιώθηκε η επαγωγική δράση των γλυκοκορτικοειδών στο *CYP3A* και η κατασταλτική τους δράση στο *CYP2C*. Σημαντικά ευρήματα μετά από *in vivo* και *in vitro* πειράματα, τα οποία επικεντρώθηκαν στη μελέτη των αδρενεργικών μονοπατιών φανέρωσαν ότι τα μονοπάτια cAMP/PKA, JNK και του άξονα GH/STAT5b διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της ρύθμισης της έκφρασης των *CYPs*. Η συμμετοχή των πυρηνικών υποδοχέων PXR, RXR και HNF4α φαίνεται να είναι σημαντική στις μεταβολές που παρατηρήθηκαν στην έκφραση αυτών των *CYPs*. Επιπλέον, η αναστολή των D₂-ντοπαμινεργικών υποδοχέων *in vivo*, οδήγησε σε μεγάλη καταστολή των *CYP3A*, *CYP2C* και *CYP2D*. Αντιθέτως, αναστολή των ηπατικών D₂-υποδοχέων *in vitro*, οδήγησε σε επαγωγή αυτών των *CYPs*. Αυτό το εύρημα οδήγησε στην υπόθεση ότι η ινσουλίνη πιθανόν διαδραματίζει στρατηγικής σημασίας ρόλο στον έλεγχο της ρύθμισης της έκφρασης των *CYPs*, αφού αποδείχθηκε ότι η αναστολή *in vivo* των D₂-υποδοχέων ενεργοποιεί το ινσουλινοεξαρτώμενο μονοπάτι PI3K/Akt, ενώ περαιτέρω έρευνες έδειξαν τον FoxO1 ως τελικό μεταγραφικό παράγοντα ρύθμισης. Παράλληλα, ο άξονας GH/STAT5b φαίνεται να παίζει επίσης πολύ σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο και στην περίπτωση των D₂-ντοπαμινεργικών μονοπατιών.

Συμπερασματικά, η μελέτη αυτή έδειξε ότι το στρες, τα γλυκοκορτικοειδή και αγωνιστές αδρενεργικών υποδοχέων αποτελούν παράγοντες, που πρέπει πάντα να λαμβάνονται υπόψιν πριν τη συνταγογράφηση σε ασθενείς. Επιπλέον, η μελέτη αυτή κατέδειξε για πρώτη φορά την επίδραση των παγκρεατικών D₂-ντοπαμινεργικών υποδοχέων και του μονοπατιού PI3K/Akt/FoxO1 στη ρύθμιση της έκφρασης των *CYP3A*, *CYP2C* και *CYP2D*. Διαπιστώθηκε επίσης, η συμμετοχή της GH, της PRL και των θυρεοειδικών ορμονών στις μεταβολές που προκάλεσαν οι φαρμακολογικοί χειρισμοί των D₂-ντοπαμινεργικών υποδοχέων.

SUMMARY

"Investigation of the role of the adrenergic and dopaminergic systems in the regulation of the cytochromes CYP3A1/2, CYP2C11 and CYP2D1/2"

Daskalopoulos Evangelos-Panagiotis

The hepatic cytochrome CYPs (P450s) constitute a large superfamily of proteins that are expressed in all living organisms. Their role is crucial, since they metabolize a broad variety of substrates, both endogenous and exogenous (xenobiotics). From pharmacological point of view, the most important subfamilies of CYPs are the CYP3A, CYP2C and CYP2D, because they are involved in the metabolism of the majority of the most commonly prescribed drugs. The knowledge regarding factors that might affect their regulation is of paramount significance, because it is well established that any factor modifying the expression and activity of CYPs may lead to complications in drug therapy. In particular, induced *CYP* expression may lead to increased hepatic drug metabolism and consequently, to reduced drug concentrations in plasma, followed by reduced drug efficacy or even sometimes the complete failure of the pharmacotherapy. On the other hand, inhibition of *CYPs* may lead to reduced hepatic drug metabolism and thus, to elevated concentrations of the drug in plasma, a condition usually connected to the development of detrimental side-effects.

This study aimed to serve several purposes. The first purpose of this study was to evaluate the impact of stress and glucocorticoids on the regulation of the most important hepatic *CYPs* (CYP3A, CYP2C and CYP2D) in the rat. Within the scopes of the present study was the investigation of the role of alpha- and beta- adrenergic receptor-linked pathways and the impact of the related signaling pathways (cAMP/PKA, JNK, GH/STAT5b) in the regulation of the aforementioned CYPs. The role of D₂-dopaminergic receptors and the related signaling pathways, PI3K/Akt/FoxO1 and GH/STAT5b, in the regulation of the main hepatic *CYPs* was also investigated. *In vivo* and *in vitro* experiments were employed to address these subjects, using adult male Wistar rats and primary hepatocyte cultures, respectively. Alterations in CYP-dependent enzymatic activities were assessed using the High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Modifications of the specific CYP expressions were also evaluated at

apoprotein and mRNA level, employing either western blot or q-PCR analysis, respectively. For this purpose, specific antibodies and primers were used.

The results of this study have clearly indicated psychological stress as an extremely important factor in the regulation of the most important *CYPs*. In particular, rats that responded to early in life maternal deprivation stress, showed induced hepatic expression of *CYP3A1/2* and *CYP2C11*, while the *CYP2D* was not significantly affected. In contrast, repeated exposure to restraint stress resulted in significant changes in the hepatic expression of *CYP3A2* and *CYP2D*. The effect of both types of stress on *CYP2A* was less pronounced. Moreover, the inductive effect of glucocorticoids on *CYP3A* and their inhibitory effect on *CYP2C* was confirmed. The *in vitro* and *in vivo* experiments that have focused on the role of adrenergic receptor pathways, revealed that the signaling pathways cAMP/PKA, JNK and GH/STAT5b hold major roles in the regulation of the above mentioned *CYPs*. In this regulation, several nuclear receptors have a determinant role. *In vivo* experiments using the D₂-dopaminergic receptor blocking agent, sulpiride, indicated a dramatic inhibition of the hepatic *CYP3A*, *CYP2C* and *CYP2D* expression. Nonetheless, *in vitro* experiments indicated that the direct blockade of hepatic D₂-receptors by sulpiride had opposite effects. Based on these findings, we hypothesized that insulin may be involved in the *in vivo* sulpiride-induced downregulating effect on hepatic *CYPs*. Further investigation of this hypothesis using primary hepatocytes treated with insulin alone or in combination with wortmannin, an inhibitor of the insulin-regulated PI3K/Akt signaling pathway, combined to the *in vivo* sulpiride effects on this signaling pathway, has strengthened the basis of this hypothesis. Further studies showed that the transcription factor FoxO1, holds a significant role in the regulation of the aforementioned *CYPs*. Moreover, the data of this study revealed the participation of the GH/STAT5b signaling pathway in the stress-, AR- and D₂-receptor-mediated modifications in *CYP* regulation.

In conclusion, this study indicated that stress and the major components of the stress system, glucocorticoids and adrenergic receptors, hold determinant roles in the regulation of the hepatic drug metabolizing enzymes. This fact should always be taken into account before initiating a pharmacotherapy. Furthermore, this study has shown for the first time that, profoundly, the pancreatic D₂-dopaminergic receptors and the PI3K/Akt/FoxO1 signaling pathway hold a key role in the regulation of *CYP3A*, *CYP2C* and *CYP2D* in the rat liver. Finally, this study has shed light in the involvement of

various hormones in the stress-, AR- and D₂-receptor mediated regulation of the aforementioned cytochromes and has enriched our knowledge regarding the role of the nuclear transcription factors CAR, PXR, RXR and HNFs in this regulation.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abebe W and Mozaffari M (2010) Endothelial dysfunction in diabetes: potential application of circulating markers as advanced diagnostic and prognostic tools *EPMA Journal* **1**(1):32-45.
- Adeghate E, Ponery AS and Sheen R (2001) Streptozotocin-Induced diabetes mellitus is associated with increased pancreatic tissue levels of noradrenaline and adrenaline in the rat. *Pancreas* **22**(3):311-316.
- Agrawal AK and Shapiro BH (2000) Differential expression of gender-dependent hepatic isoforms of cytochrome P-450 by pulse signals in the circulating masculine episodic growth hormone profile of the rat. *J Pharmacol Exp Ther* **292**(1):228-237.
- Aguilera G (2011) HPA axis responsiveness to stress: implications for healthy aging. *Exp Gerontol* **46**(2-3):90-95.
- Aitken AE, Lee CM and Morgan ET (2008) Roles of nitric oxide in inflammatory downregulation of human cytochromes P450. *Free Radic Biol Med* **44**(6):1161-1168.
- Aitken AE, Richardson TA and Morgan ET (2006) Regulation of drug-metabolizing enzymes and transporters in inflammation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **46**:123-149.
- Alexander B (1998) The role of nitric oxide in hepatic metabolism. *Nutrition* **14**(4):376-390.
- Allabi AC, Gala JL and Horsmans Y (2005) CYP2C9, CYP2C19, ABCB1 (MDR1) genetic polymorphisms and phenytoin metabolism in a Black Beninese population. *Pharmacogenet Genomics* **15**(11):779-786.
- Ariyoshi N, Miyamoto M, Umetsu Y, Kunitoh H, Dosaka-Akita H, Sawamura Y, Yokota J, Nemoto N, Sato K and Kamataki T (2002) Genetic polymorphism of CYP2A6 gene and tobacco-induced lung cancer risk in male smokers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **11**(9):890-894.
- Arneric SP, Chow SA, Long JP and Fischer LJ (1984) Dopamine analog-induced hyperglycemia in rats: involvement of the adrenal medulla and the endocrine pancreas. *J Pharmacol Exp Ther* **228**(3):551-559.
- Arpiainen S (2007) Transcriptional regulation of the hepatic cytochrome P450 2A5 gene - accessed 02-10-2011.

- Arvanitidis K, Ragia G, Iordanidou M, Kyriaki S, Xanthi A, Tavridou A and Manolopoulos VG (2007) Genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19 and CYP3A5 in the Greek population. *Fundam Clin Pharmacol* **21**(4):419-426.
- Asnaghi L, Bruno P, Priulla M and Nicolini A (2004) mTOR: a protein kinase switching between life and death. *Pharmacol Res* **50**(6):545-549.
- Assenat E, Gerbal-Chaloin S, Larrey D, Saric J, Fabre JM, Maurel P, Vilarem MJ and Pascussi JM (2004) Interleukin 1beta inhibits CAR-induced expression of hepatic genes involved in drug and bilirubin clearance. *Hepatology* **40**(4):951-960.
- Bahadur N, Leathart JB, Mutch E, Steimel-Crespi D, Dunn SA, Gilissen R, Houdt JV, Hendrickx J, Mannens G, Bohets H, Williams FM, Armstrong M, Crespi CL and Daly AK (2002) CYP2C8 polymorphisms in Caucasians and their relationship with paclitaxel 6alpha-hydroxylase activity in human liver microsomes. *Biochem Pharmacol* **64**(11):1579-1589.
- Balendiran GK, Dabur R and Fraser D (2004) The role of glutathione in cancer. *Cell Biochem Funct* **22**(6):343-352.
- Barr RK and Bogoyevitch MA (2001) The c-Jun N-terminal protein kinase family of mitogen-activated protein kinases (JNK MAPKs). *Int J Biochem Cell Biol* **33**(11):1047-1063.
- Bergeron RM, Serron SC, Rinehart JJ, Cawley GF and Backes WL (1998) Pituitary component of the aromatic hydrocarbon-mediated expression of CYP2B and CYP2C11. *Xenobiotica* **28**(3):303-312.
- Black PH (2006) The inflammatory consequences of psychologic stress: relationship to insulin resistance, obesity, atherosclerosis and diabetes mellitus, type II. *Med Hypotheses* **67**(4):879-891.
- BNF 62 (2011) *British National Formulary 62*. Pharmaceutical Press.
- Bonci A and Hopf FW (2005) The dopamine D2 receptor: new surprises from an old friend. *Neuron* **47**(3):335-338.
- Boswell-Smith V, Spina D and Page CP (2006) Phosphodiesterase inhibitors. *Br J Pharmacol* **147 Suppl 1**:S252-257.
- Brtko J and Dvorak Z (2011) Role of retinoids, rexinoids and thyroid hormone in the expression of cytochrome p450 enzymes. *Curr Drug Metab* **12**(2):71-88.

- Bucheler MM, Hadamek K and Hein L (2002) Two alpha(2)-adrenergic receptor subtypes, alpha(2A) and alpha(2C), inhibit transmitter release in the brain of gene-targeted mice. *Neuroscience* **109**(4):819-826.
- Buckingham JC (2006) Glucocorticoids: exemplars of multi-tasking. *Br J Pharmacol* **147 Suppl 1**:S258-268.
- Burgering BM (2008) A brief introduction to FOXOlogy. *Oncogene* **27**(16):2258-2262.
- Burk O and Wojnowski L (2004) Cytochrome P450 3A and their regulation. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **369**(1):105-124.
- Cagampang FR, Poore KR and Hanson MA (2011) Developmental origins of the metabolic syndrome: body clocks and stress responses. *Brain Behav Immun* **25**(2):214-220.
- Cai Y, Konishi T, Han G, Campwala KH, French SW and Wan YJ (2002) The role of hepatocyte RXR alpha in xenobiotic-sensing nuclear receptor-mediated pathways. *Eur J Pharm Sci* **15**(1):89-96.
- Cargnello M and Roux PP (2011) Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* **75**(1):50-83.
- Carlson TJ and Billings RE (1996) Role of nitric oxide in the cytokine-mediated regulation of cytochrome P-450. *Mol Pharmacol* **49**(5):796-801.
- Castano JG (1991) Regulation of gene expression by insulin. *Adv Enzyme Regul* **31**:185-194.
- Cederbaum AI (2010) Role of CYP2E1 in ethanol-induced oxidant stress, fatty liver and hepatotoxicity. *Dig Dis* **28**(6):802-811.
- Chang L and Karin M (2001) Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* **410**(6824):37-40.
- Charmandari E, Kino T, Souvatzoglou E and Chrousos GP (2003) Pediatric stress: hormonal mediators and human development. *Horm Res* **59**(4):161-179.
- Charmandari E, Tsigos C and Chrousos G (2005) Endocrinology of the stress response. *Annu Rev Physiol* **67**:259-284.
- Chen GF, Ronis MJ, Ingelman-Sundberg M and Badger TM (1999) Hormonal regulation of microsomal cytochrome P4502E1 and P450 reductase in rat liver and kidney. *Xenobiotica* **29**(5):437-451.
- Chen JD and Evans RM (1995) A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* **377**(6548):454-457.

- Chen Y and Goldstein JA (2009) The transcriptional regulation of the human CYP2C genes. *Curr Drug Metab* **10**(6):567-578.
- Chen Y, Kissling G, Negishi M and Goldstein JA (2005) The nuclear receptors constitutive androstane receptor and pregnane X receptor cross-talk with hepatic nuclear factor 4alpha to synergistically activate the human CYP2C9 promoter. *J Pharmacol Exp Ther* **314**(3):1125-1133.
- Cheung C, Akiyama TE, Kudo G and Gonzalez FJ (2003) Hepatic expression of cytochrome P450s in hepatocyte nuclear factor 1-alpha (HNF1alpha)-deficient mice. *Biochem Pharmacol* **66**(10):2011-2020.
- Chiang GG and Abraham RT (2005) Phosphorylation of mammalian target of rapamycin (mTOR) at Ser-2448 is mediated by p70S6 kinase. *J Biol Chem* **280**(27):25485-25490.
- Chow T, Imaoka S, Hiroi T and Funae Y (1999) Developmental changes in the catalytic activity and expression of CYP2D isoforms in the rat liver. *Drug Metab Dispos* **27**(2):188-192.
- Christensen M, Andersson K, Dalen P, Mirghani RA, Muirhead GJ, Nordmark A, Tybring G, Wahlberg A, Yasar U and Bertilsson L (2003) The Karolinska cocktail for phenotyping of five human cytochrome P450 enzymes. *Clin Pharmacol Ther* **73**(6):517-528.
- Chrousos GP (1995) The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation. *N Engl J Med* **332**(20):1351-1362.
- Chrousos GP (2007) Organization and Integration of the Endocrine System. *Sleep Med Clin* **2**(2):125-145.
- Chrousos GP (2009) Stress and disorders of the stress system. *Nat Rev Endocrinol* **5**(7):374-381.
- Chrousos GP and Gold PW (1992) The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. *JAMA* **267**(9):1244-1252.
- Chrousos GP and Kino T (2009) Glucocorticoid signaling in the cell. Expanding clinical implications to complex human behavioral and somatic disorders. *Ann N Y Acad Sci* **1179**:153-166.
- Cook CS, Berry LM, Kim DH, Burton EG, Hribar JD and Zhang L (2002) Involvement of CYP3A in the metabolism of eplerenone in humans and dogs: differential metabolism by CYP3A4 and CYP3A5. *Drug Metab Dispos* **30**(12):1344-1351.

- Cooper JR, Bloom FE and Roth RH (1996) Norepinephrine and epinephrine, In: House, J. (Ed.), *The Biochemical Basis of Neuropharmacology*, σελ. 226–292, Seventh Edition. Oxford University Press, New York.
- Corchero J, Granvil CP, Akiyama TE, Hayhurst GP, Pimprale S, Feigenbaum L, Idle JR and Gonzalez FJ (2001) The CYP2D6 humanized mouse: effect of the human CYP2D6 transgene and HNF4alpha on the disposition of debrisoquine in the mouse. *Mol Pharmacol* **60**(6):1260-1267.
- Craig TJ and Lin SP (1981) Mortality among psychiatric inpatients. Age-adjusted comparison of populations before and after psychotropic drug era. *Arch Gen Psychiatry* **38**(8):935-938.
- Cribb AE, Peyrou M, Muruganandan S and Schneider L (2005) The endoplasmic reticulum in xenobiotic toxicity. *Drug Metab Rev* **37**(3):405-442.
- Dai D, Zeldin DC, Blaisdell JA, Chanas B, Coulter SJ, Ghanayem BI and Goldstein JA (2001) Polymorphisms in human CYP2C8 decrease metabolism of the anticancer drug paclitaxel and arachidonic acid. *Pharmacogenetics* **11**(7):597-607.
- Daunt DA, Hurt C, Hein L, Kallio J, Feng F and Kobilka BK (1997) Subtype-specific intracellular trafficking of alpha2-adrenergic receptors. *Mol Pharmacol* **51**(5):711-720.
- Davey HW, Park SH, Grattan DR, McLachlan MJ and Waxman DJ (1999) STAT5b-deficient mice are growth hormone pulse-resistant. Role of STAT5b in sex-specific liver p450 expression. *J Biol Chem* **274**(50):35331-35336.
- De Morais SM, Wilkinson GR, Blaisdell J, Meyer UA, Nakamura K and Goldstein JA (1994) Identification of a new genetic defect responsible for the polymorphism of (S)-mephenytoin metabolism in Japanese. *Mol Pharmacol* **46**(4):594-598.
- De Vriendt T, Moreno LA and De Henauw S (2009) Chronic stress and obesity in adolescents: scientific evidence and methodological issues for epidemiological research. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* **19**(7):511-519.
- de Wildt SN, Kearns GL, Leeder JS and van den Anker JN (1999) Cytochrome P450 3A: ontogeny and drug disposition. *Clin Pharmacokinet* **37**(6):485-505.
- Desta Z, Zhao X, Shin JG and Flockhart DA (2002) Clinical significance of the cytochrome P450 2C19 genetic polymorphism. *Clin Pharmacokinet* **41**(12):913-958.

- Diczfalusy U, Miura J, Roh HK, Mirghani RA, Sayi J, Larsson H, Bodin KG, Allqvist A, Jande M, Kim JW, Aklillu E, Gustafsson LL and Bertilsson L (2008) 4Beta-hydroxycholesterol is a new endogenous CYP3A marker: relationship to CYP3A5 genotype, quinine 3-hydroxylation and sex in Koreans, Swedes and Tanzanians. *Pharmacogenet Genomics* **18**(3):201-208.
- Docherty JR (1998) Subtypes of functional alpha1- and alpha2-adrenoceptors. *Eur J Pharmacol* **361**(1):1-15.
- Dorado P, Caceres MC, Pozo-Guisado E, Wong ML, Licinio J and Llerena A (2005) Development of a PCR-based strategy for CYP2D6 genotyping including gene multiplication of worldwide potential use. *Biotechniques* **39**(4):571-574.
- Dremier S, Kopperud R, Doskeland SO, Dumont JE and Maenhaut C (2003) Search for new cyclic AMP-binding proteins. *FEBS Lett* **546**(1):103-107.
- Dvorak Z, Modriansky M, Pichard-Garcia L, Balaguer P, Vilarem MJ, Ulrichova J, Maurel P and Pascussi JM (2003) Colchicine down-regulates cytochrome P450 2B6, 2C8, 2C9, and 3A4 in human hepatocytes by affecting their glucocorticoid receptor-mediated regulation. *Mol Pharmacol* **64**(1):160-169.
- Dvorak Z and Pavek P (2010) Regulation of drug-metabolizing cytochrome P450 enzymes by glucocorticoids. *Drug Metab Rev* **42**(4):621-635.
- Dvorak Z, Vrzal R, Henklova P, Jancova P, Anzenbacherova E, Maurel P, Svecova L, Pavek P, Ehrmann J, Havlik R, Bednar P, Lemr K and Ulrichova J (2008) JNK inhibitor SP600125 is a partial agonist of human aryl hydrocarbon receptor and induces CYP1A1 and CYP1A2 genes in primary human hepatocytes. *Biochem Pharmacol* **75**(2):580-588.
- Ebel RE, O'Keefe DH and Peterson JA (1975) Nitric oxide complexes of cytochrome P-450. *FEBS Lett* **55**(1):198-201.
- El-Mansoury AM and Morgan NG (1998) Activation of protein kinase C modulates alpha2-adrenergic signalling in rat pancreatic islets. *Cell Signal* **10**(9):637-643.
- El-Sankary W, Bombail V, Gibson GG and Plant N (2002) Glucocorticoid-mediated induction of CYP3A4 is decreased by disruption of a protein: DNA interaction distinct from the pregnane X receptor response element. *Drug Metab Dispos* **30**(9):1029-1034.
- El-Sankary W, Plant NJ, Gibson GG and Moore DJ (2000) Regulation of the CYP3A4 gene by hydrocortisone and xenobiotics: role of the glucocorticoid and pregnane X receptors. *Drug Metab Dispos* **28**(5):493-496.

- Eliasson E, Mkrtchian S, Halpert JR and Ingelman-Sundberg M (1994) Substrate-regulated, cAMP-dependent phosphorylation, denaturation, and degradation of glucocorticoid-inducible rat liver cytochrome P450 3A1. *J Biol Chem* **269**(28):18378-18383.
- Ellenbroek BA and Cools AR (2002) Apomorphine susceptibility and animal models for psychopathology: genes and environment. *Behav Genet* **32**(5):349-361.
- Ellenbroek BA, van den Kroonenberg PT and Cools AR (1998) The effects of an early stressful life event on sensorimotor gating in adult rats. *Schizophr Res* **30**(3):251-260.
- Epel ES (2009) Psychological and metabolic stress: a recipe for accelerated cellular aging? *Hormones (Athens)* **8**(1):7-22.
- Exton JH (1985) Mechanisms involved in alpha-adrenergic phenomena. *Am J Physiol* **248**(6 Pt 1):E633-647.
- Fenton TR and Gout IT (2011) Functions and regulation of the 70kDa ribosomal S6 kinases. *Int J Biochem Cell Biol* **43**(1):47-59.
- Ferguson SS, Chen Y, LeCluyse EL, Negishi M and Goldstein JA (2005) Human CYP2C8 is transcriptionally regulated by the nuclear receptors constitutive androstane receptor, pregnane X receptor, glucocorticoid receptor, and hepatic nuclear factor 4alpha. *Mol Pharmacol* **68**(3):747-757.
- Fingar DC and Blenis J (2004) Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression. *Oncogene* **23**(18):3151-3171.
- Fitzgerald P and Dinan TG (2008) Prolactin and dopamine: what is the connection? A review article. *J Psychopharmacol* **22**(2 Suppl):12-19.
- Fleming I and Busse R (1999) Signal transduction of eNOS activation. *Cardiovasc Res* **43**(3):532-541.
- Flierl MA, Rittirsch D, Huber-Lang M, Sarma JV and Ward PA (2008) Catecholamines-crafty weapons in the inflammatory arsenal of immune/inflammatory cells or opening pandora's box? *Mol Med* **14**(3-4):195-204.
- Flierl MA, Rittirsch D, Nadeau BA, Chen AJ, Sarma JV, Zetoune FS, McGuire SR, List RP, Day DE, Hoesel LM, Gao H, Van Rooijen N, Huber-Lang MS, Neubig RR and Ward PA (2007) Phagocyte-derived catecholamines enhance acute inflammatory injury. *Nature* **449**(7163):721-725.

- Flierl MA, Rittirsch D, Nadeau BA, Sarma JV, Day DE, Lentsch AB, Huber-Lang MS and Ward PA (2009) Upregulation of phagocyte-derived catecholamines augments the acute inflammatory response. *PLoS One* **4**(2):e4414.
- Friedman MA, Woodcock J, Lumpkin MM, Shuren JE, Hass AE and Thompson LJ (1999) The safety of newly approved medicines: do recent market removals mean there is a problem? *JAMA* **281**(18):1728-1734.
- Garner B, Pariante CM, Wood SJ, Velakoulis D, Phillips L, Soulsby B, Brewer WJ, Smith DJ, Dazzan P, Berger GE, Yung AR, van den Buuse M, Murray R, McGorry PD and Pantelis C (2005) Pituitary volume predicts future transition to psychosis in individuals at ultra-high risk of developing psychosis. *Biol Psychiatry* **58**(5):417-423.
- Gebert CA, Park SH and Waxman DJ (1999) Termination of growth hormone pulse-induced STAT5b signaling. *Mol Endocrinol* **13**(1):38-56.
- Gellner K, Eiselt R, Hustert E, Arnold H, Koch I, Haberl M, Deglmann CJ, Burk O, Buntefuss D, Escher S, Bishop C, Koebe HG, Brinkmann U, Klenk HP, Kleine K, Meyer UA and Wojnowski L (2001) Genomic organization of the human CYP3A locus: identification of a new, inducible CYP3A gene. *Pharmacogenetics* **11**(2):111-121.
- Gerbal-Chaloin S, Daujat M, Pascussi JM, Pichard-Garcia L, Vilarem MJ and Maurel P (2002) Transcriptional regulation of CYP2C9 gene. Role of glucocorticoid receptor and constitutive androstane receptor. *J Biol Chem* **277**(1):209-217.
- Gerbal-Chaloin S, Pascussi JM, Pichard-Garcia L, Daujat M, Waechter F, Fabre JM, Carrere N and Maurel P (2001) Induction of CYP2C genes in human hepatocytes in primary culture. *Drug Metab Dispos* **29**(3):242-251.
- Gibbs MA, Thummel KE, Shen DD and Kunze KL (1999) Inhibition of cytochrome P-450 3A (CYP3A) in human intestinal and liver microsomes: comparison of Ki values and impact of CYP3A5 expression. *Drug Metab Dispos* **27**(2):180-187.
- Giguere V (1999) Orphan nuclear receptors: from gene to function. *Endocr Rev* **20**(5):689-725.
- Gillam EM, Wunsch RM, Ueng YF, Shimada T, Reilly PE, Kamataki T and Guengerich FP (1997) Expression of cytochrome P450 3A7 in Escherichia coli: effects of 5' modification and catalytic characterization of recombinant enzyme expressed in bicistronic format with NADPH-cytochrome P450 reductase. *Arch Biochem Biophys* **346**(1):81-90.

- Girod JP and Brotman DJ (2004) Does altered glucocorticoid homeostasis increase cardiovascular risk? *Cardiovasc Res* **64**(2):217-226.
- Gonzalez FJ (2004) Cytochrome P450 humanised mice. *Hum Genomics* **1**(4):300-306.
- Gonzalez FJ (2005) Role of cytochromes P450 in chemical toxicity and oxidative stress: studies with CYP2E1. *Mutat Res* **569**(1-2):101-110.
- Gonzalez FJ (2008) Regulation of hepatocyte nuclear factor 4 alpha-mediated transcription. *Drug Metab Pharmacokinet* **23**(1):2-7.
- Gonzalez FJ and Gelboin HV (1994) Role of human cytochromes P450 in the metabolic activation of chemical carcinogens and toxins. *Drug Metab Rev* **26**(1-2):165-183.
- Gonzalez FJ and Kimura S (2001) Understanding the role of xenobiotic-metabolism in chemical carcinogenesis using gene knockout mice. *Mutat Res* **477**(1-2):79-87.
- Gonzalez FJ, Ueno T, Umeno M, Song BJ, Veech RL and Gelboin HV (1991) Microsomal ethanol oxidizing system: transcriptional and posttranscriptional regulation of cytochrome P450, CYP2E1. *Alcohol Alcohol Suppl* **1**:97-101.
- Gonzalez FJ and Yu AM (2006) Cytochrome P450 and xenobiotic receptor humanized mice. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **46**:41-64.
- Gorski JC, Hall SD, Becker P, Affrime MB, Cutler DL and Haehner-Daniels B (2000) In vivo effects of interleukin-10 on human cytochrome P450 activity. *Clin Pharmacol Ther* **67**(1):32-43.
- Grahame-Smith D and Aronson J (2002) *Oxford Textbook of Clinical Pharmacology and Drug Therapy (3rd edition)*.
- Gross KL and Cidlowski JA (2008) Tissue-specific glucocorticoid action: a family affair. *Trends Endocrinol Metab* **19**(9):331-339.
- Guengerich FP (1988) Oxidation of 17 alpha-ethynylestradiol by human liver cytochrome P-450. *Mol Pharmacol* **33**(5):500-508.
- Guengerich FP (2001) Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. *Chem Res Toxicol* **14**(6):611-650.
- Guengerich FP (2003) Cytochromes P450, drugs, and diseases. *Mol Interv* **3**(4):194-204.
- Guengerich FP (2004) Cytochrome P450: what have we learned and what are the future issues? *Drug Metab Rev* **36**(2):159-197.
- Guengerich FP (2006) Cytochrome P450s and other enzymes in drug metabolism and toxicity. *AAPS J* **8**(1):E101-111.

- Guo S, Rena G, Cichy S, He X, Cohen P and Unterman T (1999) Phosphorylation of serine 256 by protein kinase B disrupts transactivation by FKHR and mediates effects of insulin on insulin-like growth factor-binding protein-1 promoter activity through a conserved insulin response sequence. *J Biol Chem* **274**(24):17184-17192.
- Hara H and Adachi T (2002) Contribution of hepatocyte nuclear factor-4 to down-regulation of CYP2D6 gene expression by nitric oxide. *Mol Pharmacol* **61**(1):194-200.
- Harbrecht BG, Nweze I, Smith JW and Zhang B (2011) Insulin Inhibits Hepatocyte Inos Expression Induced by Cytokines by an Akt-Dependent Mechanism. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.*
- Harbuz MS and Lightman SL (1989) Responses of hypothalamic and pituitary mRNA to physical and psychological stress in the rat. *J Endocrinol* **122**(3):705-711.
- Harmsen S, Meijerman I, Beijnen JH and Schellens JH (2007) The role of nuclear receptors in pharmacokinetic drug-drug interactions in oncology. *Cancer Treat Rev* **33**(4):369-380.
- Harper PA, Riddick DS and Okey AB (2006) Regulating the regulator: factors that control levels and activity of the aryl hydrocarbon receptor. *Biochem Pharmacol* **72**(3):267-279.
- Hasegawa Y, Kishimoto S, Shibatani N, Inotsume N, Takeuchi Y and Fukushima S (2010) Effects of insulin on CYP3A activity and nifedipine disposition in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Pharm Pharmacol* **62**(7):883-889.
- Hay N and Sonenberg N (2004) Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev* **18**(16):1926-1945.
- Hayes JD, Flanagan JU and Jowsey IR (2005) Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **45**:51-88.
- Hayhurst GP, Lee YH, Lambert G, Ward JM and Gonzalez FJ (2001) Hepatocyte nuclear factor 4alpha (nuclear receptor 2A1) is essential for maintenance of hepatic gene expression and lipid homeostasis. *Mol Cell Biol* **21**(4):1393-1403.
- Hellmold H, Lamb JG, Wyss A, Gustafsson JA and Warner M (1995) Developmental and endocrine regulation of P450 isoforms in rat breast. *Mol Pharmacol* **48**(4):630-638.

- Helmreich DL, Parfitt DB, Lu XY, Akil H and Watson SJ (2005) Relation between the hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis and the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis during repeated stress. *Neuroendocrinology* **81**(3):183-192.
- Helmreich DL and Tylee D (2011) Thyroid hormone regulation by stress and behavioral differences in adult male rats. *Horm Behav* **60**(3):284-291.
- Herrington J, Smit LS, Schwartz J and Carter-Su C (2000) The role of STAT proteins in growth hormone signaling. *Oncogene* **19**(21):2585-2597.
- Hirota K, Daitoku H, Matsuzaki H, Araya N, Yamagata K, Asada S, Sugaya T and Fukamizu A (2003) Hepatocyte nuclear factor-4 is a novel downstream target of insulin via FKHR as a signal-regulated transcriptional inhibitor. *J Biol Chem* **278**(15):13056-13060.
- Hodgson E and Rose RL (2008) Metabolic interactions of agrochemicals in humans. *Pest Manag Sci* **64**(6):617-621.
- Hollander MC, Zhou X, Maier CR, Patterson AD, Ding X and Dennis PA (2011) A Cyp2a polymorphism predicts susceptibility to NNK-induced lung tumorigenesis in mice. *Carcinogenesis* **32**(8):1279-1284.
- Hollenberg PF (2002) Characteristics and common properties of inhibitors, inducers, and activators of CYP enzymes. *Drug Metab Rev* **34**(1-2):17-35.
- Holloway MG, Laz EV and Waxman DJ (2006) Codependence of growth hormone-responsive, sexually dimorphic hepatic gene expression on signal transducer and activator of transcription 5b and hepatic nuclear factor 4alpha. *Mol Endocrinol* **20**(3):647-660.
- Holz MK and Blenis J (2005) Identification of S6 kinase 1 as a novel mammalian target of rapamycin (mTOR)-phosphorylating kinase. *J Biol Chem* **280**(28):26089-26093.
- Honig PK, Wortham DC, Zamani K, Conner DP, Mullin JC and Cantilena LR (1993) Terfenadine-ketoconazole interaction. Pharmacokinetic and electrocardiographic consequences. *JAMA* **269**(12):1513-1518.
- Honkakoski P, Zelko I, Sueyoshi T and Negishi M (1998) The nuclear orphan receptor CAR-retinoid X receptor heterodimer activates the phenobarbital-responsive enhancer module of the CYP2B gene. *Mol Cell Biol* **18**(10):5652-5658.
- <http://www.imm.ki.se/CYPalleles/cyp2d6>. and htm (accessed 01-11-2011).

- Hukkanen J, Vaisanen T, Lassila A, Piipari R, Anttila S, Pelkonen O, Raunio H and Hakkola J (2003) Regulation of CYP3A5 by glucocorticoids and cigarette smoke in human lung-derived cells. *J Pharmacol Exp Ther* **304**(2):745-752.
- Hunt CM, Westerkam WR and Stave GM (1992) Effect of age and gender on the activity of human hepatic CYP3A. *Biochem Pharmacol* **44**(2):275-283.
- Hwang-Verslues WW and Sladek FM (2010) HNF4alpha--role in drug metabolism and potential drug target? *Curr Opin Pharmacol* **10**(6):698-705.
- Ibeanu GC, Goldstein JA, Meyer U, Benhamou S, Bouchardy C, Dayer P, Ghanayem BI and Blaisdell J (1998) Identification of new human CYP2C19 alleles (CYP2C19*6 and CYP2C19*2B) in a Caucasian poor metabolizer of mephenytoin. *J Pharmacol Exp Ther* **286**(3):1490-1495.
- Iber H, Sewer MB, Barclay TB, Mitchell SR, Li T and Morgan ET (1999) Modulation of drug metabolism in infectious and inflammatory diseases. *Drug Metab Rev* **31**(1):29-41.
- Ignarro L (2000) *Nitric oxide: biology and pathobiology*. Academic Press.
- Immink WF, Beijer HJ and Charbon GA (1978) alpha- and beta-receptor blockade of isoproterenol- and norepinephrine-induced effects on regional blood flow and blood flow acceleration. *Eur J Pharmacol* **50**(3):159-173.
- Ingelman-Sundberg M (2002) Polymorphism of cytochrome P450 and xenobiotic toxicity. *Toxicology* **181-182**:447-452.
- Ingelman-Sundberg M (2004) Human drug metabolising cytochrome P450 enzymes: properties and polymorphisms. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **369**(1):89-104.
- Ingelman-Sundberg M (2005) Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity. *Pharmacogenomics J* **5**(1):6-13.
- Ingelman-Sundberg M, Sim SC, Gomez A and Rodriguez-Antona C (2007) Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: pharmacogenetic, pharmacoepigenetic and clinical aspects. *Pharmacol Ther* **116**(3):496-526.
- Inoki K and Guan KL (2006) Complexity of the TOR signaling network. *Trends Cell Biol* **16**(4):206-212.
- Ioannides C (2001) *Enzyme systems that metabolize drugs and other xenobiotics*.

- Ioannides C and Parke DV (1990) The cytochrome P450 I gene family of microsomal hemoproteins and their role in the metabolic activation of chemicals. *Drug Metab Rev* **22**(1):1-85.
- Itoh M, Nakajima M, Higashi E, Yoshida R, Nagata K, Yamazoe Y and Yokoi T (2006) Induction of human CYP2A6 is mediated by the pregnane X receptor with peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1alpha. *J Pharmacol Exp Ther* **319**(2):693-702.
- Iyanagi T (2007) Molecular mechanism of phase I and phase II drug-metabolizing enzymes: implications for detoxification. *Int Rev Cytol* **260**:35-112.
- Jansson JO, Eden S and Isaksson O (1985) Sexual dimorphism in the control of growth hormone secretion. *Endocr Rev* **6**(2):128-150.
- Joannard F, Galisteo M, Corcos L, Guillouzo A and Lagadic-Gossmann D (2000) Regulation of phenobarbital-induction of CYP2B and CYP3A genes in rat cultured hepatocytes: involvement of several serine/threonine protein kinases and phosphatases. *Cell Biol Toxicol* **16**(5):325-337.
- Johansson I and Ingelman-Sundberg M (2011) Genetic polymorphism and toxicology--with emphasis on cytochrome p450. *Toxicol Sci* **120**(1):1-13.
- Johansson I, Lundqvist E, Bertilsson L, Dahl ML, Sjoqvist F and Ingelman-Sundberg M (1993) Inherited amplification of an active gene in the cytochrome P450 CYP2D locus as a cause of ultrarapid metabolism of debrisoquine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(24):11825-11829.
- Johnson EO, Kamilaris TC, Chrousos GP and Gold PW (1992) Mechanisms of stress: a dynamic overview of hormonal and behavioral homeostasis. *Neurosci Biobehav Rev* **16**(2):115-130.
- Johnson M (1998) The beta-adrenoceptor. *Am J Respir Crit Care Med* **158**(5 Pt 3):S146-153.
- Joseph DP, Guengerich PF and Miners JO (2005) "Phase I and Phase II" drug metabolism: terminology that we should phase out? *Drug Metab Rev* **37**(4):575-580.
- Jover R, Bort R, Gomez-Lechon MJ and Castell JV (1998) Re-expression of C/EBP alpha induces CYP2B6, CYP2C9 and CYP2D6 genes in HepG2 cells. *FEBS Lett* **431**(2):227-230.

- Jover R, Bort R, Gomez-Lechon MJ and Castell JV (2002) Down-regulation of human CYP3A4 by the inflammatory signal interleukin-6: molecular mechanism and transcription factors involved. *FASEB J* **16**(13):1799-1801.
- Kabbani N, Woll MP, Nordman JC and Levenson R (2011) Dopamine Receptor Interacting Proteins: Targeting Neuronal Calcium Sensor-1/D2 Dopamine Receptor Interaction for Antipsychotic Drug Development. *Curr Drug Targets*.
- Kacevska M, Robertson GR, Clarke SJ and Liddle C (2008) Inflammation and CYP3A4-mediated drug metabolism in advanced cancer: impact and implications for chemotherapeutic drug dosing. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **4**(2):137-149.
- Kalantaridou SN, Zoumakis E, Makrigiannakis A, Lavasidis LG, Vrekoussis T and Chrousos GP (2010) Corticotropin-releasing hormone, stress and human reproduction: an update. *J Reprod Immunol* **85**(1):33-39.
- Kamali F and Pirmohamed M (2006) The future prospects of pharmacogenetics in oral anticoagulation therapy. *Br J Clin Pharmacol* **61**(6):746-751.
- Kamiyama Y, Matsubara T, Yoshinari K, Nagata K, Kamimura H and Yamazoe Y (2007) Role of human hepatocyte nuclear factor 4alpha in the expression of drug-metabolizing enzymes and transporters in human hepatocytes assessed by use of small interfering RNA. *Drug Metab Pharmacokinet* **22**(4):287-298.
- Karin M and Gallagher E (2005) From JNK to pay dirt: jun kinases, their biochemistry, physiology and clinical importance. *IUBMB Life* **57**(4-5):283-295.
- Keshava C, McCanlies EC and Weston A (2004) CYP3A4 polymorphisms--potential risk factors for breast and prostate cancer: a HuGE review. *Am J Epidemiol* **160**(9):825-841.
- Khan AA, Chow EC, van Loenen-Weemaes AM, Porte RJ, Pang KS and Groothuis GM (2009) Comparison of effects of VDR versus PXR, FXR and GR ligands on the regulation of CYP3A isozymes in rat and human intestine and liver. *Eur J Pharm Sci* **37**(2):115-125.
- Khatsenko O and Kikkawa Y (1997) Nitric oxide differentially affects constitutive cytochrome P450 isoforms in rat liver. *J Pharmacol Exp Ther* **280**(3):1463-1470.
- Khatsenko OG, Gross SS, Rifkind AB and Vane JR (1993) Nitric oxide is a mediator of the decrease in cytochrome P450-dependent metabolism caused by immunostimulants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(23):11147-11151.

- Kiani J and Imam SZ (2007) Medicinal importance of grapefruit juice and its interaction with various drugs. *Nutr J* **6**:33.
- Kim SK and Novak RF (2007) The role of intracellular signaling in insulin-mediated regulation of drug metabolizing enzyme gene and protein expression. *Pharmacol Ther* **113**(1):88-120.
- Kitada M, Kamataki T, Itahashi K, Rikihisa T, Kato R and Kanakubo Y (1985) Purification and properties of cytochrome P-450 from homogenates of human fetal livers. *Arch Biochem Biophys* **241**(1):275-280.
- Klaunig JE, Goldblatt PJ, Hinton DE, Lipsky MM, Chacko J and Trump BF (1981) Mouse liver cell culture. I. Hepatocyte isolation. *In Vitro* **17**(10):913-925.
- Klose TS, Blaisdell JA and Goldstein JA (1999) Gene structure of CYP2C8 and extrahepatic distribution of the human CYP2Cs. *J Biochem Mol Toxicol* **13**(6):289-295.
- Kocarek TA, Schuetz EG, Strom SC, Fisher RA and Guzelian PS (1995) Comparative analysis of cytochrome P4503A induction in primary cultures of rat, rabbit, and human hepatocytes. *Drug Metab Dispos* **23**(3):415-421.
- Koch I, Weil R, Wolbold R, Brockmoller J, Hustert E, Burk O, Nuessler A, Neuhaus P, Eichelbaum M, Zanger U and Wojnowski L (2002) Interindividual variability and tissue-specificity in the expression of cytochrome P450 3A mRNA. *Drug Metab Dispos* **30**(10):1108-1114.
- Kodama S, Koike C, Negishi M and Yamamoto Y (2004) Nuclear receptors CAR and PXR cross talk with FOXO1 to regulate genes that encode drug-metabolizing and gluconeogenic enzymes. *Mol Cell Biol* **24**(18):7931-7940.
- Kong AN, Owuor E, Yu R, Hebbar V, Chen C, Hu R and Mandlekar S (2001) Induction of xenobiotic enzymes by the MAP kinase pathway and the antioxidant or electrophile response element (ARE/EpRE). *Drug Metab Rev* **33**(3-4):255-271.
- Konstandi M, Harkitis P, Kostakis D, Marselos M, Johnson EO and Lang MA (2008a) D2-receptor-linked signaling pathways regulate the expression of hepatic CYP2E1. *Life Sci* **82**(1-2):1-10.
- Konstandi M, Johnson E, Lang MA, Camus-Radon AM and Marselos M (2000) Stress modulates the enzymatic inducibility by benzo[alpha]pyrene in the rat liver. *Pharmacol Res* **42**(3):205-211.

- Konstandi M, Johnson EO, Marselos M, Kostakis D, Fotopoulos A and Lang MA (2004) Stress-mediated modulation of B(alpha)P-induced hepatic CYP1A1: role of catecholamines. *Chem Biol Interact* **147**(1):65-77.
- Konstandi M, Kostakis D, Harkitis P, Johnson EO, Marselos M, Adamidis K and Lang MA (2006) Benzo(alpha)pyrene-induced up-regulation of CYP1A2 gene expression: role of adrenoceptor-linked signaling pathways. *Life Sci* **79**(4):331-341.
- Konstandi M, Kostakis D, Harkitis P, Marselos M, Johnson EO, Adamidis K and Lang MA (2005) Role of adrenoceptor-linked signaling pathways in the regulation of CYP1A1 gene expression. *Biochem Pharmacol* **69**(2):277-287.
- Konstandi M, Kostakis D, Johnson E, Lang MA and Marselos M (1998a) Evidence of alpha2-adrenoceptor involvement in B[alpha]P induction processes of drug-metabolizing enzymes: the effect of stress. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* **23**(4):491-495.
- Konstandi M and Lang MA (1996) Effect of cocaine on hepatic drug metabolism. *Eur J Intern Med*(7):221-226.
- Konstandi M, Lang MA, Kostakis D, Johnson EO and Marselos M (2008b) Predominant role of peripheral catecholamines in the stress-induced modulation of CYP1A2 inducibility by benzo(alpha)pyrene. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* **102**(1):35-44.
- Konstandi M, Marselos M, Radon-Camus AM, Johnson E and Lang MA (1998b) The role of stress in the regulation of drug metabolizing enzymes in mice. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* **23**(4):483-490.
- Korosi A and Baram TZ (2010) Plasticity of the stress response early in life: mechanisms and significance. *Dev Psychobiol* **52**(7):661-670.
- Kot M and Daniel WA (2011) Cytochrome P450 is regulated by noradrenergic and serotonergic systems. *Pharmacol Res* **64**(4):371-380.
- Krecic-Shepard ME, Park K, Barnas C, Slimko J, Kerwin DR and Schwartz JB (2000) Race and sex influence clearance of nifedipine: results of a population study. *Clin Pharmacol Ther* **68**(2):130-142.
- Kronbach T, Mathys D, Gut J, Catin T and Meyer UA (1987) High-performance liquid chromatographic assays for bufuralol 1'-hydroxylase, debrisoquine 4-hydroxylase, and dextromethorphan O-demethylase in microsomes and purified cytochrome P-450 isozymes of human liver. *Anal Biochem* **162**(1):24-32.

- Kubota T, Hibi N and Chiba K (1998) Linkage of mutant alleles of CYP2C18 and CYP2C19 in a Japanese population. *Biochem Pharmacol* **55**(12):2039-2042.
- Kuehl P, Zhang J, Lin Y, Lamba J, Assem M, Schuetz J, Watkins PB, Daly A, Wrighton SA, Hall SD, Maurel P, Relling M, Brimer C, Yasuda K, Venkataramanan R, Strom S, Thummel K, Boguski MS and Schuetz E (2001) Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nat Genet* **27**(4):383-391.
- Kvetnansky R, Sabban EL and Palkovits M (2009) Catecholaminergic systems in stress: structural and molecular genetic approaches. *Physiol Rev* **89**(2):535-606.
- Kyrou I and Tsigos C (2009) Stress hormones: physiological stress and regulation of metabolism. *Curr Opin Pharmacol* **9**(6):787-793.
- Lacey RJ, Cable HC, James RF, London NJ, Scarpello JH and Morgan NG (1993) Concentration-dependent effects of adrenaline on the profile of insulin secretion from isolated human islets of Langerhans. *J Endocrinol* **138**(3):555-563.
- Lai MC and Huang LT (2011) Effects of early life stress on neuroendocrine and neurobehavior: mechanisms and implications. *Pediatr Neonatol* **52**(3):122-129.
- Lang MA, Gielen JE and Nebert DW (1981) Genetic evidence for many unique liver microsomal P-450-mediated monooxygenase activities in heterogenic stock mice. *J Biol Chem* **256**(23):12068-12075.
- Le Couteur DG and McLean AJ (1998) The aging liver. Drug clearance and an oxygen diffusion barrier hypothesis. *Clin Pharmacokinet* **34**(5):359-373.
- LeCluyse EL (2001) Pregnane X receptor: molecular basis for species differences in CYP3A induction by xenobiotics. *Chem Biol Interact* **134**(3):283-289.
- Lee SS, Cha EY, Jung HJ, Shon JH, Kim EY, Yeo CW and Shin JG (2008) Genetic polymorphism of hepatocyte nuclear factor-4alpha influences human cytochrome P450 2D6 activity. *Hepatology* **48**(2):635-645.
- Li D, Yamada T, Wang F, Vulin AI and Samuels HH (2004) Novel roles of retinoid X receptor (RXR) and RXR ligand in dynamically modulating the activity of the thyroid hormone receptor/RXR heterodimer. *J Biol Chem* **279**(9):7427-7437.
- Li XF, Ma M, Cheng A, Zheng J and Tam YK (2002) Determination of testosterone and its metabolites using liquid chromatography with elevated column temperature and flow-rate gradient *Analytica Chimica Acta* **457**(7):165-171.

- Liddle C, Goodwin BJ, George J, Tapner M and Farrell GC (1998) Separate and interactive regulation of cytochrome P450 3A4 by triiodothyronine, dexamethasone, and growth hormone in cultured hepatocytes. *J Clin Endocrinol Metab* **83**(7):2411-2416.
- Lin JH and Lu AY (2001) Interindividual variability in inhibition and induction of cytochrome P450 enzymes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **41**:535-567.
- Liu YT, Hao HP, Liu CX, Wang GJ and Xie HG (2007) Drugs as CYP3A probes, inducers, and inhibitors. *Drug Metab Rev* **39**(4):699-721.
- Lofgren S, Baldwin RM, Hiratsuka M, Lindqvist A, Carlberg A, Sim SC, Schulke M, Snait M, Edenro A, Fransson-Steen R, Terelius Y and Ingelman-Sundberg M (2008) Generation of mice transgenic for human CYP2C18 and CYP2C19: characterization of the sexually dimorphic gene and enzyme expression. *Drug Metab Dispos* **36**(5):955-962.
- Lorenz R, Sharp R and Burr IM (1979) Effects of calcium, lanthanum, and bicarbonate ion on epinephrine modification of insulin release in vitro. *Diabetes* **28**(1):52-55.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**(1):265-275.
- Lu CY, Li CC, Liu KL, Lii CK and Chen HW (2009) Docosahexaenoic acid downregulates phenobarbital-induced cytochrome P450 2B1 gene expression in rat primary hepatocytes via the c-Jun NH2-terminal kinase mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol Nutr Food Res* **53**(3):341-348.
- Mankowski DC (1999) The role of CYP2C19 in the metabolism of (+/-) bufuralol, the prototypic substrate of CYP2D6. *Drug Metab Dispos* **27**(9):1024-1028.
- Μαρσέλος Μ και Μάλαμας Μ (2004) Ιατρική Φαρμακολογία Ι, Εκδόσεις Τυπωθήτω, Ιωάννινα 2004.
- Μαρσέλος Μ και Μάλαμας Μ (2006) Ιατρική Φαρμακολογία ΙΙ, Εκδόσεις Τυπωθήτω, Ιωάννινα 2006.
- Martignoni M, Groothuis GM and de Kanter R (2006) Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **2**(6):875-894.
- Matsuzaki H, Daitoku H, Hatta M, Tanaka K and Fukamizu A (2003) Insulin-induced phosphorylation of FKHR (Foxo1) targets to proteasomal degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(20):11285-11290.

- McLean AJ and Le Couteur DG (2004) Aging biology and geriatric clinical pharmacology. *Pharmacol Rev* **56**(2):163-184.
- Mealy K, Ngeh N, Gillen P, Fitzpatrick G, Keane FB and Tanner A (1996) Propranolol reduces the anxiety associated with day case surgery. *Eur J Surg* **162**(1):11-14.
- Meredith C, Scott MP, Renwick AB, Price RJ and Lake BG (2003) Studies on the induction of rat hepatic CYP1A, CYP2B, CYP3A and CYP4A subfamily form mRNAs in vivo and in vitro using precision-cut rat liver slices. *Xenobiotica* **33**(5):511-527.
- Mikhailova ON, Gulyaeva LF and Filipenko ML (2005) Gene expression of drug metabolizing enzymes in adult and aged mouse liver: a modulation by immobilization stress. *Toxicology* **210**(2-3):189-196.
- Miles JS, McLaren AW, Forrester LM, Glancey MJ, Lang MA and Wolf CR (1990) Identification of the human liver cytochrome P-450 responsible for coumarin 7-hydroxylase activity. *Biochem J* **267**(2):365-371.
- Miners JO and Birkett DJ (1998) Cytochrome P4502C9: an enzyme of major importance in human drug metabolism. *Br J Clin Pharmacol* **45**(6):525-538.
- Mittal VA, Dhruv S, Tessner KD, Walder DJ and Walker EF (2007) The relations among putative biorisk markers in schizotypal adolescents: minor physical anomalies, movement abnormalities, and salivary cortisol. *Biol Psychiatry* **61**(10):1179-1186.
- Mode A, Wiersma-Larsson E, Strom A, Zaphiropoulos PG and Gustafsson JA (1989) A dual role of growth hormone as a feminizing and masculinizing factor in the control of sex-specific cytochrome P-450 isozymes in rat liver. *J Endocrinol* **120**(2):311-317.
- Mondelli V, Dazzan P, Gabilondo A, Tournikioti K, Walshe M, Marshall N, Schulze KK, Murray RM, McDonald C and Pariante CM (2008) Pituitary volume in unaffected relatives of patients with schizophrenia and bipolar disorder. *Psychoneuroendocrinology* **33**(7):1004-1012.
- Moreno-Smith M, Lutgendorf SK and Sood AK (2010) Impact of stress on cancer metastasis. *Future Oncol* **6**(12):1863-1881.
- Morgan ET (1997) Regulation of cytochromes P450 during inflammation and infection. *Drug Metab Rev* **29**(4):1129-1188.
- Morgan ET (2001) Regulation of cytochrome p450 by inflammatory mediators: why and how? *Drug Metab Dispos* **29**(3):207-212.

- Morgan ET (2009) Impact of infectious and inflammatory disease on cytochrome P450-mediated drug metabolism and pharmacokinetics. *Clin Pharmacol Ther* **85**(4):434-438.
- Mortensen PB (1989) The incidence of cancer in schizophrenic patients. *J Epidemiol Community Health* **43**(1):43-47.
- Mugford CA and Kedderis GL (1998) Sex-dependent metabolism of xenobiotics. *Drug Metab Rev* **30**(3):441-498.
- Murray AJ (2008) Pharmacological PKA inhibition: all may not be what it seems. *Sci Signal* **1**(22):re4.
- Nader N, Chrousos GP and Kino T (2010) Interactions of the circadian CLOCK system and the HPA axis. *Trends Endocrinol Metab* **21**(5):277-286.
- Nadin L, Butler AM, Farrell GC and Murray M (1995) Pretranslational down-regulation of cytochromes P450 2C11 and 3A2 in male rat liver by tumor necrosis factor alpha. *Gastroenterology* **109**(1):198-205.
- Nagata K and Yamazoe Y (2002) Genetic polymorphism of human cytochrome p450 involved in drug metabolism. *Drug Metab Pharmacokinet* **17**(3):167-189.
- Nakae J, Park BC and Accili D (1999) Insulin stimulates phosphorylation of the forkhead transcription factor FKHR on serine 253 through a Wortmannin-sensitive pathway. *J Biol Chem* **274**(23):15982-15985.
- Nakajima M, Yamamoto T, Nunoya K, Yokoi T, Nagashima K, Inoue K, Funae Y, Shimada N, Kamataki T and Kuroiwa Y (1996) Characterization of CYP2A6 involved in 3'-hydroxylation of cotinine in human liver microsomes. *J Pharmacol Exp Ther* **277**(2):1010-1015.
- Nakaki T, Nakadate T, Yamamoto S and Kato R (1983) Inhibition of dibutyryl cyclic AMP-induced insulin release by alpha-2 adrenergic stimulation. *Life Sci* **32**(3):191-195.
- Neafsey P, Ginsberg G, Hattis D and Sonawane B (2009) Genetic polymorphism in cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): Population distribution of CYP2D6 activity. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* **12**(5-6):334-361.
- Nebert DW and Russell DW (2002) Clinical importance of the cytochromes P450. *Lancet* **360**(9340):1155-1162.
- Nedelcheva V and Gut I (1994) P450 in the rat and man: methods of investigation, substrate specificities and relevance to cancer. *Xenobiotica* **24**(12):1151-1175.

- Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, Stegeman JJ, Feyereisen R, Waxman DJ, Waterman MR, Gotoh O, Coon MJ, Estabrook RW, Gunsalus IC and Nebert DW (1996) P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* **6**(1):1-42.
- Nelson DR, Zeldin DC, Hoffman SM, Maltais LJ, Wain HM and Nebert DW (2004) Comparison of cytochrome P450 (CYP) genes from the mouse and human genomes, including nomenclature recommendations for genes, pseudogenes and alternative-splice variants. *Pharmacogenetics* **14**(1):1-18.
- Nicolaides NC, Galata Z, Kino T, Chrousos GP and Charmandari E (2010) The human glucocorticoid receptor: molecular basis of biologic function. *Steroids* **75**(1):1-12.
- Niddam R, Angel I, Bidet S and Langer SZ (1990) Pharmacological characterization of alpha-2 adrenergic receptor subtype involved in the release of insulin from isolated rat pancreatic islets. *J Pharmacol Exp Ther* **254**(3):883-887.
- Nishina H, Wada T and Katada T (2004) Physiological roles of SAPK/JNK signaling pathway. *J Biochem* **136**(2):123-126.
- Niznik HB, Tyndale RF, Sallee FR, Gonzalez FJ, Hardwick JP, Inaba T and Kalow W (1990) The dopamine transporter and cytochrome P450IID1 (debrisoquine 4-hydroxylase) in brain: resolution and identification of two distinct [3H]GBR-12935 binding proteins. *Arch Biochem Biophys* **276**(2):424-432.
- O'Brien RM and Granner DK (1991) Regulation of gene expression by insulin. *Biochem J* **278** (Pt 3):609-619.
- Oesch-Bartlomowicz B and Oesch F (2003) Cytochrome-P450 phosphorylation as a functional switch. *Arch Biochem Biophys* **409**(1):228-234.
- Oesch-Bartlomowicz B and Oesch F (2005) Phosphorylation of cytochromes P450: first discovery of a posttranslational modification of a drug-metabolizing enzyme. *Biochem Biophys Res Commun* **338**(1):446-449.
- Ooe H, Kon J, Oshima H and Mitaka T (2009) Thyroid hormone is necessary for expression of constitutive androstane receptor in rat hepatocytes. *Drug Metab Dispos* **37**(9):1963-1969.
- Oscarson M (2001) Genetic polymorphisms in the cytochrome P450 2A6 (CYP2A6) gene: implications for interindividual differences in nicotine metabolism. *Drug Metab Dispos* **29**(2):91-95.

- Oscarson M, McLellan RA, Gullsten H, Yue QY, Lang MA, Bernal ML, Sinues B, Hirvonen A, Raunio H, Pelkonen O and Ingelman-Sundberg M (1999) Characterisation and PCR-based detection of a CYP2A6 gene deletion found at a high frequency in a Chinese population. *FEBS Lett* **448**(1):105-110.
- Pampori NA and Shapiro BH (1999) Gender differences in the responsiveness of the sex-dependent isoforms of hepatic P450 to the feminine plasma growth hormone profile. *Endocrinology* **140**(3):1245-1254.
- Παππάς Π (1996) Βιολογικός ρόλος και ρυθμιστικοί παράγοντες της επαγωγής της αλδεϋδικής αφυδρογονάσης-3. Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιατρική σχολή, Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Ιωάννινα.
- Pariante CM and Miller AH (2001) Glucocorticoid receptors in major depression: relevance to pathophysiology and treatment. *Biol Psychiatry* **49**(5):391-404.
- Park SH, Liu X, Hennighausen L, Davey HW and Waxman DJ (1999) Distinctive roles of STAT5a and STAT5b in sexual dimorphism of hepatic P450 gene expression. Impact of STAT5a gene disruption. *J Biol Chem* **274**(11):7421-7430.
- Park SH, Wiwi CA and Waxman DJ (2006) Signalling cross-talk between hepatocyte nuclear factor 4alpha and growth-hormone-activated STAT5b. *Biochem J* **397**(1):159-168.
- Parkinson A, Mudra DR, Johnson C, Dwyer A and Carroll KM (2004) The effects of gender, age, ethnicity, and liver cirrhosis on cytochrome P450 enzyme activity in human liver microsomes and inducibility in cultured human hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* **199**(3):193-209.
- Parl FF (2005) Glutathione S-transferase genotypes and cancer risk. *Cancer Lett* **221**(2):123-129.
- Pascussi JM, Drocourt L, Fabre JM, Maurel P and Vilarem MJ (2000a) Dexamethasone induces pregnane X receptor and retinoid X receptor-alpha expression in human hepatocytes: synergistic increase of CYP3A4 induction by pregnane X receptor activators. *Mol Pharmacol* **58**(2):361-372.
- Pascussi JM, Drocourt L, Gerbal-Chaloin S, Fabre JM, Maurel P and Vilarem MJ (2001) Dual effect of dexamethasone on CYP3A4 gene expression in human hepatocytes. Sequential role of glucocorticoid receptor and pregnane X receptor. *Eur J Biochem* **268**(24):6346-6358.

- Pascussi JM, Gerbal-Chaloin S, Drocourt L, Assenat E, Larrey D, Pichard-Garcia L, Vilarem MJ and Maurel P (2004) Cross-talk between xenobiotic detoxication and other signalling pathways: clinical and toxicological consequences. *Xenobiotica* **34**(7):633-664.
- Pascussi JM, Gerbal-Chaloin S, Drocourt L, Maurel P and Vilarem MJ (2003) The expression of CYP2B6, CYP2C9 and CYP3A4 genes: a tangle of networks of nuclear and steroid receptors. *Biochim Biophys Acta* **1619**(3):243-253.
- Pascussi JM, Gerbal-Chaloin S, Duret C, Daujat-Chavanieu M, Vilarem MJ and Maurel P (2008) The tangle of nuclear receptors that controls xenobiotic metabolism and transport: crosstalk and consequences. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **48**:1-32.
- Pascussi JM, Gerbal-Chaloin S, Fabre JM, Maurel P and Vilarem MJ (2000b) Dexamethasone enhances constitutive androstane receptor expression in human hepatocytes: consequences on cytochrome P450 gene regulation. *Mol Pharmacol* **58**(6):1441-1450.
- Pavek P, Cerveny L, Svecova L, Brysch M, Libra A, Vrzal R, Nachtigal P, Staud F, Ulrichova J, Fendrich Z and Dvorak Z (2007) Examination of Glucocorticoid receptor alpha-mediated transcriptional regulation of P-glycoprotein, CYP3A4, and CYP2C9 genes in placental trophoblast cell lines. *Placenta* **28**(10):1004-1011.
- Pelkonen O and Raunio H (1997) Metabolic activation of toxins: tissue-specific expression and metabolism in target organs. *Environ Health Perspect* **105 Suppl 4**:767-774.
- Pelkonen O, Rautio A, Raunio H and Pasanen M (2000) CYP2A6: a human coumarin 7-hydroxylase. *Toxicology* **144**(1-3):139-147.
- Pelkonen O, Turpeinen M, Hakkola J, Honkakoski P, Hukkanen J and Raunio H (2008) Inhibition and induction of human cytochrome P450 enzymes: current status. *Arch Toxicol* **82**(10):667-715.
- Peng HM and Coon MJ (1998) Regulation of rabbit cytochrome P450 2E1 expression in HepG2 cells by insulin and thyroid hormone. *Mol Pharmacol* **54**(4):740-747.
- Pohjola-Sintonen S, Viitasalo M, Toivonene L and Neuvonen P (1993) Torsades de pointes after terfenadine-itraconazole interaction. *BMJ* **306**(6871):186.

- Polissidis A, Chouliara O, Galanopoulos A, Marselos M, Papadopoulou-Daifoti Z and Antoniou K (2009) Behavioural and dopaminergic alterations induced by a low dose of WIN 55,212-2 in a conditioned place preference procedure. *Life Sci* **85**(5-6):248-254.
- Pondugula SR, Brimer-Cline C, Wu J, Schuetz EG, Tyagi RK and Chen T (2009) A phosphomimetic mutation at threonine-57 abolishes transactivation activity and alters nuclear localization pattern of human pregnane x receptor. *Drug Metab Dispos* **37**(4):719-730.
- Porte D, Jr. (1967) A receptor mechanism for the inhibition of insulin release by epinephrine in man. *J Clin Invest* **46**(1):86-94.
- Ram PA and Waxman DJ (1990) Pretranslational control by thyroid hormone of rat liver steroid 5 alpha-reductase and comparison to the thyroid dependence of two growth hormone-regulated CYP2C mRNAs. *J Biol Chem* **265**(31):19223-19229.
- Ram PA and Waxman DJ (1991) Hepatic P450 expression in hypothyroid rats: differential responsiveness of male-specific P450 forms 2a (IIIA2), 2c (IIC11), and RLM2 (IIA2) to thyroid hormone. *Mol Endocrinol* **5**(1):13-20.
- Rang HP, Dale MM, Ritter JM and Moore PK (2003) *Pharmacology(5th Edition)*. Churchill Livingstone.
- Rassidakis NC, Kelepouris M, Goulis K and Karaiossefidis K (1973) On the incidence of malignancy among schizophrenic patients. *Agressologie* **14**(4):269-273.
- Ravaris CL, Friedman MJ, Hauri PJ and McHugo GJ (1991) A controlled study of alprazolam and propranolol in panic-disordered and agoraphobic outpatients. *J Clin Psychopharmacol* **11**(6):344-350.
- Reiche EM, Nunes SO and Morimoto HK (2004) Stress, depression, the immune system, and cancer. *Lancet Oncol* **5**(10):617-625.
- Rena G, Guo S, Cichy SC, Unterman TG and Cohen P (1999) Phosphorylation of the transcription factor forkhead family member FKHR by protein kinase B. *J Biol Chem* **274**(24):17179-17183.
- Rendic S and Guengerich FP (2010) Update information on drug metabolism systems--2009, part II: summary of information on the effects of diseases and environmental factors on human cytochrome P450 (CYP) enzymes and transporters. *Curr Drug Metab* **11**(1):4-84.

- Renstrom E, Ding WG, Bokvist K and Rorsman P (1996) Neurotransmitter-induced inhibition of exocytosis in insulin-secreting beta cells by activation of calcineurin. *Neuron* **17**(3):513-522.
- Rentesi G, Antoniou K, Marselos M, Fotopoulos A, Alboycharali J and Konstandi M (2010) Long-term consequences of early maternal deprivation in serotonergic activity and HPA function in adult rat. *Neurosci Lett* **480**(1):7-11.
- Rettie AE, Wienkers LC, Gonzalez FJ, Trager WF and Korzekwa KR (1994) Impaired (S)-warfarin metabolism catalysed by the R144C allelic variant of CYP2C9. *Pharmacogenetics* **4**(1):39-42.
- Rice D (1979) No lung cancer in schizophrenics? *Br J Psychiatry* **134**:128.
- Rodgers BD, Lau AO and Nicoll CS (1994) Hypophysectomy or adrenalectomy of rats with insulin-dependent diabetes mellitus partially restores their responsiveness to growth hormone. *Proc Soc Exp Biol Med* **207**(2):220-226.
- Rooseboom M, Commandeur JN and Vermeulen NP (2004) Enzyme-catalyzed activation of anticancer prodrugs. *Pharmacol Rev* **56**(1):53-102.
- Rose AJ, Vegiopoulos A and Herzig S (2010) Role of glucocorticoids and the glucocorticoid receptor in metabolism: insights from genetic manipulations. *J Steroid Biochem Mol Biol* **122**(1-3):10-20.
- Rubi B, Ljubcic S, Pournourmohammadi S, Carobbio S, Armanet M, Bartley C and Maechler P (2005) Dopamine D2-like receptors are expressed in pancreatic beta cells and mediate inhibition of insulin secretion. *J Biol Chem* **280**(44):36824-36832.
- Sarlis NJ and Gourgiotis L (2005) Hormonal effects on drug metabolism through the CYP system: perspectives on their potential significance in the era of pharmacogenomics. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* **5**(4):439-448.
- Scheinin H, Aantaa R, Anttila M, Hakola P, Helminen A and Karhuvaara S (1998) Reversal of the sedative and sympatholytic effects of dexmedetomidine with a specific alpha2-adrenoceptor antagonist atipamezole: a pharmacodynamic and kinetic study in healthy volunteers. *Anesthesiology* **89**(3):574-584.
- Schmidt MV, Wang XD and Meijer OC (2011) Early life stress paradigms in rodents: potential animal models of depression? *Psychopharmacology (Berl)* **214**(1):131-140.

- Schuetz EG and Guzelian PS (1984) Induction of cytochrome P-450 by glucocorticoids in rat liver. II. Evidence that glucocorticoids regulate induction of cytochrome P-450 by a nonclassical receptor mechanism. *J Biol Chem* **259**(3):2007-2012.
- Seeley RR, Stephens TD and Tate P (2000) *Anatomy & Physiology 5th Edition, Chapter 12 (Functional Organization of Nervous System)*. McGraw Hill.
- Segall M (1997)
<http://www.tcm.phy.cam.ac.uk/~mds21/thesis/node48.html#SECTION00102100000000000000> - accessed 06-10-2011.
- Shankar E, Santhosh KT and Paulose CS (2006) Dopaminergic regulation of glucose-induced insulin secretion through dopamine D2 receptors in the pancreatic islets in vitro. *IUBMB Life* **58**(3):157-163.
- Sheweita SA (2000) Drug-metabolizing enzymes: mechanisms and functions. *Curr Drug Metab* **1**(2):107-132.
- Shimada M, Murayama N, Nagata K, Hashimoto H, Ishikawa H and Yamazoe Y (1997) A specific loss of growth hormone abolished sex-dependent expression of hepatic cytochrome P450 in dwarf rats: reversal of the profiles by growth hormone-treatment. *Arch Biochem Biophys* **337**(1):34-42.
- Shimada T and Guengerich FP (1989) Evidence for cytochrome P-450NF, the nifedipine oxidase, being the principal enzyme involved in the bioactivation of aflatoxins in human liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(2):462-465.
- Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, Inui Y and Guengerich FP (1994) Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J Pharmacol Exp Ther* **270**(1):414-423.
- Sidhu JS and Omiecinski CJ (1999) Insulin-mediated modulation of cytochrome P450 gene induction profiles in primary rat hepatocyte cultures. *J Biochem Mol Toxicol* **13**(1):1-9.
- Sigala S, Rizzonelli P, Zanelli E, Forgione A, Missale C and Spano P (1991) Low doses of l-sulpiride down-regulate striatal and cortical dopamine receptors and beta-adrenoceptors. *Eur J Pharmacol* **199**(2):247-253.
- Snawder JE and Lipscomb JC (2000) Interindividual variance of cytochrome P450 forms in human hepatic microsomes: correlation of individual forms with xenobiotic metabolism and implications in risk assessment. *Regul Toxicol Pharmacol* **32**(2):200-209.

- Solus JF, Arietta BJ, Harris JR, Sexton DP, Steward JQ, McMunn C, Ihrie P, Mehall JM, Edwards TL and Dawson EP (2004) Genetic variation in eleven phase I drug metabolism genes in an ethnically diverse population. *Pharmacogenomics* **5**(7):895-931.
- Soucek P and Gut I (1992) Cytochromes P-450 in rats: structures, functions, properties and relevant human forms. *Xenobiotica* **22**(1):83-103.
- Soyama A, Saito Y, Hanioka N, Murayama N, Nakajima O, Katori N, Ishida S, Sai K, Ozawa S and Sawada JI (2001) Non-synonymous single nucleotide alterations found in the CYP2C8 gene result in reduced in vitro paclitaxel metabolism. *Biol Pharm Bull* **24**(12):1427-1430.
- Spatzenegger M and Jaeger W (1995) Clinical importance of hepatic cytochrome P450 in drug metabolism. *Drug Metab Rev* **27**(3):397-417.
- Steward DJ, Haining RL, Henne KR, Davis G, Rushmore TH, Trager WF and Rettie AE (1997) Genetic association between sensitivity to warfarin and expression of CYP2C9*3. *Pharmacogenetics* **7**(5):361-367.
- Stoffel M and Duncan SA (1997) The maturity-onset diabetes of the young (MODY1) transcription factor HNF4alpha regulates expression of genes required for glucose transport and metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(24):13209-13214.
- Stratakis CA and Chrousos GP (1995) Neuroendocrinology and pathophysiology of the stress system. *Ann N Y Acad Sci* **771**:1-18.
- Stratakis CA, Gold PW and Chrousos GP (1995) Neuroendocrinology of stress: implications for growth and development. *Horm Res* **43**(4):162-167.
- Sullivan-Klose TH, Ghanayem BI, Bell DA, Zhang ZY, Kaminsky LS, Shenfield GM, Miners JO, Birkett DJ and Goldstein JA (1996) The role of the CYP2C9-Leu359 allelic variant in the tolbutamide polymorphism. *Pharmacogenetics* **6**(4):341-349.
- Swaab DF, Bao AM and Lucassen PJ (2005) The stress system in the human brain in depression and neurodegeneration. *Ageing Res Rev* **4**(2):141-194.
- Szanto A, Narkar V, Shen Q, Uray IP, Davies PJ and Nagy L (2004) Retinoid X receptors: X-ploring their (patho)physiological functions. *Cell Death Differ* **11 Suppl 2**:S126-143.

- Takahashi J, Furuhashi Y, Ikeda A, Takahashi M, Iwata H, Kazusaka A and Fujita S (1999) Characterization of hepatic cytochrome P450 isozyme composition in the transgenic rat expressing low level human growth hormone. *Xenobiotica* **29**(12):1203-1212.
- Takahashi N, Inui N, Morita H, Takeuchi K, Uchida S, Watanabe H and Nakamura H (2010) Effect of thyroid hormone on the activity of CYP3A enzyme in humans. *J Clin Pharmacol* **50**(1):88-93.
- Taliaz D, Loya A, Gersner R, Haramati S, Chen A and Zangen A (2011) Resilience to chronic stress is mediated by hippocampal brain-derived neurotrophic factor. *J Neurosci* **31**(12):4475-4483.
- Tapner M, Liddle C, Goodwin B, George J and Farrell GC (1996) Interferon gamma down-regulates cytochrome P450 3A genes in primary cultures of well-differentiated rat hepatocytes. *Hepatology* **24**(2):367-373.
- Teglund S, McKay C, Schuetz E, van Deursen JM, Stravopodis D, Wang D, Brown M, Bodner S, Grosveld G and Ihle JN (1998) Stat5a and Stat5b proteins have essential and nonessential, or redundant, roles in cytokine responses. *Cell* **93**(5):841-850.
- Testa B and Kramer SD (2006) The biochemistry of drug metabolism--an introduction: part 1. Principles and overview. *Chem Biodivers* **3**(10):1053-1101.
- Testa B and Kramer SD (2007) The biochemistry of drug metabolism--an introduction: Part 2. Redox reactions and their enzymes. *Chem Biodivers* **4**(3):257-405.
- Tien ES, Matsui K, Moore R and Negishi M (2007) The nuclear receptor constitutively active/androstane receptor regulates type 1 deiodinase and thyroid hormone activity in the regenerating mouse liver. *J Pharmacol Exp Ther* **320**(1):307-313.
- Timsit YE and Negishi M (2007) CAR and PXR: the xenobiotic-sensing receptors. *Steroids* **72**(3):231-246.
- Tinel M, Elkahwaji J, Robin MA, Fardel N, Descatoire V, Haouzi D, Berson A and Pessayre D (1999) Interleukin-2 overexpresses c-myc and down-regulates cytochrome P-450 in rat hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther* **289**(2):649-655.
- Tirona RG, Lee W, Leake BF, Lan LB, Cline CB, Lamba V, Parviz F, Duncan SA, Inoue Y, Gonzalez FJ, Schuetz EG and Kim RB (2003) The orphan nuclear receptor HNF4alpha determines PXR- and CAR-mediated xenobiotic induction of CYP3A4. *Nat Med* **9**(2):220-224.

- Tolson AH and Wang H (2010) Regulation of drug-metabolizing enzymes by xenobiotic receptors: PXR and CAR. *Adv Drug Deliv Rev* **62**(13):1238-1249.
- Total RA and Rettie AE (2005) Cytochrome P450 2C8: substrates, inhibitors, pharmacogenetics, and clinical relevance. *Clin Pharmacol Ther* **77**(5):341-352.
- Trinder P (1969) Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen. *J Clin Pathol* **22**(2):158-161.
- Tsigos C and Chrousos GP (2002) Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J Psychosom Res* **53**(4):865-871.
- Tuomisto J and Mannisto P (1985) Neurotransmitter regulation of anterior pituitary hormones. *Pharmacol Rev* **37**(3):249-332.
- Turnbull AV and Rivier C (1995) Regulation of the HPA axis by cytokines. *Brain Behav Immun* **9**(4):253-275.
- Tzivion G, Dobson M and Ramakrishnan G (2011) FoxO transcription factors; Regulation by AKT and 14-3-3 proteins. *Biochim Biophys Acta* **1813**(11):1938-1945.
- Udy GB, Towers RP, Snell RG, Wilkins RJ, Park SH, Ram PA, Waxman DJ and Davey HW (1997) Requirement of STAT5b for sexual dimorphism of body growth rates and liver gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(14):7239-7244.
- Um SH, Frigerio F, Watanabe M, Picard F, Joaquin M, Sticker M, Fumagalli S, Allegrini PR, Kozma SC, Auwerx J and Thomas G (2004) Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity. *Nature* **431**(7005):200-205.
- Van de Kar LD and Blair ML (1999) Forebrain pathways mediating stress-induced hormone secretion. *Front Neuroendocrinol* **20**(1):1-48.
- Vasiliou V, Pappa A and Petersen DR (2000) Role of aldehyde dehydrogenases in endogenous and xenobiotic metabolism. *Chem Biol Interact* **129**(1-2):1-19.
- Venhorst J, ter Laak AM, Commandeur JN, Funae Y, Hiroi T and Vermeulen NP (2003) Homology modeling of rat and human cytochrome P450 2D (CYP2D) isoforms and computational rationalization of experimental ligand-binding specificities. *J Med Chem* **46**(1):74-86.
- Virtanen R (1989) Pharmacological profiles of medetomidine and its antagonist, atipamezole. *Acta Vet Scand Suppl* **85**:29-37.

- Vuppugalla R, Shah RB, Chimalakonda AP, Fisher CW and Mehvar R (2003) Microsomal cytochrome P450 levels and activities of isolated rat livers perfused with albumin. *Pharm Res* **20**(1):81-88.
- Wada T, Gao J and Xie W (2009) PXR and CAR in energy metabolism. *Trends Endocrinol Metab* **20**(6):273-279.
- Walker BR (2007) Glucocorticoids and cardiovascular disease. *Eur J Endocrinol* **157**(5):545-559.
- Walker E, Mittal V and Tessner K (2008) Stress and the hypothalamic pituitary adrenal axis in the developmental course of schizophrenia. *Annu Rev Clin Psychol* **4**:189-216.
- Wan YJ, An D, Cai Y, Repa JJ, Hung-Po Chen T, Flores M, Postic C, Magnuson MA, Chen J, Chien KR, French S, Mangelsdorf DJ and Sucov HM (2000) Hepatocyte-specific mutation establishes retinoid X receptor alpha as a heterodimeric integrator of multiple physiological processes in the liver. *Mol Cell Biol* **20**(12):4436-4444.
- Wang B, Yang LP, Zhang XZ, Huang SQ, Bartlam M and Zhou SF (2009) New insights into the structural characteristics and functional relevance of the human cytochrome P450 2D6 enzyme. *Drug Metab Rev* **41**(4):573-643.
- Wang H and LeCluyse EL (2003) Role of orphan nuclear receptors in the regulation of drug-metabolising enzymes. *Clin Pharmacokinet* **42**(15):1331-1357.
- Watkins PB, Wrighton SA, Maurel P, Schuetz EG, Mendez-Picon G, Parker GA and Guzelian PS (1985) Identification of an inducible form of cytochrome P-450 in human liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**(18):6310-6314.
- Waxman DJ and Holloway MG (2009) Sex differences in the expression of hepatic drug metabolizing enzymes. *Mol Pharmacol* **76**(2):215-228.
- Waxman DJ, Morrissey JJ and Leblanc GA (1989) Hypophysectomy differentially alters P-450 protein levels and enzyme activities in rat liver: pituitary control of hepatic NADPH cytochrome P-450 reductase. *Mol Pharmacol* **35**(4):519-525.
- Waxman DJ and O'Connor C (2006) Growth hormone regulation of sex-dependent liver gene expression. *Mol Endocrinol* **20**(11):2613-2629.
- Wei L, Locuson CW and Tracy TS (2007) Polymorphic variants of CYP2C9: mechanisms involved in reduced catalytic activity. *Mol Pharmacol* **72**(5):1280-1288.

- Wei P, Zhang J, Dowhan DH, Han Y and Moore DD (2002) Specific and overlapping functions of the nuclear hormone receptors CAR and PXR in xenobiotic response. *Pharmacogenomics J* **2**(2):117-126.
- Weichhart T and Saemann MD (2008) The PI3K/Akt/mTOR pathway in innate immune cells: emerging therapeutic applications. *Ann Rheum Dis* **67 Suppl 3**:iii70-74.
- Whitmarsh AJ and Davis RJ (1996) Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *J Mol Med (Berl)* **74**(10):589-607.
- Wijnen PA, Op den Buijsch RA, Drent M, Kuijpers PM, Neef C, Bast A, Bekers O and Koek GH (2007) Review article: The prevalence and clinical relevance of cytochrome P450 polymorphisms. *Aliment Pharmacol Ther* **26 Suppl 2**:211-219.
- Williams JA, Ring BJ, Cantrell VE, Jones DR, Eckstein J, Ruterbories K, Hamman MA, Hall SD and Wrighton SA (2002) Comparative metabolic capabilities of CYP3A4, CYP3A5, and CYP3A7. *Drug Metab Dispos* **30**(8):883-891.
- Williams PA, Cosme J, Ward A, Angove HC, Matak Vinkovic D and Jhoti H (2003) Crystal structure of human cytochrome P450 2C9 with bound warfarin. *Nature* **424**(6947):464-468.
- Wiwi CA and Waxman DJ (2004) Role of hepatocyte nuclear factors in growth hormone-regulated, sexually dimorphic expression of liver cytochromes P450. *Growth Factors* **22**(2):79-88.
- Wojcikowski J and Daniel WA (2009) The brain dopaminergic system as an important center regulating liver cytochrome P450 in the rat. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **5**(6):631-645.
- Wolkowitz OM, Epel ES, Reus VI and Mellon SH (2010) Depression gets old fast: do stress and depression accelerate cell aging? *Depress Anxiety* **27**(4):327-338.
- Woodcroft KJ, Hafner MS and Novak RF (2002) Insulin signaling in the transcriptional and posttranscriptional regulation of CYP2E1 expression. *Hepatology* **35**(2):263-273.
- Woodcroft KJ and Novak RF (1997) Insulin effects on CYP2E1, 2B, 3A, and 4A expression in primary cultured rat hepatocytes. *Chem Biol Interact* **107**(1-2):75-91.
- Woodcroft KJ and Novak RF (1999) Insulin differentially affects xenobiotic-enhanced, cytochrome P-450 (CYP)2E1, CYP2B, CYP3A, and CYP4A expression in primary cultured rat hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther* **289**(2):1121-1127.

- Woolhouse NM, Andoh B, Mahgoub A, Sloan TP, Idle JR and Smith RL (1979) Debrisoquin hydroxylation polymorphism among Ghanaians and Caucasians. *Clin Pharmacol Ther* **26**(5):584-591.
- Wortham M, Czerwinski M, He L, Parkinson A and Wan YJ (2007) Expression of constitutive androstane receptor, hepatic nuclear factor 4 alpha, and P450 oxidoreductase genes determines interindividual variability in basal expression and activity of a broad scope of xenobiotic metabolism genes in the human liver. *Drug Metab Dispos* **35**(9):1700-1710.
- Wrighton SA, Brian WR, Sari MA, Iwasaki M, Guengerich FP, Raucy JL, Molowa DT and Vandenbranden M (1990) Studies on the expression and metabolic capabilities of human liver cytochrome P450III A5 (HLP3). *Mol Pharmacol* **38**(2):207-213.
- Wrighton SA, Schuetz EG, Watkins PB, Maurel P, Barwick J, Bailey BS, Hartle HT, Young B and Guzelian P (1985) Demonstration in multiple species of inducible hepatic cytochromes P-450 and their mRNAs related to the glucocorticoid-inducible cytochrome P-450 of the rat. *Mol Pharmacol* **28**(3):312-321.
- Wrighton SA and Stevens JC (1992) The human hepatic cytochromes P450 involved in drug metabolism. *Crit Rev Toxicol* **22**(1):1-21.
- Wullschlegel S, Loewith R and Hall MN (2006) TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* **124**(3):471-484.
- Xie HG, Prasad HC, Kim RB and Stein CM (2002) CYP2C9 allelic variants: ethnic distribution and functional significance. *Adv Drug Deliv Rev* **54**(10):1257-1270.
- Xie HG, Wood AJ, Kim RB, Stein CM and Wilkinson GR (2004) Genetic variability in CYP3A5 and its possible consequences. *Pharmacogenomics* **5**(3):243-272.
- Xie W, Barwick JL, Simon CM, Pierce AM, Safe S, Blumberg B, Guzelian PS and Evans RM (2000) Reciprocal activation of xenobiotic response genes by nuclear receptors SXR/PXR and CAR. *Genes Dev* **14**(23):3014-3023.
- Xu C, Li CY and Kong AN (2005) Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. *Arch Pharm Res* **28**(3):249-268.
- Yamaguchi S, Murata Y, Nagaya T, Hayashi Y, Ohmori S, Nimura Y and Seo H (1999) Glucocorticoids increase retinoid-X receptor alpha (RXRalpha) expression and enhance thyroid hormone action in primary cultured rat hepatocytes. *J Mol Endocrinol* **22**(1):81-90.

- Yamazoe Y, Shimada M, Murayama N and Kato R (1987) Suppression of levels of phenobarbital-inducible rat liver cytochrome P-450 by pituitary hormone. *J Biol Chem* **262**(15):7423-7428.
- Yasunami Y, Hara H, Iwamura T, Kataoka T and Adachi T (2004) C-jun N-terminal kinase modulates 1,25-dihydroxyvitamin D₃-induced cytochrome P450 3A4 gene expression. *Drug Metab Dispos* **32**(7):685-688.
- Yoshida Y, Kimura N, Oda H and Kakinuma A (1996) Insulin suppresses the induction of CYP2B1 and CYP2B2 gene expression by phenobarbital in adult rat cultured hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **229**(1):182-188.
- Yun KU, Oh SJ, Oh JM, Kang KW, Myung CS, Song GY, Kim BH and Kim SK (2010) Age-related changes in hepatic expression and activity of cytochrome P450 in male rats. *Arch Toxicol* **84**(12):939-946.
- Zanger UM, Raimundo S and Eichelbaum M (2004) Cytochrome P450 2D6: overview and update on pharmacology, genetics, biochemistry. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **369**(1):23-37.
- Zanger UM, Turpeinen M, Klein K and Schwab M (2008) Functional pharmacogenetics/genomics of human cytochromes P450 involved in drug biotransformation. *Anal Bioanal Chem* **392**(6):1093-1108.
- Zaphiropoulos PG (1999) RNA molecules containing exons originating from different members of the cytochrome P450 2C gene subfamily (CYP2C) in human epidermis and liver. *Nucleic Acids Res* **27**(13):2585-2590.
- Zelko I and Negishi M (2000) Phenobarbital-elicited activation of nuclear receptor CAR in induction of cytochrome P450 genes. *Biochem Biophys Res Commun* **277**(1):1-6.
- Zendulka O, Totusek J and Sulcova A (2009) Intersexual differences in inhibitory influence of trans-resveratrol on activity of cytochrome P450 2D2 in rats. *Neuro Endocrinol Lett* **30 Suppl 1**:88-91.
- Zhang X, Gan L, Pan H, Guo S, He X, Olson ST, Mesecar A, Adam S and Unterman TG (2002) Phosphorylation of serine 256 suppresses transactivation by FKHR (FOXO1) by multiple mechanisms. Direct and indirect effects on nuclear/cytoplasmic shuttling and DNA binding. *J Biol Chem* **277**(47):45276-45284.
- Zhou SF, Liu JP and Chowbay B (2009a) Polymorphism of human cytochrome P450 enzymes and its clinical impact. *Drug Metab Rev* **41**(2):89-295.

- Zhou SF, Xue CC, Yu XQ, Li C and Wang G (2007) Clinically important drug interactions potentially involving mechanism-based inhibition of cytochrome P450 3A4 and the role of therapeutic drug monitoring. *Ther Drug Monit* **29**(6):687-710.
- Zhou SF, Zhou ZW, Yang LP and Cai JP (2009b) Substrates, inducers, inhibitors and structure-activity relationships of human Cytochrome P450 2C9 and implications in drug development. *Curr Med Chem* **16**(27):3480-3675.
- Zhu BT (2002) Catechol-O-Methyltransferase (COMT)-mediated methylation metabolism of endogenous bioactive catechols and modulation by endobiotics and xenobiotics: importance in pathophysiology and pathogenesis. *Curr Drug Metab* **3**(3):321-349.
- Zuber R, Anzenbacherova E and Anzenbacher P (2002) Cytochromes P450 and experimental models of drug metabolism. *J Cell Mol Med* **6**(2):189-198.