



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Scienze del Farmaco

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE FARMACOLOGICHE

INDIRIZZO FARMACOLOGIA, TOSSICOLOGIA E TERAPIA

CICLO XXVI

***Effetto della disfunzione epatica sull'induzione enzimatica:
valutazione dell'inducibilità dei CYP1A e CYP3A
in ratti con cirrosi sperimentalmente indotta***

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Pietro Giusti

Coordinatore d'indirizzo: Ch.mo Prof. Pietro Palatini

Supervisore: Ch.mo Prof. Pietro Palatini

Dottorando Daniela Gabbia

Indice

Indice	5
Abstract	9
Riassunto	11
Introduzione	13
1.1 Metabolismo degli xenobiotici	13
1.2 Citocromi P450: ruolo e classificazione	14
1.3 La cirrosi epatica e il metabolismo degli xenobiotici	18
1.4 Inibizione ed induzione enzimatica	20
Scopo della tesi	27
Materiali e metodi	29
3.1 Materiali	29
3.2 Ratti e loro trattamento	30
3.3 Esame istologico	35
3.4 Preparazione dei microsomi epatici di ratto	35
3.5 Preparazione degli estratti proteici totali di fegato di ratto	36

3.6	Dosaggio proteico con metodo dell'acido bicinconinico	37
3.7	Dosaggio del CYP450 totale	37
3.8	Quantificazione dell'espressione genica di CYP1A1, CYP1A2 e AhR mediante qRT-PCR	38
3.9	Quantificazione dell'espressione genica di CYP3A1, CYP3A2 e PXR mediante qRT-PCR	39
3.10	Valutazione dell'espressione di CYP1A1 e CYP1A2 in preparazioni di microsomi epatici di ratto mediante Western blot	41
3.11	Valutazione dell'espressione proteica di CYP3A1 e CYP3A2 in preparazioni di microsomi epatici di ratto mediante Western Blot	43
3.12	Valutazione dell'espressione di AhR in omogenati totali di fegato di ratto	44
3.13	Valutazione dell'espressione proteica del recettore PXR mediante Western Blot	45
3.14	Valutazione dell'attività del CYP1A1 e del CYP1A2 in preparazioni microsomiali epatiche di ratto	45
3.15	Valutazione dell'attività 6 β -idrossitestosterone idrossilasica in preparazioni di microsomi epatici di ratto	49
3.16	Valutazione dell'attività di idrossilazione del midazolam in preparazioni di microsomi epatici di ratto	52
	Risultati	57
4.1	Effetto differenziale del BaP sull'induzione dei CYP1A nei ratti Wistar e Sprague-Dawley	57

4.2	Effetto della cirrosi sull'induzione dei CYP1A	69
4.3	Effetto della cirrosi sull'induzione dei CYP3A	81
	Discussione	101
	Bibliografia	111

Abstract

Background and aims: Although induction has long been investigated in patients with cirrhosis, highly discrepant results have been obtained; moreover, the mechanism underlying the possible effect of cirrhosis on induction has not been clarified. This study was designed to compare induction of CYP1A and CYP3A enzymes in healthy rats and rats with experimentally induced liver cirrhosis. Since differences in CYP1A induction in Sprague-Dawley and Wistar rats have been reported, the secondary aim of this study was to quantify the magnitude of CYP1A induction in these two rat strains.

Methods: We used 3 groups of male Wistar rats, one of healthy animals and two groups of rats with carbon tetrachloride (CCl₄)-induced cirrhosis, stratified according to the degree of liver dysfunction. Each group was divided in 2 subgroups of 8 rats, one treated with vehicle (oil), the other with an inducing agent [benzo[a]pyrene (BaP) or dexamethasone (DEX) for CYP1A and CYP3A, respectively]. To investigate the difference between Sprague-Dawley and Wistar rats, we used 2 groups of 8 healthy animals for each strain: one treated with vehicle, the other treated with BaP. The inducing effect was assessed by measuring the activity of CYP1A and CYP3A enzymes, using O-dealkylation of ethoxyresorufin and methoxyresorufin, and hydroxylation of testosterone and midazolam as marker reactions, respectively. Western blot analysis and qRT-PCR were performed to evaluate protein and gene expression of CYP1A, CYP3A and nuclear receptors responsible for their transcriptional control (Aryl Hydrocarbon receptor and Pregnane X Receptor, respectively).

Results and conclusion: 1) BaP treatment increased mRNA and protein expression of both CYP1A enzymes (CYP1A1 and CYP1A2) and AhR to a greater extent in Wistar than Sprague-Dawley rats. By contrast, CYP1A2 enzyme activity was much more markedly increased in Sprague-Dawley than Wistar rats and CYP1A1 activity was induced to similar levels in the two rat strains. A BaP-induced increase in the turnover number of CYP1A enzymes in Sprague-Dawley rats, relative to Wistar rats, may provide a plausible explanation for the differential effect of BaP on gene expression and enzyme activity in these rat strains.

2) The inducibility of CYP1A enzymes is well preserved in non ascitic rats, whereas it is markedly reduced when liver dysfunction becomes severe. Induction appears to be impaired

at the transcriptional level, due to the reduced expression of AhR, which controls the transcription of CYP1A genes.

3) Cirrhosis has a differential effect on the induction by DEX of the two CYP3A isoforms CYP3A1 and CYP3A2. The induction of CYP3A1 mRNA and protein is well preserved in both compensated and decompensated cirrhosis, whereas that of CYP3A2 is markedly reduced when liver dysfunction becomes severe. Consistently, CYP3A1 activity is significantly increased in DEX-treated rats irrespective of the degree of liver dysfunction, whereas CYP3A2 activity is not significantly induced in ascitic rats after DEX treatment. At variance with AhR, no significant increase in PXR gene and protein expression is observed in DEX-treated healthy or cirrhotic rats.

In conclusion, the effect of cirrhosis on enzyme induction is dependent in the type of nuclear receptor that mediates the inducing effect. Therefore, no generalization can be made and the influence of cirrhosis on inducibility has to be assessed for each class of inducing agents.

Riassunto

Introduzione e scopo: Anche se l'induzione è stata a lungo studiata nei pazienti con cirrosi, i risultati ottenuti sono stati contrastanti; inoltre, il meccanismo alla base del possibile effetto della cirrosi sull'induzione non è stato chiarito. Questo studio è stato svolto per confrontare l'induzione degli enzimi CYP1A e CYP3A in ratti sani e con cirrosi indotta sperimentalmente. Poiché sono state riportate differenze nell'induzione del CYP1A in ratti Sprague-Dawley e Wistar, scopo secondario di questo studio è stato quello di quantificare l'entità dell'induzione del CYP1A in questi due ceppi di ratto.

Metodi: Sono stati utilizzati 3 gruppi di ratti Wistar maschi, uno di animali sani e due gruppi di ratti con cirrosi indotta con tetracloruro di carbonio (CCl₄), stratificati in base al grado di disfunzione epatica. Ogni gruppo è stato diviso in due sottogruppi di 8 ratti, uno trattato con il veicolo (olio), l'altro con un agente inducente [benzo[a]pirene (BaP) o desametasone (DEX) per CYP1A e CYP3A, rispettivamente]. Per il confronto tra i ratti Sprague-Dawley e Wistar sono stati usati 2 gruppi di 8 animali sani per ogni ceppo: uno trattato con veicolo, l'altro trattato con BaP. L'inducibilità è stata valutata misurando l'attività enzimatica, utilizzando l'O-dealchilazione della 7-etossiresorufina e della 7-metossiresorufina, e l'idrossilazione di testosterone e midazolam, come reazioni *marker* di CYP1A e CYP3A, rispettivamente. Sono state eseguite analisi di qRT-PCR e *Western Blot* per valutare l'espressione genica e proteica dei CYP1A, CYP3A e dei recettori nucleari responsabili del loro controllo trascrizionale [Aryl Hydrocarbon receptor (AhR) and Pregnane X Receptor (PXR), rispettivamente].

Risultati e conclusioni: 1) Il trattamento con BaP aumenta l'espressione genica e proteica di entrambe le isoforme di CYP1A (CYP1A1 e CYP1A2) e dell'AhR in misura maggiore nei ratti Wistar che in quelli Sprague-Dawley. Al contrario, l'attività del CYP1A2 è aumentata in modo maggiore negli Sprague-Dawley rispetto ai Wistar e l'attività del CYP1A1 è indotta a livelli simili nei due ceppi di ratto. Una spiegazione plausibile per l'effetto differenziale del BaP su espressione e attività enzimatica dei CYP1A in questi ceppi di ratto può essere un diverso *turnover number* dei CYP1A indotti nei ratti Sprague-Dawley e Wistar.

2) L'inducibilità del CYP1A è ben conservata nei ratti cirrotici non ascitici, mentre è notevolmente ridotta in quelli ascitici. Tale riduzione appare causata dalla ridotta espressione dell'AhR, che controlla la trascrizione di geni del CYP1A.

3) La cirrosi ha un effetto differenziale sull'induzione prodotta dal DEX delle due isoforme di CYP3A: CYP3A1 e CYP3A2. L'induzione dell'espressione genica e proteica del CYP3A1 è conservata nella cirrosi sia compensata che scompensata, mentre quella del CYP3A2 viene notevolmente ridotta in seguito all'aggravarsi della disfunzione epatica. Coerentemente con questi risultati, l'attività CYP3A1 è significativamente aumentata nei ratti trattati con DEX indipendentemente dal grado di disfunzione epatica, mentre l'attività del CYP3A2 non è significativamente indotta nei ratti ascitici dopo il trattamento con DEX. A differenza di quanto osservato per l'AhR, non è stato osservato alcun aumento significativo dell'espressione del PXR nei ratti trattati con DEX, sia sani che cirrotici.

Si può quindi concludere che l'effetto della cirrosi sull'induzione enzimatica dipende dal tipo di recettore nucleare coinvolto. Pertanto, non può essere fatta nessuna generalizzazione e l'influenza della cirrosi sull'inducibilità dei CYP deve essere valutata per ogni classe di induttori.

Introduzione

1.1 Metabolismo degli xenobiotici

Gli organismi viventi vengono continuamente in contatto con sostanze chimiche estranee presenti nell'ambiente in cui vivono, definite xenobiotici. Sono sostanze di varia origine, quali prodotti non nutritivi contenuti nei cibi, metaboliti secondari di piante, tossine di origine vegetale, animale e batterica, prodotti chimici industriali e farmaci, che vengono assorbiti attraverso varie vie, quali la via orale, inalatoria e transcutanea. Gli xenobiotici possono essere di tipo proteico, come alcuni farmaci, tossine animali, vegetali o batteriche, ma più frequentemente sono piccole molecole lipofile o scarsamente idrosolubili, capaci pertanto di essere assorbite dall'organismo. Essendo considerati estranei dall'organismo, gli xenobiotici vengono riconosciuti, trasformati ed eliminati dagli organismi stessi attraverso un procedimento detto "biotrasformazione", che ha il fine di limitare le interferenze che tali sostanze possono avere con i normali processi fisiologici. La biotrasformazione degli xenobiotici rappresenta il principale meccanismo di omeostasi durante l'esposizione a piccole molecole ed è operata da un numero assai limitato di enzimi che hanno una specificità di substrato molto ampia che permette loro di agire su composti con la più diversa struttura. Tale processo procede per tappe successive con la trasformazione della sostanza in uno o più metaboliti che vengono eliminati attraverso feci e/o urine.

Il metabolismo degli xenobiotici è un processo tipicamente bifasico che si suddivide in una prima fase nota come metabolismo di fase I e in una seconda nota come metabolismo di fase II¹. La fase I, detta anche di funzionalizzazione, prevede la modificazione chimica della sostanza al fine di esporre o introdurre gruppi funzionali polari, necessari alle successive reazioni di fase II. Le modifiche chimiche di fase I sono mediate da specifici sistemi enzimatici e si possono classificare in tre classi di reazioni:

- *Ossidazione*, mediata principalmente da citocromo P450, alcol deidrogenasi, aldeide deidrogenasi, monossigenasi flaviniche, monoaminossidasi.
- *Riduzione*, mediata principalmente da chinone- e carbonil-reduttasi e citocromo P450.

- *Idrolisi*, mediata da idrolasi e peptidasi.

Le reazioni di fase II coniugano un substrato endogeno al metabolita derivato dalla fase I, al fine di incrementarne il peso molecolare e l'idrosolubilità, facilitando l'escrezione biliare e renale. Tali reazioni sono mediate da sistemi enzimatici specifici, quali UDP glucuronil transferasi, solfotransferasi, N-acetil-, metil- e acil- transferasi e glutatione S-transferasi, che mediano il trasferimento di acidi, aminoacidi e glutatione.

Nonostante la biotrasformazione abbia come fine ultimo l'eliminazione degli xenobiotici, può talvolta dare origine a metaboliti biologicamente ancora o addirittura più attivi dell'originale, come nel caso degli idrocarburi inalati con il fumo che diventano mutageni e cancerogeni.

Sebbene ogni xenobiotico, una volta assorbito, presenti un caratteristico tropismo verso determinati organi e anche se la sua attività può avvenire a livello di diversi apparati, la principale sede delle biotrasformazioni è il fegato, seguita da intestino tenue, reni e polmoni.

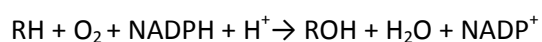
1.2 Citocromi P450: ruolo e classificazione

L'enzima di gran lunga più importante nel metabolismo di fase I degli xenobiotici è il citocromo P450 (CYP), che comprende una serie di famiglie e sottofamiglie con diversa specificità. L'identificazione e la quantificazione dei diversi enzimi e la valutazione dell'attività biologica dei metaboliti ottenuti sono fondamentali allo scopo di individuare possibili interazioni, a seguito di co-somministrazione di farmaci, e per verificare variazioni nelle risposte farmacologiche individuali, queste ultime correlate al polimorfismo genetico del corredo enzimatico².

Con il nome di citocromo P450 (CYP) si identifica un gruppo di emoproteine presente in tutti i domini degli esseri viventi, in cui è presente un atomo di ferro in forma ossidata (Fe^{3+}) o ridotta (Fe^{2+}). Nelle cellule eucariotiche, questi complessi enzimatici sono localizzati a livello delle membrane del reticolo endoplasmatico liscio e nella membrana interna dei mitocondri, ancorati ad esse tramite la regione N-terminale. La frazione microsomiale delle cellule epatiche è particolarmente ricca di citocromi, in quanto il fegato è la principale sede di biotrasformazione dell'organismo.

La superfamiglia dei citocromi P450 è interessante sia dal punto di vista fisiologico che farmacologico in quanto, potendo agire su un'ampia gamma di substrati sia endogeni che esogeni, è coinvolta nel metabolismo non solo di svariate classi di ormoni steroidei, acidi biliari, vitamine idrofobiche, acidi grassi e eicosanoidi, prostaglandine, trombossani, e leucotrieni, ma anche nel metabolismo di molti farmaci. Il citocromo P450 ha un ruolo fondamentale nelle proprietà farmacocinetiche e farmacodinamiche dei farmaci in quanto, modificandone le proprietà chimiche, può influire sia sulla durata che sull'intensità dell'effetto farmacologico di questi composti.

Da un punto di vista biochimico, il CYP appartiene alla sottoclasse enzimatica delle monossigenasi. La reazione tipica consiste nel trasferimento di un atomo di ossigeno ad un substrato organico, con riduzione del secondo atomo di ossigeno in acqua:



Il citocromo P450 deve il nome alle proprie caratteristiche spettroscopiche. L'atomo di ferro all'interno del gruppo prostetico eme (protoporfirina IX), è presente normalmente allo stato ferrico (Fe^{3+}), ma viene ridotto allo stato ferroso (Fe^{2+}) dal cofattore NADPH in seguito alla formazione di un legame covalente con una molecola di monossido di carbonio (CO). Come illustrato nella Figura 1, questo intermedio presenta un caratteristico picco di assorbimento a 450nm^3 . Il ciclo catalitico del CYP può essere riassunto in quattro principali passaggi (Figura 1):

- il farmaco (RH) si lega al ferro del gruppo eme originando un complesso enzima-substrato,
- l'enzima NADPH-CYP450 reduttasi riduce il Fe^{3+} a Fe^{2+} : la flavoproteina si ossida e viene ripristinata in forma ridotta dal NADPH che cede un elettrone,
- una molecola di ossigeno si lega al complesso enzima-substrato, a livello del ferro Fe^{2+} ,
- il complesso enzima-substrato-ossigeno viene attivato dall'aggiunta di un ulteriore elettrone, donato ancora una volta dalla NADPH-CYP450 reduttasi, e risulta quindi in grado di trasferire un atomo di ossigeno al substrato formando il prodotto di reazione (ROH) e acqua.

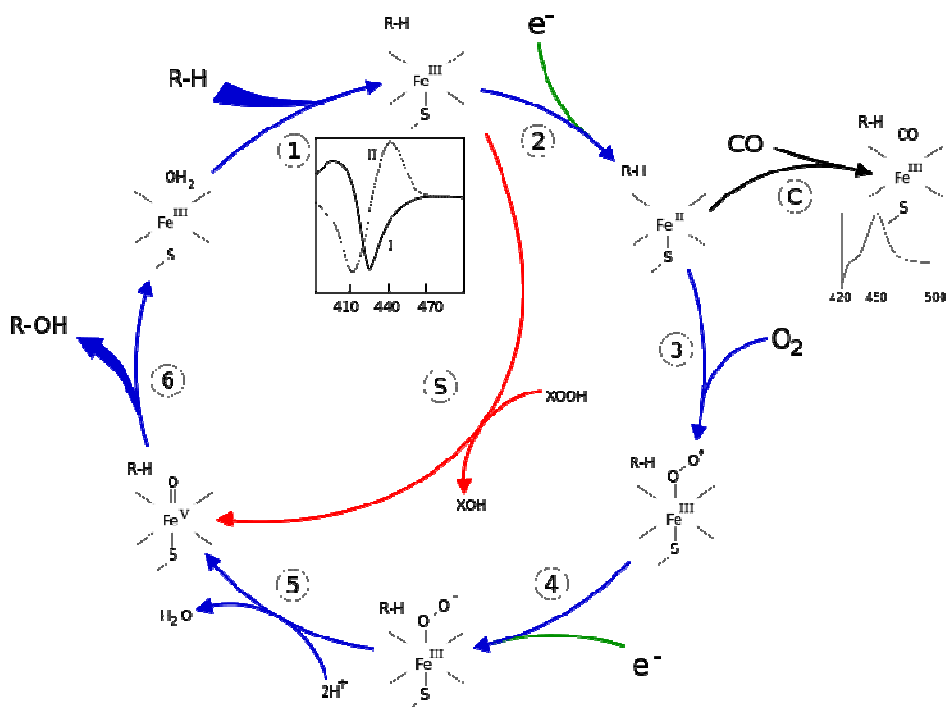


Figura 1 Ciclo catalitico del CYP450

I citocromi P450 sono stati classificati in famiglie e sottofamiglie secondo la seguente nomenclatura:

- L'acronimo CYP, che indica cytochrome P450;
- Un numero arabo, che indica la famiglia di appartenenza;
- Una lettera maiuscola, che indica la sottofamiglia;
- Un numero arabo, che indica la singola isoforma.

I citocromi appartenenti alla stessa famiglia si caratterizzano per un'omologia nella sequenza aminoacidica pari o superiore al 40%, mentre nel caso di una sottofamiglia l'omologia è di almeno il 55%.

CYP1A

Una caratteristica fondamentale di questa sottofamiglia di citocromi è la loro inducibilità. Tali proteine enzimatiche sono spesso utilizzate come *biomarker* per la presenza di agenti inquinanti induttori con potenziale effetto pro-oncogenico. È infatti noto che tali citocromi

sono indotti dalle più diffuse classi di contaminanti ambientali quali idrocarburi policiclici aromatici, idrocarburi policiclici aromatici nitrati, policlorobifenili, diossine e pesticidi. Una sottofamiglia di citocromi molto importante, soprattutto per il diretto coinvolgimento nelle reazioni di attivazione di pro-cancerogeni a sostanze cancerogene, è quella del CYP1A di cui fanno parte due importanti prodotti genici: CYP1A1 e CYP1A2.

Il CYP1A1 ha un'omologia della sequenza aminoacidica pari al 79% tra uomo e ratto⁴ e pari all'80% tra uomo e topo⁵. Una caratteristica comune di questa isoforma nelle tre specie considerate è la sua assenza come enzima costitutivo a livello epatico. È invece espresso costitutivamente in tessuti extraepatici, quali polmone, rene, tratto gastrointestinale e cervello. Il CYP1A1 è un enzima inducibile in seguito all'esposizione a idrocarburi policiclici aromatici, come il benzo[a]pirene, o a idrocarburi aromatici alogenati, come la diossina. L'attività del CYP1A1 viene generalmente valutata misurando l'O-dealchilazione dell'etosioresorufina (EROD).

Diversamente dal CYP1A1, il CYP1A2 è un enzima costitutivo nell'uomo, nel topo e nel ratto; l'omologia della sequenza è del 75% tra uomo e ratto del 72% tra uomo e topo. A livello epatico rappresenta il 10% circa del citocromo P450 totale⁶. Come il CYP1A1, anche il CYP1A2 è suscettibile a induzione in seguito all'esposizione ad idrocarburi aromatici policiclici o idrocarburi aromatici alogenati. Per valutare l'attività del CYP1A2 si utilizzano delle reazioni *marker*, considerate specifiche per questa isoforma: l'acetanilide-4-idrossilasi, la fenacetina-O-deetilasi (con alcune differenze tra le diverse specie di provenienza); la 7-metossioresorufina-O-demetilasi (molto più attiva nella specie ratto, diversamente dalla acetanilide-N-idrossilasi, che risulta più attiva nell'uomo)⁷. Vi è una certa variabilità interindividuale nell'attività dell'enzima e nel grado d'induzione, con conseguente alterazione della risposta ad alcuni farmaci (es. teofillina e aloperidolo) o ad altri substrati del CYP1A2, come la caffeina, che nei soggetti fumatori è meglio tollerata in quanto maggiormente metabolizzata⁸.

CYP3A

Una delle più importanti sottofamiglie di citocromi coinvolte nel metabolismo degli xenobiotici è quella del CYP3A. Sono stati identificati quattro geni umani (*CYP 3A4, 3A5, 3A7 e 3A43*). Le proteine 3A4, 3A5 e 3A7 presentano un elevato grado di omologia nelle loro

sequenze aminoacidiche e hanno proprietà catalitiche simili. Il CYP3A4 rappresenta circa il 30% di tutti gli isoenzimi presenti a livello epatico⁶, ed essendo caratterizzato da una scarsa specificità di substrato, contribuisce al metabolismo di circa il 50% dei farmaci attualmente utilizzati in terapia. È espresso anche a livello dell'intestino tenue, del colon, del pancreas e del rene. Il CYP3A5 risulta espresso, seppur solamente in una frazione minoritaria della popolazione, sia a livello epatico che a livello intestinale e renale. Infine il CYP3A7 risulta espresso costitutivamente nel fegato del feto (dove raggiunge il 50% del CYP totale), ma non in quello dell'adulto⁶.

Nel ratto sono stati identificati cinque geni CYP3A, in particolare *3A1*, *3A2*, *3A9*, *3A18* e *3A23*, che codificano altrettante proteine⁹. Il CYP3A1 è altamente inducibile a livello epatico; i CYP3A2 e CYP3A18 sono costitutivamente espressi quasi esclusivamente nel ratto maschio, mentre il CYP3A9 è presente in maggiore quantità nelle femmine adulte. Per valutare l'attività delle isoforme di CYP3A vengono utilizzate delle reazioni *marker* selettive quali la 6 β -idrossilazione del testosterone e l'idrossilazione del midazolam in posizione 4 e 1'¹⁰.

1.3 La cirrosi epatica e il metabolismo degli xenobiotici

La cirrosi epatica è definita come una fibrosi in stato avanzato cui si associa una modificazione della circolazione sanguigna epatica¹¹. In un fegato cirrotico si evidenzia la presenza di necrosi e di noduli di rigenerazione circondati da tessuto fibroso. La presenza di ammassi di epatociti rigenerati, che non riproducono la geometria strutturale tipica del lobulo originario, porta alla compromissione della funzionalità del lobulo neoformato, in seguito alla mancanza della vena centro lobulare, e alla modificazione della circolazione sanguigna, con sviluppo di ipertensione portale a seguito dell'aumento delle resistenze intraepatiche. Lo stadio iniziale della malattia (cirrosi compensata) è asintomatico: gli epatociti, presenti in numero ancora adeguato, permettono al fegato di avere una funzionalità pressoché normale e la pressione nella vena porta non risulta aumentata. Con il progredire dello stato patologico fino al grado più avanzato (cirrosi scompensata) iniziano a presentarsi sintomi gravi, quali perdita di massa muscolare, di peso e mancanza di appetito, accompagnati da ittero, ascite, edemi agli arti inferiori, prurito, varici gastro-esofagee, encefalopatia e trombocitopenia nello

stadio più grave. Una delle più frequenti complicazioni della cirrosi epatica è l'ascite, che si sviluppa in seguito all'ipertensione portale.

Sono state proposte varie scale per valutare la gravità della malattia. Child ha proposto una scala basata su segni, sintomi e parametri biochimici¹². In questa scala esistono tre diversi gradi di cirrosi epatica: gradi A, B, C di Child, in ordine crescente di gravità. Nella cirrosi di grado A la funzionalità epatica è scarsamente ridotta; in quella di grado B i test biochimici mostrano una funzionalità alterata, in cui l'ascite risulta facilmente controllabile farmacologicamente e l'encefalopatia risulta minima; la cirrosi di grado C è di tipo scompensato, con forte alterazione della funzionalità, grave encefalopatia e presenza di ascite non regredibile farmacologicamente.

Un altro sistema più dettagliato d'indicizzazione della funzionalità epatica è la scala di Pugh, in cui la gravità della cirrosi è indicata da un punteggio in base agli esiti dei test biochimici e dei parametri clinici. Un punteggio compreso tra 5-6 della scala di Pugh corrisponde al grado A della scala di Child, un punteggio tra 7-9 al grado B e un punteggio tra 10-15 al grado C¹³.

La compromissione del metabolismo dei farmaci è generalmente correlabile al grado di cirrosi. Nella cirrosi di grado A raramente si rileva una significativa diminuzione della *clearance* epatica, quindi nella maggior parte dei casi non è necessario un adeguamento della dose del farmaco; nella cirrosi di grado B e C è invece necessaria una riduzione della dose in proporzione all'entità dell'insufficienza epatica. Nei pazienti affetti da epatite cronica, ma con assenza di cirrosi, la funzionalità epatica è paragonabile o quasi a quella di un soggetto sano.

Sono state formulate quattro teorie per spiegare l'alterato metabolismo epatico degli xenobiotici in relazione alla cirrosi¹⁴.

Teoria dell'epatocita intatto

Secondo questa teoria gli epatociti sono presenti in numero ridotto pur mantenendo una normale funzionalità. Rispetto ad un soggetto sano, il numero di epatociti totale di un paziente cirrotico è inferiore e questo sarebbe la causa dell'alterazione della funzionalità metabolica. La teoria tuttavia non spiega la marcata riduzione delle reazioni di fase I in rapporto a quelle di fase II¹⁴.

Teoria della cellula malata

Secondo questa teoria sarebbe presente un peggioramento globale della funzione epatocellulare, correlato alla gravità della malattia, benché il flusso sanguigno sia mantenuto. A riprova di questa teoria, studi *in vitro* hanno dimostrato una differenziale diminuzione (dal 20% all'80%) dei vari CYP in soggetti cirrotici¹⁵. Studi in soggetti umani e animali hanno inoltre dimostrato come la riduzione dell'espressione di CYP sia correlata alla severità della patologia e come i citocromi P450 della sottofamiglia 1A siano tra i più ridotti. Alla base di questa diminuzione sembra esserci un'inibizione dell'attività trascrizionale da parte dei mediatori dell'infiammazione (citochine e interferoni), accumulatisi durante il processo patologico.

Teoria della ridotta captazione dei farmaci

In condizioni normali i sinusoidi sono caratterizzati dall'assenza della membrana basale e dalla presenza di una parete endoteliale discontinua, che facilita il trasferimento dei farmaci dal sangue agli epatociti. Nella cirrosi avvengono delle modificazioni morfologiche (definite complessivamente come capillarizzazione dei sinusoidi) che portano a occlusione delle discontinuità e a formazione di una membrana basale che compromette lo scambio di farmaco tra sangue ed epatociti.

Teoria della limitata ossigenazione

Secondo questa teoria, la capillarizzazione dei sinusoidi impedisce un efficiente scambio di ossigeno tra il sangue e gli epatociti. A sostegno di tale teoria vi è l'osservazione della maggiore riduzione delle reazioni di fase I (ossidative) rispetto a quelle di fase II, che sono meno sensibili alla carenza di ossigeno¹⁶.

1.4 Inibizione ed induzione enzimatica

Nel metabolismo dei farmaci si osserva una grande variabilità interindividuale dovuta principalmente a fattori genetici (quali il polimorfismo a carico degli enzimi biotrasformanti), variabili fisiologiche (quali età e sesso) e condizioni patologiche. Un ruolo cruciale nella variabilità è rappresentato anche da altri fattori quali la co-somministrazione di farmaci e l'esposizione a sostanze presenti nella dieta o nell'ambiente. In quest'ultimo ambito vanno considerate l'inibizione e l'induzione enzimatica.

L'inibizione del metabolismo costituisce il più frequente e pericoloso tipo d'interazione farmacologica. Indagini epidemiologiche hanno rilevato che circa il 50% delle interazioni farmacologiche osservate nella pratica clinica sono la conseguenza dell'inibizione del citocromo P450. Come dato di fatto, le manifestazioni cliniche più frequenti consistono in un'aumentata tossicità del farmaco, per inibizione del suo metabolismo. I meccanismi alla base dell'inibizione del CYP possono essere di tipo reversibile o irreversibile¹. L'inibizione reversibile si verifica quando un inibitore generalmente lipofilo occupa il sito attivo del CYP e compete per lo stesso sito catalitico con le sostanze che vengono metabolizzate dallo stesso CYP. Vi sono anche inibitori che non sono substrati per il CYP di cui bloccano l'attività catalitica. L'inibizione irreversibile, invece, è dovuta alla formazione di un complesso metabolico intermedio del substrato, che si lega tenacemente alla forma ridotta dell'eme dando origine ad un intermedio inattivo. Alternativamente, durante il metabolismo di una sostanza, viene generato un metabolita chimicamente reattivo che si lega covalentemente al gruppo eme o all'apoproteina inattivandoli irreversibilmente.

L'induzione enzimatica è un fenomeno provocato dall'esposizione dell'organismo a sostanze generalmente molto lipofile che causano un aumento dei livelli dei vari enzimi coinvolti nel metabolismo degli xenobiotici, con conseguente aumento della velocità di biotrasformazione. I meccanismi con cui gli induttori possono aumentare il metabolismo degli xenobiotici sono tre: un aumento della trascrizione del gene d'interesse, una stabilizzazione dell'mRNA o una stabilizzazione della proteina (Figura 2)¹. Generalmente, l'induzione enzimatica è un processo dose-dipendente, che dipende dai livelli di esposizione all'agente inducente, ed è reversibile in seguito alla sospensione dell'esposizione all'induttore.

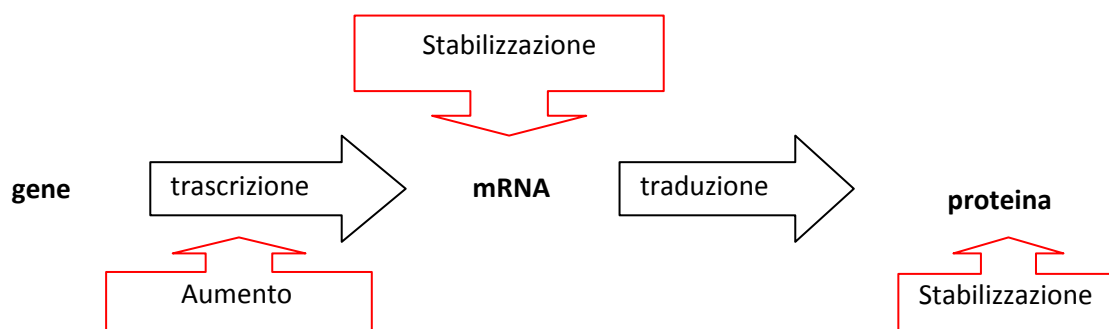


Figura 2 Schema riassuntivo dei meccanismi di induzione

Le conseguenze cliniche del fenomeno dell'induzione possono essere essenzialmente di due tipi e dipendono dal tipo di sostanza biotrasformata e dal tipo di metabolita prodotto. Se il farmaco somministrato viene metabolizzato in una molecola dotata di minore attività, si osserverà una diminuzione significativa dei livelli plasmatici del farmaco attivo e, come conseguenza, una riduzione dell'effetto terapeutico o addirittura inefficacia terapeutica. Se invece il farmaco somministrato viene trasformato in un metabolita ancora attivo o con attività biologica superiore, si potrà avere un aumento dell'effetto terapeutico o addirittura la comparsa di effetti tossici.

La risposta agli induttori delle diverse isoforme di CYP è soggetta a variabilità interindividuale ed è specie-specifica. Molte sono infatti le differenze del grado di induzione tra uomo, ratto e topo. Uno studio di Kishida¹⁷ ha evidenziato inoltre una differenza tra ceppi di una stessa specie (ratti Sprague-Dawley e Wistar) nel grado di induzione da parte di diverse sostanze nei confronti di alcune isoforme di CYP. Questo pone l'accento sulla necessità di approfondire le differenze nell'espressione e nell'attività delle varie isoforme di CYP in animali della stessa specie ma di ceppi diversi per armonizzare i risultati degli studi di farmacocinetica e tossicità svolti.

Centinaia di sostanze che appartengono a varie classi chimiche hanno un effetto inducente e sono tutte accumulate dal fatto di presentare in generale un'elevata idrofobicità. Attualmente tutti questi induttori vengono riuniti in 5 classi, a seconda del recettore che attivano:

- *Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR)*,
- *Constitutive Androstane Receptor (CAR)*,
- *Pregnane X Receptor (PXR)*,
- *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α (PPAR α)*

o del meccanismo d'azione:

- Stabilizzazione dell'mRNA e/o della proteina enzimatica.

Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR)

Storicamente, l'AhR è stato studiato e definito come un recettore solubile epatico coinvolto nell'induzione del metabolismo di contaminanti ambientali. Solo più recentemente, grazie all'utilizzo di animali *knock-out*, è stato riportato un suo ruolo fisiologico nella normale via di sviluppo della vascolarizzazione epatica e nello sviluppo del fegato come organo, così come anche un ruolo nel corretto sviluppo del sistema immunitario, sia a livello ematopoietico sia a livello della normale architettura degli organi linfoidi¹⁸.

Originariamente l'AhR è stato caratterizzato come un regolatore del metabolismo di xenobiotici, in particolare di molecole idrocarburiche policicliche aromatiche. I primi esperimenti condotti rivelarono che l'esposizione a tali agenti, in particolare al benzo[a]pirene, inducevano una risposta metabolica adattativa mirata alla biotrasformazione degli stessi per favorirne l'eliminazione¹⁹. Tale risposta metabolica era accompagnata da un'estrema tossicità con conseguenti danni agli epatociti, immunosoppressione, iperplasie epiteliali, teratogenesi e cancerogenesi^{20,21,22}. Dato che la tossicità di questi composti *in vivo* era proporzionale alla loro affinità per l'AhR, sembrò interessante caratterizzare dal punto di vista biologico il ruolo di questo recettore.

L'AhR è un fattore di trascrizione che contiene un dominio PAS (Per-Arnt-Sim) centrale, motivo funzionale altamente conservato tra i regni animali (mammiferi, anfibi, uccelli e rettili) e responsabile del riconoscimento di piccole molecole endogene o esogene come ossigeno molecolare, metaboliti cellulari e idrocarburi policiclici aromatici²³. Il dominio PAS media sia l'eterodimerizzazione con l'*AhR nuclear translocator* (ARNT), una proteina strutturalmente complementare, sia il legame con il legando. La struttura presenta, inoltre, un dominio N-

terminale di tipo *helix-loop-helix*, tipico dei fattori di trascrizione, che svolge la funzione di mediatore dell'interazione con il DNA, e una regione C-terminale variabile. Il motivo N-terminale coadiuva l'eterodimerizzazione e media l'interazione con il DNA a seguito della traslocazione nucleare. La regione C-terminale, variabile da specie a specie, contiene una regione TAD (*Trans Activation Domain*), che lega coregolatori ed è responsabile della transattivazione della trascrizione, una volta instaurato il legame con il DNA. Nella Figura 3 è rappresentato un modello lineare in cui sono riportati i domini funzionali di AhR.

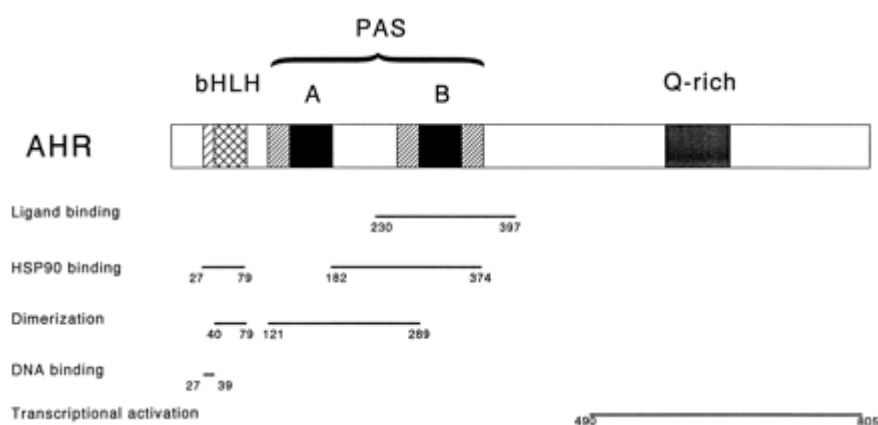


Figura 3 Struttura dell'AhR (tratto da Fukunaga²⁴).

In assenza di legando, l'AhR è localizzato a livello citoplasmatico, complessato con proteine di tipo *chaperon*, quali *heat shock protein 90* (Hsp90), *P23*, *aryl hydrocarbon associated 9* (ARA9) (Figura 4). L'Hsp90 mantiene l'AhR in uno stato capace di legare un legando e ne previene la traslocazione nel nucleo. La proteina P23 stabilizza l'interazione AhR-Hsp90, mentre l'ARA9 mantiene in uno stato ripiegato l'AhR, contribuendo notevolmente alle sue capacità di trasduzione del segnale. In seguito al legame con il legando, questo complesso trasloca al nucleo dove interagisce con la proteina ARNT, formando un complesso eterodimerico trascrizionalmente attivo. L'eterodimero riconosce sequenze geniche promotrici, denominate *dioxine-responsive enhancer elements* (DREs), a monte dei geni bersaglio dell'AhR, genericamente definiti "*AhR gene battery*". Sebbene la lista di questi geni sia in continua evoluzione, di notevole importanza sono i geni coinvolti nel metabolismo degli xenobiotici quali i citocromi P450 CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1 e UDP glucuronosiltransferasi (UGT1A6)²⁵.

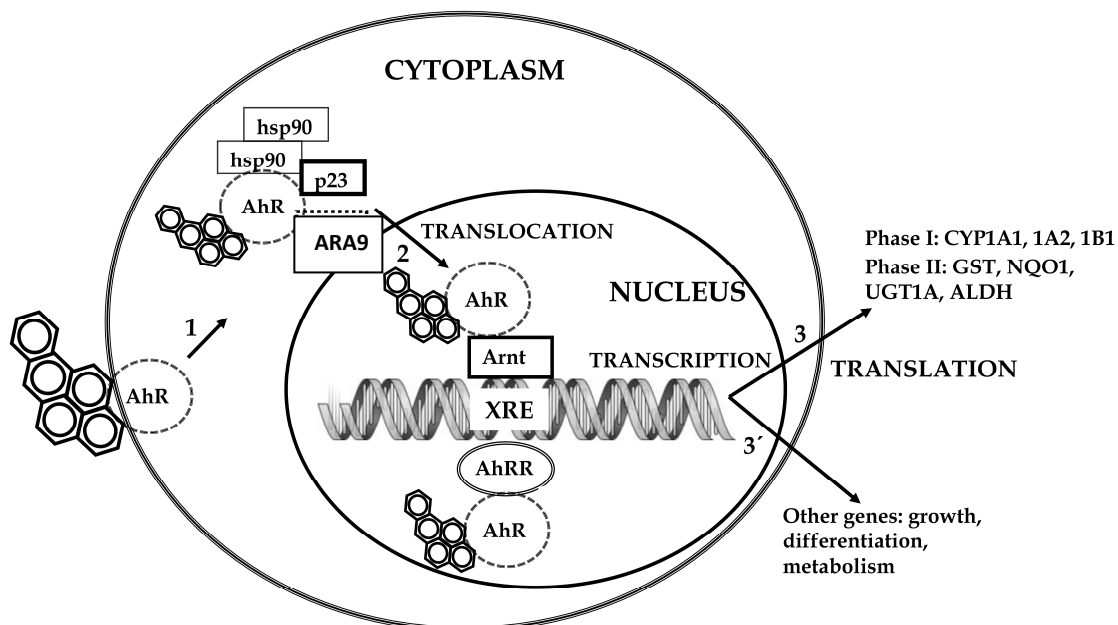


Figura 4 Modello di funzionamento di AhR²⁶. Gli induttori del CYP1A interagiscono con il recettore AhR (1), che è localizzato a livello citoplasmatico complessato con proteine *chaperone* (come Hsp90, p23 e ARA9) che ne prevengono la traslocazione nel nucleo. Il legame AhR-induttore attiva il recettore che trasloca nel nucleo (2) e interagisce con Arnt per attivare la trascrizione dei geni bersaglio (3).

Pregnane X receptor (PXR)

Il Pregnane X receptor (PXR) è membro di una famiglia di recettori nucleari che include recettori per gli ormoni steroidei, retinoici e tiroidei. Inizialmente è stato identificato in seguito a studi sugli xenobiotici e è stato definito "recettore orfano" in quanto non erano noti legandi endogeni. Studi successivi hanno dimostrato l'esistenza di legandi endogeni per alcuni di questi recettori nucleari orfani²⁷.

Il recettore PXR, così denominato perché tra i suoi attivatori vi sono alcuni steroidi derivati del pregnano sia naturali sia sintetici a 21 atomi di carbonio, è presente nel citoplasma, in assenza di legando. È costituito da un dominio N-terminale variabile, da un dominio centrale di legame al DNA (DBD), e da un dominio C-terminale di legame con il legando (LBD).



Figura 5 Organizzazione del recettore nucleare PXR ²⁸.

Il dominio DBD è costituito da circa 70 aminoacidi aventi due “*zinc fingers*”, cioè quattro cisteine che legano un atomo di zinco. Il dominio LBD, invece, è composto da circa 250 aminoacidi che si posizionano a formare un’ampia tasca idrofobica, in cui si lega l’induttore. Il recettore PXR viene attivato grazie all’interazione diretta con induttori, tra i quali, come ricordato, vi sono anche molecole endogene, quali alcuni ormoni steroidei e metaboliti degli acidi biliari. Fisiologicamente questo recettore è coinvolto nella sintesi, nel trasporto e nel metabolismo degli acidi biliari. Confrontando la struttura del recettore in specie diverse (uomo, coniglio e topo) si è visto che il dominio DBD presenta oltre il 90% d’identità aminoacidica, mentre il dominio LBD solo circa il 70-80%²⁹. Questo spiega perché i recettori PXR di specie diverse possono presentare diversa specificità di legame agli induttori³⁰. In particolare nel ratto e nel topo, il pregnenolone 16 α -carbonitrile (PCN) e il desametasone (DEX) sono i principali induttori dei CYP della famiglia 3A. Essi, viceversa, si rivelano privi di attività nell’uomo, dove invece è l’antibiotico rifampicina che si rivela il miglior induttore di CYP 2 e 3. Al contrario, la rifampicina è dotata di scarsa o nulla attività induttiva nei roditori³⁰. Da ciò si può dedurre che, più che il promotore, è il recettore a determinare la risposta caratteristica di una certa specie all’induttore. Questa ipotesi è supportata anche da uno studio effettuato su topi “*knockout*” per PXR che, pur essendo vitali e fertili, in presenza di PCN non sono in grado di rispondere con una induzione di CYP3A. Viceversa, i topi transgenici “umanizzati”, in cui il gene per PXR è sostituito con l’omologo umano, presentano una risposta agli induttori simile a quella tipica della specie umana³¹.

Scopo della tesi

Un'alterata biotrasformazione dei farmaci, responsabile di variazioni nella risposta farmacologica, può essere causata da uno stato patologico a carico del fegato quale la cirrosi. Questa patologia può inoltre essere responsabile di una variazione dell'inibizione o dell'induzione degli enzimi metabolizzanti con conseguente modifica delle interazioni farmacologiche. Gli studi effettuati sull'uomo riguardanti il ruolo svolto dalla disfunzione epatica nel fenomeno dell'induzione enzimatica hanno portato a risultati decisamente discordanti, tanto che due rassegne su questo argomento sono giunte a conclusioni opposte: l'una riporta che "nella grave disfunzione epatica la capacità degli enzimi epatici di rispondere agli induttori enzimatici è notevolmente ridotta"³², l'altra invece conclude che "l'induzione degli enzimi che metabolizzano i farmaci non è compromessa nella cirrosi"¹⁴. Le ragioni alla base di queste due diverse conclusioni sono molteplici: differenze di riserva funzionale epatica e di tipo e grado di danno epatico nei pazienti esaminati nei diversi studi, e differenze di tipo, capacità inducente, dose e durata della somministrazione degli induttori valutati. D'altra parte, a causa di evidenti motivi etici come l'impossibilità di somministrare nell'uomo dosi ripetute di un agente induttore per motivi non terapeutici in soggetti affetti da cirrosi, studi clinici rigorosi dal punto di vista metodologico sono improponibili nell'uomo. Da qui sorge la necessità di utilizzare un modello animale di cirrosi per chiarire l'effetto della disfunzione epatica sull'induzione enzimatica.

Questo studio è stato intrapreso per valutare nel ratto l'effetto della cirrosi epatica sull'inducibilità dei CYP1A, da parte del benzo[a]pirene e, dei CYP3A, da parte del desametasone, in ratti rigorosamente stratificati in base alla gravità della disfunzione epatica. Nel tentativo di identificare il ceppo di ratto più idoneo a questa sperimentazione, è stata preventivamente paragonata l'induzione nei ratti Sprague-Dawley e Wistar sani. Ciò ha condotto a introdurre nel progetto principale una ricerca collaterale, riguardante il possibile diverso effetto del benzo[a]pirene sull'inducibilità dei CYP1A in ratti Sprague-Dawley e Wistar. Esiste in materia un solo studio in letteratura, in cui si afferma che questi due ceppi hanno una diversa suscettibilità agli induttori dei CYP1A1 e CYP1A2¹⁷, ma non è stata valutata l'induzione

ad opera del benzo[a]pirene e l'entità dell'induzione è stata valutata solo mediante la tecnica di qRT-PCR.

Per ottenere il modello di cirrosi epatica nel ratto è stato utilizzato un protocollo che prevede la somministrazione di CCl₄ per inalazione³³. Dagli animali, suddivisi in base al grado di cirrosi epatica raggiunto sono state preparate le frazioni microsomiali epatiche e su queste sono stati valutati il contenuto di CYP totale, i parametri cinetici dell'attività 7-metossiresorufina-demetilasica, *marker* del CYP1A2, dell'attività 7-etossiresorufina-deetiliasica, *marker* del CYP1A1³⁴ e dell'attività 6β-testosterone idrossilasica e di idrossilazione del midazolam, reazioni *marker* del CYP3A. Per confermare la specificità di tali attività per questi CYP ed escludere l'intervento di altre isoforme, sono stati preventivamente eseguiti studi di inibizione utilizzando l'α-naftoflavone (inibitore del CYP1A), la furafillina (inibitore del CYP1A2) e il clotrimazolo (inibitore del CYP3A)³⁵. Sono state inoltre valutate, mediante qRT-PCR e Western Blot, l'espressione genica e proteica degli enzimi CYP1A1, CYP1A2, CYP3A1, CYP3A2 e dei recettori nucleari che controllano la loro espressione: AhR per i CYP1A e PXR per i CYP3A.

Materiali e metodi

3.1 Materiali

Prodotti chimici. Il fenobarbital (Luminale[®]) è stato acquistato dalla Bracco (Milano, Italia), il ditionito di sodio, il TRIS, il cloruro di potassio, il NADPH, l'idrossido di sodio e il desametasone sono stati acquistati dalla Sigma-Aldrich Italia (Milano, Italia), l'EDTA dalla Merck (Darmstadt, Germania) e il saccarosio dalla VWR Prolabo (Milano, Italia).

La 7-metossiresorufina, la 7-etossiresorufina, la resorufina e il benzo[a]pirene sono stati acquistati dalla Fluka (Milano, Italia) e sono state disciolte in dimetilsolfossido (DMSO), ottenuto dalla ditta J.T. Baker (Deventer, Paesi Bassi). Il testosterone, il 6 β -idrossitestosterone, il midazolam e il 4-idrossimidazolam sono stati acquistati dalla Sigma-Aldrich. L'1'-idrossimidazolam è stato acquistato dalla SPIBio Bertin pharma (Montigny le Bretonneux, Francia). L'acetonitrile ad alto grado di purezza per HPLC è stato acquistato dalla Sigma-Aldrich. Il metanolo ad alto grado di purezza per HPLC è stato acquistato dalla Carlo Erba Reagenti (Milano, Italia). L'acqua ultrapura utilizzata in ogni esperimento è stata ottenuta mediante apparecchio Pure-LabOption-Q della ditta Elga Lab Water[®] (High Wycombe, UK).

Il latte in polvere, il Tween 1%, il sodiododecilsolfato (SDS) e la glicina sono stati acquistati dall'Applichem (Darmstadt, Germania). L'acrilamide (N,N'-methylenebisacrylamide 29:1 solution) al 40% è stata acquistata dalla ditta Fluka, la tetrametiletildiammina (TEMED) e il persolfato d'ammonio (APS) dalla Sigma-Aldrich. Il tampone di caricamento dei campioni per *Western blot* (GelRed 3X) proviene dalla Cell Signaling (Danvers, MA, USA). Sono state utilizzate due soluzioni di sviluppo per il *Western blot*: Luminata classic (Millipore, Billerica, MA, USA) e ECL plus (GE Healthcare, Little Chalfont, UK). I microsomi esprimenti cDNA per CYP1A1, CYP1A2, CYP3A1 o CYP3A2 di ratto ottenuti da cellule di insetto sono stati acquistati dalla BD Gentest (Woburn, MA, USA).

3.2 Ratti e loro trattamento

Le procedure che coinvolgono gli animali e la loro cura sono conformi alle linee guida istituzionali che rispettano le leggi e le politiche nazionali e internazionali (Direttiva del Consiglio della Comunità economica europea 86/609, GU L 358, 1, Dec.12, 1987; NIH Guida per la cura e l'uso di animali da laboratorio, NIH pubblicazione n. 85-23, 1985). Il disegno dello studio è stato approvato dal Comitato Etico dell'Università degli Studi di Padova per la cura e l'uso di animali da laboratorio (Prot. N. 18758 -. Marzo 26, 2010).

Ratti Sprague-Dawley

I ratti maschi *Sprague-Dawley* impiegati in questo lavoro sono stati acquistati dalla Charles River® Italia (Lecco, Italia). All'inizio della stabulazione avevano un peso compreso tra 225-250 g (età circa 8 settimane).

Trattamento dei ratti Sprague-Dawley. I ratti appena arrivati sono stati stabulati e lasciati ambientare, senza sottoporli ad alcun trattamento, per una settimana. Sono quindi stati divisi in due gruppi. Al primo gruppo (ratti di controllo) è stato somministrato per via intraperitoneale olio di semi (3mL) per 3 giorni. Al secondo gruppo (ratti indotti) è stata somministrata una soluzione oleosa di benzopirene (BaP) per via intraperitoneale alla dose di 20mg/kg (disciolti in 3 mL) per 3 giorni, al fine di indurre i CYP1A. Il quarto giorno, dopo 24 ore di digiuno, previa anestesia, gli animali sono stati sacrificati. Un'adeguata quantità di sangue è stata prelevata mediante prelievo intracardiaco e inviata al Laboratorio Centrale di Analisi dell'Azienda Ospedaliera di Padova per il dosaggio del contenuto plasmatico di albumina, e delle attività alanina-aminotransferasi (ALT) e aspartato-aminotransferasi (AST) plasmatiche. Il fegato è stato prelevato e pesato. Una porzione, destinata all'analisi istologica, è stata conservata in formalina 4%, mentre il tessuto epatico rimanente è stato lavato in una soluzione definita "tampone A" (50mM TRIS, 150mM KCl, 2mM EDTA, pH 7,4 con HCl), congelato in azoto liquido e conservato a -80 °C fino al successivo utilizzo.

Ratti Wistar

I ratti maschi *Wistar* impiegati in questo lavoro sono stati acquistati dalla Charles River®. All'inizio della stabulazione avevano un peso compreso tra 225-250 g (età circa 8 settimane). I ratti sono stati suddivisi in tre gruppi principali: animali sani, cirrotici non ascitici e cirrotici ascitici, e successivamente in ulteriori sottogruppi, a seconda dell'agente induttore utilizzato, come descritto nella Figura 6 e nella Figura 7, rispettivamente. I ratti sani sono stati stabulati, trattati e sacrificati nello stabulario del Dipartimento di Scienze del Farmaco dell'Università di Padova. I ratti destinati a sviluppare cirrosi, sono stati sottoposti a trattamento tramite inalazione di CCl₄, per un tempo variabile compreso tra 10 e 15 settimane, a seconda della risposta del singolo animale. I ratti di quest'ultimo gruppo sono stati stabulati, trattati e sacrificati nello stabulario del Centro Interdipartimentale di Chirurgia Sperimentale (Università di Padova).

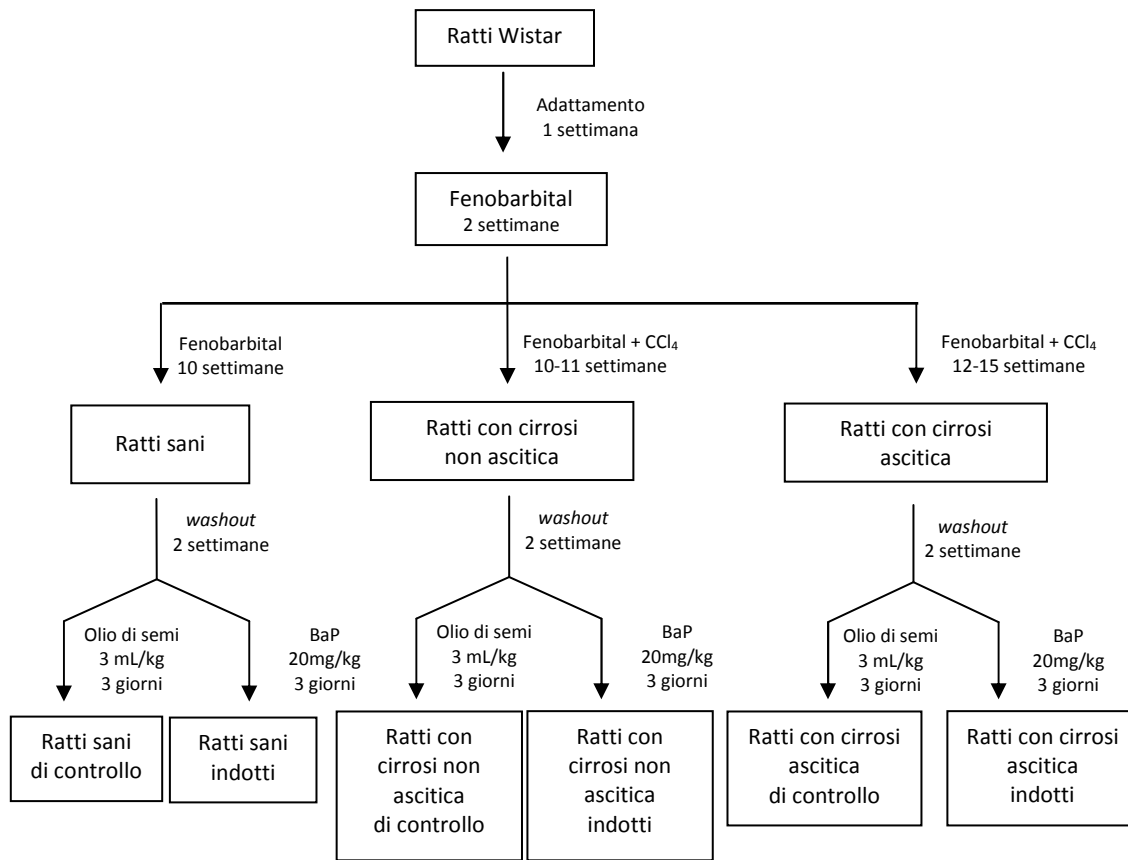


Figura 6 Schema di trattamento dei ratti dei ratti indotti con benzo[a]pirene.

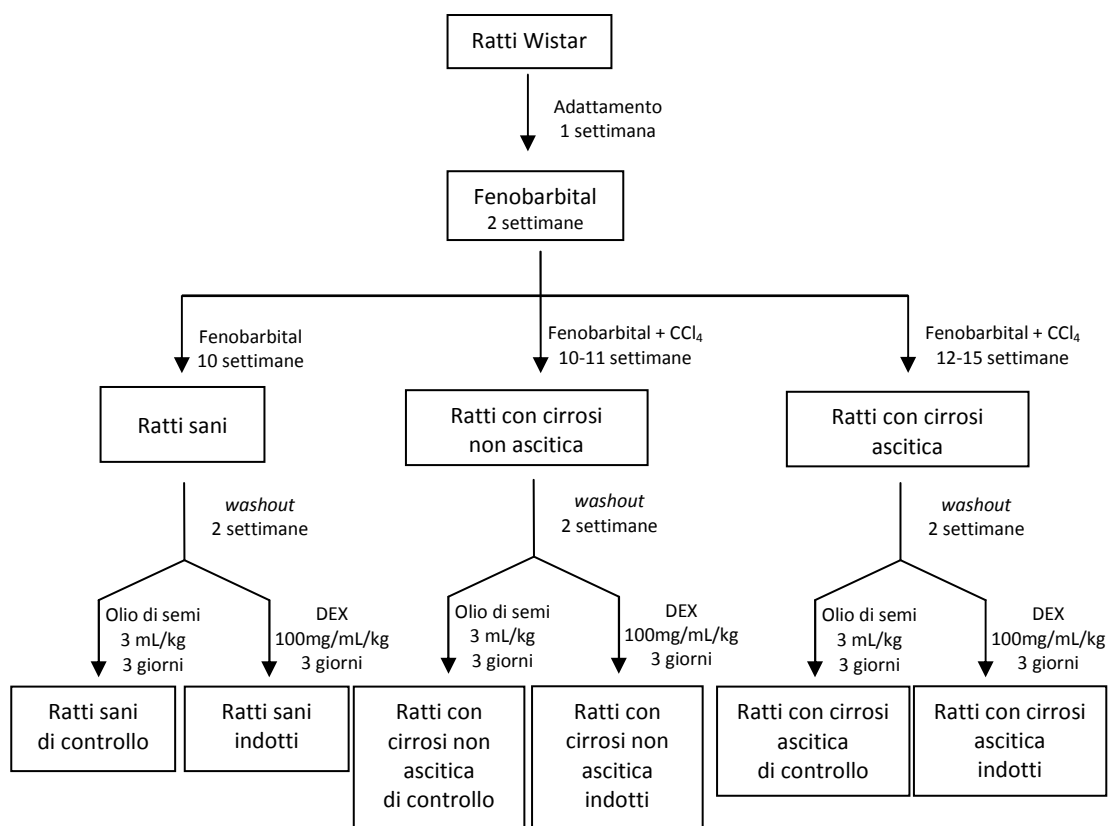


Figura 7 Schema di trattamento dei ratti dei ratti indotti con desametasone

Trattamento dei ratti sani. I ratti appena arrivati sono stati stabulati e lasciati ambientare, senza essere sottoposti ad alcun trattamento, per una settimana. Successivamente è iniziata la somministrazione di fenobarbital (PB) nell'acqua da bere in concentrazione 0,3 g/L per una durata di 10 settimane cui è seguito un periodo di *washout* di almeno 14 giorni.

Il gruppo di ratti sani di controllo è stato trattato per via intraperitoneale con olio di semi (3 mL) per 3 giorni. Al gruppo di ratti sani indotti con BaP è stata somministrata una soluzione oleosa di BaP per via intraperitoneale alla dose di 20mg/kg per 3 giorni. Al gruppo di ratti sani indotti con DEX è stato somministrato per via intraperitoneale desametasone (DEX) in olio di semi alla dose di 100mg/kg. Il quarto giorno, dopo 24 ore di digiuno, previa anestesia, gli animali sono stati sacrificati. Un'adeguata quantità di sangue è stata prelevata mediante prelievo intracardiaco e inviata al Laboratorio Centrale di Analisi dell'Azienda Ospedaliera di Padova per il dosaggio del contenuto plasmatico di albumina, e delle attività alanina-aminotransferasi

(ALT) e aspartato-aminotransferasi (AST) plasmatiche. Il fegato è stato prelevato e pesato. Una porzione, destinata all'analisi istologica, è stata conservata in formalina 4%, e il tessuto epatico rimanente è stato lavato in tampone A, congelato in azoto liquido e conservato a -80 °C fino al successivo utilizzo.

Trattamento per ottenere ratti cirrotici non ascitici (cirrotici compensati). I ratti destinati a sviluppare cirrosi compensata sono stati sottoposti, una volta stabulati, ad un periodo di adattamento per un settimana; successivamente è iniziata la somministrazione di fenobarbital nell'acqua da bere in concentrazione 0,3 g/L per una durata di due settimane. Trascorse le due settimane, è stato intrapreso il trattamento con CCl₄ per via inalatoria, due volte a settimana, continuando la somministrazione di fenobarbital, al fine di indurre la cirrosi epatica, secondo il seguente schema: i primi 3 trattamenti per 3''; poi 3 volte per 1'; 3 volte per 2'; 3 volte per 3'; 3 volte per 4' e infine per 5' fino al termine del trattamento. La somministrazione di fenobarbital aumenta la tossicità del CCl₄³³, favorendo l'insorgenza della cirrosi. L'effetto del fenobarbital è infatti dovuto all'induzione degli enzimi che generano i metaboliti reattivi del CCl₄ responsabili del danno epatico. Dopo 10-11 settimane è stato sospeso il trattamento di metà degli animali che non manifestavano alcun segno di ascite e contemporaneamente è stata interrotta anche la somministrazione di fenobarbital. Dopo un periodo di *washout* di due settimane i ratti sono stati divisi in 2 gruppi (ratti non ascitici di controllo e ratti non-ascitici indotti), e trattati, analogamente a quanto descritto nella sezione precedente, con olio di semi, BaP o DEX. In seguito all'esito degli esami di laboratorio e dell'analisi istologica è stato possibile classificare ogni singolo ratto in base alla gravità della cirrosi sviluppata.

Trattamento per ottenere ratti ascitici (cirrotici scompensati). I ratti destinati a sviluppare cirrosi scompensata sono stati sottoposti, una volta stabulati, ad un periodo di adattamento di una settimana; successivamente è iniziata la somministrazione di fenobarbital nell'acqua da bere in concentrazione 0,3 g/L per una durata di due settimane. Trascorse le due settimane, è stato intrapreso il trattamento con CCl₄ per via inalatoria, due volte a settimana, senza sospendere il fenobarbital, analogamente ai ratti cirrotici compensati. Per ottenere cirrosi scompensata i ratti sono stati trattati per 12-15 settimane, a seconda del decorso individuale della cirrosi in ciascun animale. Il trattamento con CCl₄ è stato sospeso non appena si

manifestavano segni di ascite e contemporaneamente è stata interrotta anche la somministrazione di fenobarbital. Nessun ratto è stato trattato per più di 15 settimane. Dopo un periodo di *washout* di due settimane i ratti sono stati divisi in 2 gruppi (ratti ascitici di controllo e ratti ascitici indotti), e trattati, analogamente a quanto descritto nella sezione precedente, con olio di semi, BaP o DEX. In seguito all'esito degli esami di laboratorio e dell'analisi istologica è stato possibile classificare ogni singolo ratto in base alla gravità della cirrosi sviluppata.

3.3 Esame istologico

Subito dopo l'asportazione, una porzione di fegato è stata fissata in 4% formalina tamponata neutra per 12-24 ore. Sono state preparate delle sezioni di dimensioni adeguate all'inclusione in paraffina. Da ogni blocco di paraffina almeno due sezioni di 4 micron di spessore sono stati tagliate e colorate con ematossilina-eosina e acido fucsico-acido picrico (colorazione di Van Gieson). L'esame istologico di tutte le biopsie epatiche è stato eseguito dallo stesso osservatore. Le immagini sono state ottenute per mezzo di uno scanner per diapositive Leica SCN400. Al fine di valutare il grado di danno epatico indotto dal trattamento con CCl₄, è stato adottato il punteggio Ishak, che fornisce un indice da 0 a 6 a seconda della gravità delle alterazioni cirrotiche³⁶.

3.4 Preparazione dei microsomi epatici di ratto

Una porzione di circa 6 g di fegato è stata scongelata in "tampono A" (50mM TRIS, 150mM KCl, 2mM EDTA, pH 7,4 a 4 °C) e mantenuta in ghiaccio; in seguito il fegato è stato asciugato su carta da filtro, pesato, sminuzzato e trasferito in un *potter* in cui sono stati aggiunti 3 volumi di "tampono A" prima di omogeneizzarlo con IKA T25 Ultra-Turrax *dispenser*[®] (IKA Werke GmbH & Co., Staufen im Breisgau, Germania) per 5". Sono stati aggiunti altri 2 volumi di "tampono A" ed è stato omogeneizzato con *potter* per 2 volte con rapidi passaggi. L'omogenato è stato poi trasferito in tubi Sorvall[®] per rotore GA 25-50 da 8 posti e centrifugato a 1500 x g per 10' a 4 °C con centrifuga Beckman[®] Coulter AVANTI J-20 XP; i supernatanti sono stati riuniti e centrifugati utilizzando lo stesso rotore a 12000 x g per 20' a 4 °C. I supernatanti sono stati conservati in

ghiaccio mentre il precipitato è stato lavato con circa 6 mL/tubo di tampone A, risospeso e nuovamente centrifugato nelle medesime condizioni sopra descritte. I supernatanti sono stati riuniti ai precedenti conservati in ghiaccio e sono stati suddivisi in 8-10 tubi per rotore 70Ti e centrifugati a 105000 x g per 60' a 4 °C con ultracentrifuga Beckman® L7-80; al termine è stata eliminata la porzione lipidica in superficie. I precipitati sono stati lavati con 1mL/tubo di soluzione denominata "tampone B" (150 mM KCl, 10 mM EDTA, pH 7,4 a 4 °C) e centrifugati nelle medesime condizioni prima descritte. Il supernatante è stato eliminato mentre il precipitato è stato risospeso in 1mL/tubo di saccarosio 250 mM, omogeneizzando manualmente in *potter* di vetro, e quindi trasferito in una provetta graduata; una piccola aliquota è stata destinata al dosaggio proteico con il metodo dell'acido bicinconinico allo scopo di stabilire la quantità di soluzione di saccarosio 250 mM da aggiungere alle proteine per ottenere una concentrazione proteica finale di 20 mg/mL. La soluzione microsomiale ottenuta è stata aliquotata in tubi Eppendorf® da 1,5 mL, e le aliquote congelate con azoto liquido prima di essere conservate a -80°C.

3.5 Preparazione degli estratti proteici totali di fegato di ratto

Per valutare l'espressione dei recettori nucleari AhR, PXR e CAR nel fegato dei ratti esaminati sono stati preparati degli omogenati totali di fegato, in quanto questi recettori sono presenti nel citoplasma e nel nucleo. A questo scopo, una porzione di tessuto epatico di circa 0,2 g, è stata scongelata in un tampone di lisi RIPA modificato, composto da 25 mM Tris-HCl (pH 7,4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton-X-100, 1% sodio deossicolato, 0,1% SDS addizionato con un cocktail di inibitori di proteasi (*Complete Protease Inhibitor Cocktail*, Roche, Milano, Italia) e successivamente omogeneizzata con IKA T25 Ultra-Turrax *dispenser* in 10 volumi (peso/volume) dello stesso tampone di lisi. L'omogenato così ottenuto è stato centrifugato a 4°C per 15 minuti a 250 x g. Il supernatante è stato raccolto e centrifugato a 4°C per 5 minuti a 2200 x g. La concentrazione proteica dell'estratto così ottenuto è stata determinata attraverso il metodo dell'acido bicinconinico. L'estratto ottenuto è stata aliquotato in tubi Eppendorf® da 1,5 mL, congelato con azoto liquido e conservato a -80°C.

3.6 *Dosaggio proteico con metodo dell'acido bicinconinico*

Per la determinazione del contenuto proteico è stato utilizzato il saggio dell'acido bicinconinico³⁷ utilizzando il *BCA Assay Kit* (Novagen). La determinazione si basa sulla riduzione, in ambiente alcalino, degli ioni Cu^{2+} a Cu^+ , in seguito alla formazione di complessi con i legami peptidici delle proteine. L'acido bicinconinico si lega in modo altamente sensibile, stabile e specifico con il Cu^+ , formando un composto violetto che ha un massimo di assorbimento a 562 nm.

Le sospensioni di microsomi sono state diluite 1:80 con KH_2PO_4 0,1 M (pH 7.4), mentre gli omogenati totali di tessuto sono stati diluiti 1:100 con KH_2PO_4 0,1 M (pH 7.4). La soluzione di reazione "*Working Reagent*" (WR) era costituita da 100 parti di BCA e 2 parti di CuSO_4 . In ogni provetta sono stati aggiunti 50 μL di campione a 1 mL di WR, incubando per 30' a 37° C. Dopo 9 minuti dalla fine dell'incubazione è stata letta l'assorbanza a 562nm. Per ogni campione le prove sono state eseguite in doppio. E' stato utilizzato uno spettrofotometro Beckman Coulter® DU-800. La concentrazione proteica è stata calcolata tramite regressione lineare da una retta di taratura, costruita utilizzando campioni di albumina di siero bovino (BSA) a concentrazione nota, fornita nel kit.

3.7 *Dosaggio del CYP450 totale*

La determinazione del contenuto totale di citocromo P450 è stata eseguita utilizzando il metodo spettrofotometrico di Omura e Sato³. I microsomi sono stati diluiti con 0,1M KH_2PO_4 (pH=7,4), fino ad una concentrazione di 3 mg/mL. Al campione è stata aggiunta una piccola quantità di ditionito di sodio, reagente in grado di ridurre il Fe^{3+} presente nel CYP a Fe^{2+} . Dopo 2 minuti, il campione è stato suddiviso in 2 cuvette di vetro (cammino ottico 1 cm): la prima era utilizzata come "bianco", mentre nella seconda cuvetta è stato fatto gorgogliare per 1 minuto monossido di carbonio (CO). È stata eseguita una lettura continua dell'assorbanza tra 400 e 600 nm mediante lo spettrofotometro Beckman Coulter DU-800. Lo spettro registrato presenta un picco di assorbimento caratteristico del CYP a 450 nm. In base alla legge di Lambert-

Beer, è possibile calcolare la concentrazione di CYP totale presente nella frazione microsomiale (espressa in nmoli CYP/mg proteine totali), mediante la seguente formula:

$$c = \frac{\Delta Abs}{\epsilon * mg\ proteine}$$

dove $\Delta Abs = [Abs(450\text{ nm}) - Abs(490\text{ nm})]$ ed ϵ rappresenta il coefficiente di estinzione molare del CYP, pari a $91\text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.

3.8 Quantificazione dell'espressione genica di CYP1A1, CYP1A2 e AhR mediante qRT-PCR

L'RNA totale è stato isolato dai campioni di fegato con il reagente TRIZOL secondo le indicazioni del produttore. L'integrità e la quantità dell'RNA sono state determinate mediante un saggio "RNA 6000 Nano" in un BioAnalyser (Agilent Technologies Inc. Palo Alto, CA, USA). La trascrizione inversa (*reverse transcription*, RT) è stata eseguita mediante trascrittasi inversa Superscript III con oligonucleotidi *random* (Invitrogen, Life Technologies) utilizzando 250 ng di RNA totale per ogni reazione. La quantità di RNA ottenuto è stata misurata tramite NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific).

La quantificazione dell'mRNA è stata eseguita tramite una metodica di qRT-PCR che permette di identificare gli specifici mRNA presenti nel campione e di valutarne l'espressione in rapporto a quella di uno standard appositamente scelto. Per l'analisi di CYP1A1, CYP1A2 e AhR è stato usato un kit commerciale specificamente dedicato e un termociclatore 3000 MX (Agilent Technologies, Milano, Italia). In un volume finale di 10 μL venivano miscelati 0,5 μL di cDNA con 100 nM di *primer forward* e *reverse* del gene in esame (Tabella 1) e il reagente SYBRGreen JumpStart TAq ReadyMix (Sigma-Aldrich). Le reazioni sono state svolte in duplicato su piastre da 96 pozzetti (Axygen BioScience, Inc. Union City, CA, USA). Dopo un'iniziale fase di denaturazione di 4 min a 94° C, le amplificazioni sono state eseguite mediante 40 ripetizioni di un ciclo di denaturazione a 94° C per 30 s, più un ciclo di *annealing* a 60° C per 30 s, ed un ciclo di estensione a 72° C per 30s.

Tabella 1 La tabella mostra i geni di ratto analizzati, le sequenze dei *forward primer* e dei *reverse primer*, le sequenze di riferimento e il numero delle paia di basi amplificate

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse Primer (5'-3')	Size (bp)
CYP1A1	CCCACAGGAACCTCAGATCC	TCTCCCTCCATTCTGGGCTA	202
CYP1A2	TCTGCAGAAAACAGTCCAGGAACA	CTGAGGGATGAGACCACCGTTGT	120
AhR	CGGCAGATGCCTTGGTCTTCTATGC	TGGAACTCAGCTCGGTCTTCTGTATGG	124
β actina	CCCCATTGAACACGGCATTGTCA	ACCCTCATAGATGGGCACAGTGT	297

La procedura è stata seguita da un profilo di dissociazione termica a 94° C per 1 min, a 55° C per 30s, e infine a 95° C per 30s. La quantità di ciascun prodotto genico è stata calcolata mediante regressione lineare di curve *standard* con amplificazioni di efficienza variabile dal 90 al 100%. La quantificazione relativa dell'espressione dei geni di CYP1A1, CYP1A2 e AhR è stata ottenuta utilizzando la β -actina come *housekeeping gene*. I risultati sono stati riportati come rapporto tra l'mRNA del gene di interesse e quello della β -actina e normalizzati per la media dei ratti sani di controllo.

3.9 Quantificazione dell'espressione genica di CYP3A1, CYP3A2 e PXR mediante qRT-PCR

L'RNA totale è stato estratto dai campioni di fegato congelato con il kit SV Total Isolation System (Promega Corporation, Madison, WI). La procedura prevede di omogenare con un Ultraturrax® 0,2 g di fegato con il buffer di lisi (SV RNA Lysis Buffer) fornito nel kit. L'omogenato ottenuto è stato estratto in eppendorf aggiungendo la soluzione SV RNA Dilution Solution, è stato scaldato a 70°C per 3' e successivamente centrifugato a 13000 x g per 11'. Il supernatante è stato lavato con etanolo al 95%, trasferito nelle colonnine per estrazione e quindi centrifugato a 13000 x g per 2'. Il precipitato è stato lavato due volte con la soluzione di lavaggio (SV RNA Wash Solution) e centrifugato a 13000 x g per 2'. A questo punto è stata aggiunta nella colonnina una soluzione contenente DNAasi, che idrolizza ed elimina i possibili frammenti di DNA che possono contaminare il campione interferendo con la metodica di amplificazione. La DNAasi è stata fatta agire per 15' a temperatura ambiente e ne è stata quindi bloccata l'attività con un'opportuna soluzione (SV RNA Stop Solution). L'RNA purificato

è stato eluito dalla colonnina con acqua sterile e priva di nucleasi (SV RNA Nuclease Free Water) centrifugando la colonnina a 13000 x g per 3'. La quantità di RNA ottenuta è stata misurata tramite NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific). L'RNA è stato congelato e conservato a -80 °C. È stato quindi retrotrascritto a cDNA con il kit ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega Corporation, Madison, WI) seguendo il protocollo fornito dal produttore. Come controllo negativo sono stati trattati alcuni campioni di RNA in assenza di trascrittasi inversa. La soluzione di reazione (MIX) è stata preparata in ghiaccio miscelando per ogni prova in provetta eppendorf sterile le soluzioni fornite nel kit secondo il seguente schema: 4 µL di ImProm-II™ 5X Reaction Buffer, 2,4 µL di MgCl₂, 1 µL di dNTP Mix, 1 µL di Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor, 1 µL di ImProm-II™ Reverse Transcriptase e 5,6 µL di Nuclease-Free Water. A questa soluzione sono stati aggiunti 5 µL di campione preparato miscelando: 1 µL di *random primer*, 2 µL di Nuclease-Free Water e 2 µL di RNA (precedentemente diluito in acqua alla concentrazione di 250 ng/µL). La retrotrascrizione è stata effettuata con uno *step* di *annealing* a 25°C per 5', seguito da uno *step* di estensione a 42 °C per 60' e uno *step* finale di 70 °C per 15'. Il cDNA prodotto è stato quindi congelato e conservato a -20 °C.

La qRT-PCR è stata eseguita usando i *primer* riportati in Tabella 2 e un kit iQ™ SYBR® Green Supermix (BioRad). In ogni pozzetto di una piastra da 96, sono stati caricati 25 µL di miscela di reazione unendo i vari componenti come di seguito riportato: 12,5 µL di iQ™ SYBR® Green supermix (2x), 1 µL di forward primer, 1 µL di reverse primer, 9,5 µL di acqua sterile e, da ultimo, 1 µL di cDNA (precedentemente diluito in acqua sterile a 15 ng/µL). I primer utilizzati sono riportati in Tabella 2 e sono stati acquistati dalla Sigma-Aldrich.

Tabella 2 La tabella mostra i geni di ratto analizzati, le sequenze dei *forward primer* e dei *reverse primer*, le sequenze di riferimento e il numero delle paia di basi amplificate

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse Primer (5'-3')	RefSeq	Dimensione (bp)
CYP3A1	CCATCACGGACACAGAAATG	CTTTCCCCATAATCCCCACT	NM013105	102
CYP3A2	AGTGGGGATTATGGGGAAAG	CAATGATGGGGGAACATCTCC	NM153312	119
PXR	CAAATCTGCCGTGTATGTGG	GTTTCATGGCCCTTCTGAAA	NM052980	97
βactina	GCCACCAGTTCGCCATGGA	TTCTGACCCATACCCACCAT	NM031144	163

Le reazioni di amplificazione sono state condotte in un termociclatore I-Cycler iQ system (BioRad Laboratories, Milano, Italia) secondo il seguente schema: uno *step* di denaturazione a 95°C per 3 minuti, 40 cicli di due *step* di amplificazione (95° C per 15 secondi e l'estensione di annealing a 60°C per 30 sec) e una curva di dissociazione (Melting Curve) che misura la fluorescenza all'aumentare della temperatura (60-90° C con un aumento di riscaldamento di 0,5°C/10 secondi).

Durante la fase esponenziale della reazione è stato misurato il segnale soglia della fluorescenza e, mediante analisi delle curve, è stato determinato il numero di cicli di PCR necessari a ciascun campione per raggiungere il ciclo soglia (Cycle threshold, Ct). I valori di Ct diminuiscono in modo lineare all'aumentare della quantità di mRNA e vengono quindi usati per calcolare l'espressione relativa dell'mRNA. Questa è stata stimata utilizzando il modello matematico di quantificazione proposto da Pfaffl³⁸. Tutti i campioni sono stati analizzati in doppio e come *housekeeping gene* per normalizzare i dati è stata usata la β actina. Al termine di ogni ciclo di qRT-PCR è stata valutata la specificità dell'amplificazione attraverso l'analisi della curva di dissociazione (Melting Curve Analysis) usando I-Cycler software 3.0. È stata calcolata la variazione dell'espressione di mRNA dei geni d'interesse rispetto ai sani di controllo, cui è stato arbitrariamente attribuito il valore 1.

3.10 Valutazione dell'espressione di CYP1A1 e CYP1A2 in preparazioni di microsomi epatici di ratto mediante Western blot

Per valutare l'espressione di CYP1A1 e CYP1A2 nei gruppi di animali di controllo e indotti con BaP sono stati effettuati degli esperimenti di *Western blot* utilizzando gel di poliacrilammide al 10% preparati al momento dell'uso come descritto nella Tabella 3.

Tabella 3 Schema della composizione del gel al 10% di poliacrilammide.

	Running gel (10%)	Stacking gel (5%)
Tris HCl 1 M (pH 8,8)	40 %	-
Tris HCl 1 M (pH 6,8)	-	25 %
SDS al 20%	0,05 %	1 %
Acrilamide al 40%	10 %	4,5 %
TEMED	0,1 %	0,1 %
Ammonio persolfato al 10%	1 %	1 %
H ₂ O ultrapura	48,85 %	68,4 %

I campioni sono stati preparati diluendo con tampone KH₂PO₄ 0,1 M (pH 7.4) i microsomi, in modo da caricare, per ciascun pozzetto, 10 µg di proteine microsomiali provenienti da ratti non indotti e 0,5 µg per i ratti trattati con BaP. Come controlli positivi sono stati caricati microsomi d'insetto esprimenti CYP1A1 o CYP1A2 di ratto ricombinanti in quantità pari a 0,2 pmoli per il CYP1A1 e 0,5 pmoli per il CYP1A2 per ciascun pozzetto.

Ogni campione è stato poi diluito 1:3 con GelRed, un *buffer* di caricamento contenente ditionitrotolo (DTT) che rompe i ponti disolfuro delle proteine, denaturandole. Per promuovere la denaturazione delle proteine, i campioni sono stati riscaldati per 5 minuti a 95°C. In ogni pozzetto sono stati caricati 15 µL di campione. Per seguire l'andamento della corsa elettroforetica, in ogni gel è stato caricato il *marker PageRuler Prestained Protein Ladder* (Thermo Fisher) che contiene una serie di bande proteiche colorate comprese tra i 170 kDa e i 10 kDa). I pesi molecolari di CYP1A2 e CYP1A1 sono rispettivamente 54 kDa e 58 kDa.

La corsa elettroforetica è stata condotta per 15 minuti a 100 V, 2 ore a 120 V e infine 2 ore a 150 V. Come tampone per la corsa elettroforetica è stata usata una soluzione di TRIS 25 mM, glicina 250 mM e 0,1% di SDS al 20%.

Al termine della corsa è stato effettuato il trasferimento (*blotting*) delle proteine dal gel a una membrana di nitrocellulosa (GE Healthcare GmbH, Milano, Italia), utilizzando un amperaggio costante di 250 mA per 90 minuti e un tampone di trasferimento, costituito da TRIS 25 mM e glicina 192 mM.

Per saturare i siti aspecifici di legame, al termine del trasferimento, la membrana è stata incubata per 60 minuti con una soluzione al 10% di latte in polvere (*Skim Milk Powder*, Sigma Aldrich) sciolto in una soluzione TBS costituita da TRIS 10 mM, NaCl 0,15 M e 0,1% Tween. Dopo tre lavaggi da 10 minuti ciascuno con TBS, la membrana è stata incubata per una notte a 4°C con un anticorpo primario monoclonale di topo anti-CYP1A ottenuto dall'Abcam (Cambridge, UK), diluito 1:2000 in soluzione di latte al 5% in TBS, che lega entrambe le isoforme di CYP1A. Al termine dell'incubazione e dopo tre lavaggi, la membrana è stata incubata per 90 minuti a temperatura ambiente con un anticorpo secondario policlonale anti-topo coniugato con perossidasi di rafano (*horse radish peroxidase*, HRP) ottenuto dall'Abcam (diluito 1:2000 in latte al 5% in T-BST). Al termine dell'incubazione è stata fatta agire la soluzione di sviluppo ECLplus (GE Healthcare GmbH) per 5 minuti ed è stata acquisita l'immagine tramite lo strumento VersaDoc MP4000 (BioRad).

3.11 Valutazione dell'espressione proteica di CYP3A1 e CYP3A2 in preparazioni di microsomi epatici di ratto mediante Western Blot

Per valutare l'espressione di CYP3A1 e CYP3A2 nei gruppi di animali di controllo e indotti con DEX sono stati effettuati *Western blot* utilizzando gel di poliacrilammide al 10% preparati al momento dell'uso come descritto nella Tabella 3.

Le frazioni microsomiali sono state diluite con tampone fosfato 0,1 M KH_2PO_4 , in modo da ottenere una concentrazione di 20 μg di proteine da caricare in ogni pozzetto. Come controlli positivi sono stati utilizzati microsomi d'insetto esprimenti selettivamente CYP3A1 o CYP3A2 di ratto ricombinanti; essi sono stati caricati in quantità pari a 0,125 pmoli.

Le frazioni microsomiali e i microsomi ricombinanti sono stati diluiti 1:2 con il tampone di caricamento Laemli buffer 2X, che denatura le proteine rompendone i ponti disolfuro, grazie al β -mercaptoetanolo presente. Per promuovere ulteriormente la denaturazione delle proteine, i campioni sono stati sottoposti a riscaldamento per 5 minuti a 95°C. Sono stati caricati 20 μL di campione in ogni pozzetto. Per seguire l'andamento della corsa elettroforetica in un pozzetto sono stati caricati 5 μL di *marker PageRuler Prestained Protein Ladder* (Thermo Fisher). La

corsa elettroforetica è stata condotta per 15 minuti a 100 V e per 90 minuti a 150 V in un litro di tampone per la corsa, costituito da 25 mM TRIS, 250 mM glicina e 0,1% di SDS al 20%.

Al termine della corsa è stato operato il trasferimento delle proteine dai gel alle membrane di nitrocellulosa, utilizzando un amperaggio costante di 250 mA per 90 minuti. Il tampone di trasferimento era costituito da 25 mM TRIS e 192 mM glicina. Al termine del trasferimento le membrane sono state incubate per un'ora con latte in polvere al 10% disciolto in una soluzione costituita da 10 mM TRIS, 0,15 M NaCl e 0,1% Tween (TBS), in modo da saturare i siti aspecifici di legame. Dopo tre lavaggi da 10 minuti ciascuno con TBS, le membrane sono state incubate per una notte a 4° C con i rispettivi anticorpi primari. Per il CYP3A1 è stato usato un anticorpo anti-CYP3A1 policlonale di coniglio (diluito 1:4000 in latte al 5% in TBS), mentre per il CYP3A2 un anticorpo anti-CYP3A2 policlonale di pecora (diluito 1:2000 in latte al 5% in TBS), entrambi acquistati dalla ditta Abcam. Al termine dell'incubazione e dopo tre lavaggi con TBS, le membrane sono state incubate per 90 minuti a temperatura ambiente con gli anticorpi secondari specifici per ciascun anticorpo primario. Sono stati usati un anticorpo policlonale anti-coniglio e un anticorpo policlonale anti-pecora coniugati con HRP, diluiti 1:5000 in latte al 5% in TBS. Al termine dell'incubazione e dopo tre lavaggi con TBS da 10 minuti ciascuno, è stata fatta agire la soluzione di sviluppo Luminata classic (Millipore, Billerica, MA, USA) per 5 minuti, allo scadere dei quali, con lo strumento VersaDoc MP4000 (BioRad), è stato possibile visualizzare sulle membrane le bande corrispondenti alle proteine d'interesse.

3.12 Valutazione dell'espressione di AhR in omogenati totali di fegato di ratto

L'espressione di AhR è stata valutata tramite *Western Blot*, utilizzando gel di poliaccrilammide al 10% e caricando 60 µg di estratto totale di fegato, come precedentemente descritto. Sono stati utilizzati un anticorpo primario monoclonale di topo anti-AhR e un anticorpo secondario policlonale anti-topo coniugato HRP, entrambi acquistati dall'Abcam. Dato che non era commercialmente disponibile un campione di AhR ricombinante, l'intensità del segnale di AhR è stato normalizzato rispetto all'intensità del segnale della banda relativa alla β-actina, identificata attraverso un anticorpo primario monoclonale di topo anti-β-actina

(Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) diluito 1:2000 in latte al 5% in TBS e un secondario anti-topo coniugato con HRP, diluito 1:2000 in latte al 5% in TBS. I risultati della quantificazione proteica sono stati riportati come variazione rispetto ai ratti sani di controllo.

3.13 Valutazione dell'espressione proteica del recettore PXR mediante Western Blot

L'espressione di PXR è stata valutata tramite *Western Blot*, utilizzando gel di poliacrilammide al 10% e caricando 60 µg di estratto totale di fegato, come precedentemente descritto. Sono stati utilizzati un anticorpo primario policlonale di topo anti-PXR (diluito 1:400 in latte al 5% in TBS) e un anticorpo secondario anti-topo (diluito 1:2000 in latte al 5% in TBS), entrambi della ditta Abcam. L'intensità del segnale della banda del PXR è stata normalizzata rispetto all'intensità del segnale della banda relativa alla β-actina, identificata attraverso un opportuno anticorpo anti-β-actina, come descritto precedentemente. I risultati sono stati riportati come variazione dell'espressione proteica rispetto ai ratti sani di controllo.

3.14 Valutazione dell'attività del CYP1A1 e del CYP1A2 in preparazioni microsomiali epatiche di ratto

Per valutare l'attività delle due isoforme di CYP1A nelle frazioni microsomiali dei ratti di controllo e indotti con BaP sono state utilizzate l'attività 7-etossiresorufina-O-deetilasi (EROD) e l'attività 7-metossiresorufina-O-demetilasi (MROD), come reazione *marker* del CYP1A1 e del CYP1A2, rispettivamente³⁴.

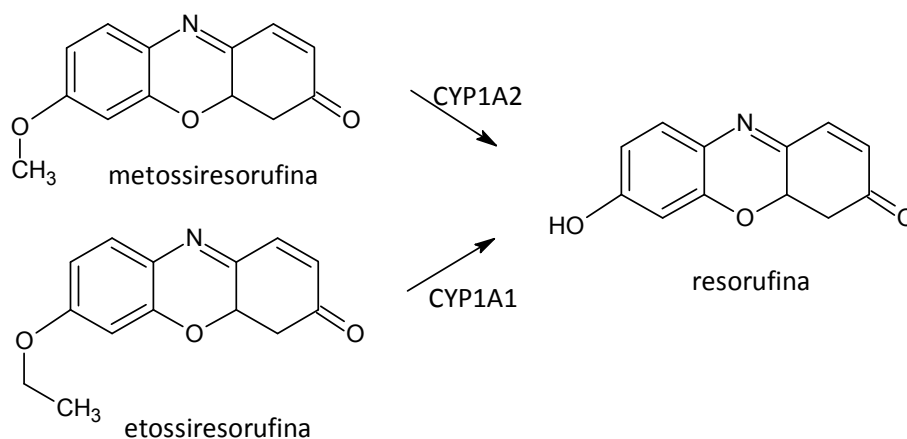


Figura 8 Reazioni marker di CYP1A1 (deetilazione dell'7-etossiresorufina) e di CYP1A2 (demetilazione della 7-metossiresorufina).

Studi di linearità. Per eseguire correttamente uno studio cinetico è fondamentale valutare il tempo d'incubazione e la concentrazione di proteine microsomiali da impiegare per operare in condizioni di linearità. Utilizzando la concentrazione minima di substrato usata negli studi cinetici (7-etossiresorufina Et-Res 0,1 μ M o 7-metossiresorufina Me-Res 0,1 μ M), sono state fatte delle prove variando la quantità di proteine microsomiali utilizzate (tra 0,5 e 100 μ g) e il tempo d'incubazione (5, 10 o 20 minuti), e miscelando le varie componenti di reazione come riportato nella Tabella 4. Nel mezzo d'incubazione (avente volume di 400 μ L) venivano miscelati KH_2PO_4 0,2 M (pH 7,4), Et-Res o Me-Res 1 mM, microsomi e acqua. Dopo una preincubazione di 3 minuti a 37 °C per raggiungere la temperatura ottimale, è stato aggiunto il NADPH per innescare la reazione, che è stata bloccata con metanolo freddo dopo 5, 10 o 20 minuti.

Tabella 4 Schema dei componenti di reazione per gli studi di linearità

	Mezzo d'incubazione	Tempo (min)
KH_2PO_4 0,2 M (pH 7,4)	200 μ L	0
Et-Res o Me-Res 1 mM	2 μ L	0
microsomi (variabili)	5 μ L	0
H_2O ultrapura	143 μ L	0
NADPH 4 mM	50 μ L	3
metanolo freddo	200 μ L	5-20

I campioni sono stati sottoposti a centrifugazione per 10 minuti a 20000 xg (Beckman Coulter, rotore JA25.15) a 4 °C, i supernatanti prelevati ed analizzati mediante HPLC.

Studi cinetici. Per analizzare la cinetica di formazione della resorufina ad opera dell'attività EROD legata al CYP1A1 o dell'attività MROD legata al CYP1A2, sono state utilizzate concentrazioni crescenti di 7-etossiresorufina o 7-metossiresorufina (comprese tra 0,1 µM e 5 mM, n=7), seguendo lo schema precedentemente descritto in dettaglio e riportato nella Tabella 5 per ogni campione.

Tabella 5 Schema dei componenti di reazione per gli studi cinetici.

	<i>Mezzo d'incubazione</i>	<i>Tempo (min)</i>
KH ₂ PO ₄ 0,2 M (pH 7.4)	200 µL	0
diluizione Et-Res o Me-Res	2 µL	0
diluizione microsomi	5 µL	0
H ₂ O ultrapura	143 µL	0
NADPH 4 mM	50 µL	3
MeOH freddo	200 µL	5 o 10

Per l'attività EROD il tempo d'incubazione era di 5 minuti e per ogni prova venivano utilizzati da 10 µg a 100 µg di proteine microsomiali per i ratti di controllo e da 0,4 µg a 0,6 µg per i ratti indotti con BaP. Per l'attività MROD il tempo d'incubazione era di 10 minuti e per ogni prova venivano utilizzati da 40 µg a 100 µg di proteine microsomiali per i ratti di controllo e 5 µg per i ratti indotti con BaP.

I campioni venivano centrifugati a 20000 xg per 10 minuti (Beckman Coulter). I supernatanti erano prelevati e analizzati mediante HPLC.

Studi d'inibizione. L'effetto inibitorio dell' α -naftoflavone e della furafillina sulle attività EROD e MROD è stato valutato sui microsomi miscelati dei ratti sani, sia di controllo che indotti con BaP, opportunamente diluiti con tampone fosfato KH₂PO₄ 0,1 M. Per i gruppi di ratti di controllo sono stati utilizzati 10 µg e 40 µg di proteine microsomiali per ogni prova per l'EROD e l'MROD rispettivamente, mentre per i ratti indotti con BaP 0,6 µg e 5 µg. I tempi di reazione erano gli stessi degli studi cinetici. L'inibitore è stato diluito in acetonitrile e sono state

utilizzate concentrazioni crescenti di α -naftoflavone (da 1 a 1000 nM) o furafillina (da 2 a 150 μ M) mantenendo costante la concentrazione di 7-etossiresorufina (1 μ M per i ratti non indotti e 0,2 μ M per quelli indotti con BaP) e 7-metossiresorufina (0,25 μ M per ambedue i gruppi di ratti). Le prove sono state condotte seguendo le modalità descritte precedentemente per gli studi cinetici. Per gli esperimenti con la furafillina, l'inibitore veniva preincubato con i microsomi e il NADPH per 15 minuti a 37 °C, prima dell'aggiunta del substrato, poiché la furafillina si lega al CYP1A2 solo dopo essere stato chimicamente modificata dal citocromo.

Analisi HPLC. La strumentazione HPLC utilizzata è costituita da un sistema Shimadzu LC-20AT (Shimadzu, Japan) composto da una pompa dotata di degasatore (DGU-20A3), un autocampionatore (SIL-10AD), un comparto termostato (Varian Metatherm), un rivelatore UV (SPD-20AV) e un rivelatore fluorimetrico (RF-20A). Il software utilizzato per l'acquisizione dei dati è LC solution (Shimadzu, Japan). La separazione cromatografica è stata condotta utilizzando una colonna Nova-Pak C18, 3,9 x 150 mm, 4 μ m (Waters). La fase mobile era costituita da KH_2PO_4 10 mM (pH 7) (A) e metanolo (B), con il programma di analisi a flusso costante di 0,8 mL/min riportato nella Tabella 6.

Tabella 6 Programma del gradiente di eluizione per la quantificazione della resorufina.

<i>Tempo (min)</i>	<i>A (%)</i>	<i>B (%)</i>
0	60	40
3	60	40
13	20	80

Il volume d'iniezione era di 60 μ L. Le lunghezze d'onda di eccitazione e di emissione del fluorimetro erano rispettivamente 576 e 580 nm. Il tempo di ritenzione della resorufina era di 2,5 min. La quantità di resorufina prodotta è stata quantificata mediante regressione lineare dell'area del picco della resorufina. Per quantificare la resorufina, è stata costruita una retta di taratura utilizzando quantità crescenti di resorufina comprese tra 0,0025 nmoli e 0,08 nmoli in 400 μ L di KH_2PO_4 0,2 M (pH 7,4) (n=10).

Analisi dei dati. Per l'analisi dei dati ottenuti è stato utilizzato il software Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA). I parametri cinetici della formazione di resorufina catalizzata dai microsomi epatici sono stati valutati con procedure di *best-fit*. È stato utilizzato

l’F-test per valutare quale fosse il modello cinetico (iperbolico di Michaelis-Menten a uno- o a due-siti o cinetica di Michaelis-Menten con inibizione da substrato) che descrivesse meglio i dati sperimentali ottenuti. Sono stati calcolati i parametri cinetici V_{max} (velocità massima della reazione), K_m (concentrazione di substrato in grado di produrre il 50% della V_{max}) e CL_{int} (clearance intrinseca, valutata come V_{max}/K_m e quindi espressa in $\mu\text{L}/\text{mg}$ proteine/min). Tutti i risultati sono riportati come medie \pm D.S.

L’analisi statistica dei dati di attività è stata eseguita mediante il software Prism 5.0. Sono stati eseguiti *t-test* non appaiati per confrontare i ratti indotti e non indotti dello stesso gruppo (sani, affetti da cirrosi non ascitica o affetti da cirrosi ascitica) e analisi della varianza a una via (ANOVA) seguite dal test di Newman-Keuls, per confrontare i tre gruppi di ratti indotti con i tre gruppi di ratti trattati con il veicolo (olio di semi).

3.15 Valutazione dell’attività 6 β -idrossitestosterone idrossilasica in preparazioni di microsomi epatici di ratto

Sulle frazioni microsomiali di tutti gli animali di controllo e indotti con DEX, sono stati eseguiti studi cinetici per valutare l’attività 6 β -idrossitestosterone-idrossilasica, reazione *marker* dell’attività di CYP3A1 e CYP3A2. L’attività dei CYP è stata valutata in base alla formazione del prodotto 6 β -idrossitestosterone.

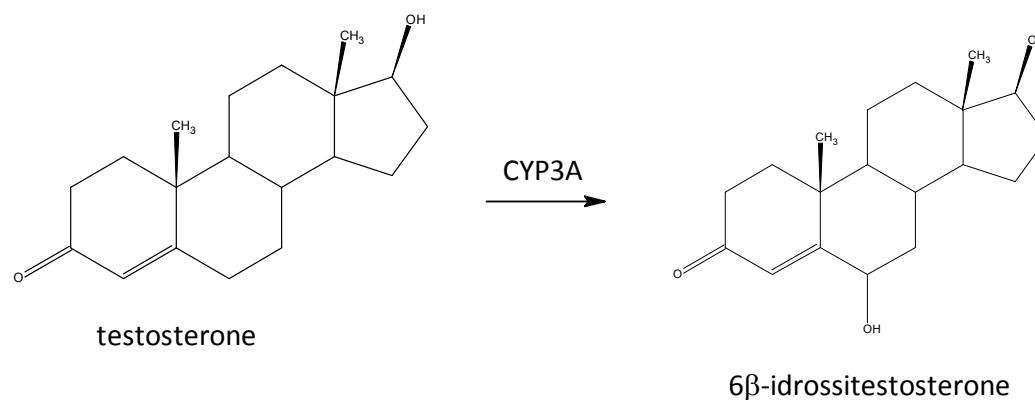


Figura 9 Reazione di idrossilazione del testosterone in posizione 6 β catalizzata dal CYP3A.

Studi di linearità. Per operare in condizioni di linearità in uno studio cinetico è fondamentale valutare il tempo d'incubazione e la concentrazione di proteine microsomiali da impiegare. A tal fine sono stati eseguiti studi preliminari in cui venivano eseguite prove variando la quantità di proteine utilizzate e il tempo di incubazione. Quantità crescenti di proteine (tra 0,5 pmoli e 2 pmoli per i microsomi esperimenti CYP3A1 e CYP3A2 ricombinanti, tra 25 µg e 100 µg per i microsomi da ratti non indotti e tra 2 µg e 10 µg per i trattati con DEX) sono state incubate a 37° C per tempi diversi (3, 5 e 10 minuti) in presenza di 5 µM testosterone in un mezzo costituito da 0,1 M KH₂PO₄ (pH 7,4). La reazione metabolica è stata iniziata mediante l'aggiunta del cofattore, 0,5 mM NADPH, e bloccata, alla fine del tempo di incubazione, con 100 µL di acetonitrile freddo. I campioni sono stati sottoposti a centrifugazione per 10 minuti a 20000 xg (Beckman Coulter), i supernatanti prelevati ed analizzati mediante metodica HPLC.

Studi cinetici. Per analizzare la cinetica di formazione del 6β-idrossitestosterone ad opera dei CYP3A1 e CYP3A2, concentrazioni crescenti di testosterone (comprese tra 5 µM e 800 µM) sono state incubate, in un volume totale di 200 µL con 0,1 M KH₂PO₄, con la quantità di proteine microsomiali ritenuta più adatta sulla base degli studi di linearità descritti sopra. Per i microsomi esperimenti CYP3A1 ricombinante sono state utilizzate 0,5 pmoli di proteine microsomiali, mentre per i microsomi esperimenti CYP3A2 ricombinante è stata utilizzata 1 pmole di proteine microsomiali. Per i gruppi di ratti non indotti sono stati utilizzati 25 µg di proteine microsomiali, mentre per i ratti indotti con DEX 2 µg. La reazione veniva iniziata per aggiunta di 0,5 mM NADPH e fatta procedere per il tempo di incubazione più opportuno seguendo lo schema precedentemente descritto in dettaglio per le attività EROD e MROD. Il tempo di incubazione era di 3 minuti per i microsomi esperimenti CYP3A2 ricombinante e i ratti trattati con olio e 5 minuti per i microsomi esperimenti CYP3A1 ricombinante e per i ratti indotti con DEX. Al termine dell'incubazione, la reazione veniva bloccata con 100 µL di acetonitrile freddo, come descritto nella Tabella 7.

Tabella 7 Schema dei componenti di reazione per gli studi di attività 6 β -idrossitestosterone-idrossilasica.

	Mezzo d'incubazione	Tempo (min)
KH ₂ PO ₄ 0,2 M (pH 7,4)	100 μ L	0
diluizione TST	2 μ L	0
diluizione microsomi	10 μ L	0
H ₂ O ultrapura	43 μ L	0
NADPH 4 mM	50 μ L	3
Acetonitrile freddo	100 μ L	3 o 5

I campioni venivano centrifugati a 20000 xg per 10 minuti (Beckman Coulter, rotore JA25.15). I supernatanti sono stati prelevati e analizzati mediante HPLC.

Studi d'inibizione. L'effetto inibitorio del clotrimazolo sulle isoforme di CYP3A1 e CYP3A2 è stato valutato sui *pool* dei microsomi di ogni gruppo di ratti in studio, di controllo ed indotti con DEX. I *pool* sono stati preparati miscelando le frazioni microsomiali di tutti i ratti appartenenti allo stesso gruppo e diluendole opportunamente, con tampone fosfato KH₂PO₄ 0,1 M. Per i gruppi di ratti di controllo sono stati utilizzati 25 μ g di proteine microsomiali, mentre per i ratti indotti 2 μ g per ogni prova. L'inibitore è stato diluito in acetonitrile e sono state incubate concentrazioni crescenti di clotrimazolo (da 1 a 50 nM, n=6) mantenendo costante la concentrazione di testosterone (50 μ M). Le prove sono state condotte seguendo le modalità descritte precedentemente per gli studi cinetici.

Analisi HPLC. La strumentazione HPLC utilizzata è costituita dal un sistema Shimadzu precedentemente descritto. La separazione cromatografica dei campioni è stata condotta utilizzando una colonna Zorbax RX-C18, 5 μ m, 4,6 x 250 mm (Agilent Technologies) con la temperatura mantenuta a 35° C. La fase mobile era costituita da una soluzione di 1,5 mM ammonio acetato (a pH 7,0) (fase A) e acetonitrile (fase B). Il programma di eluizione in gradiente, condotto a flusso costante di 1 mL/min, è riportato nella Tabella 8.

Tabella 8 Programma del gradiente di eluizione.

<i>Tempo (min)</i>	<i>A (%)</i>	<i>B (%)</i>
0	70	30
4	70	30
20	40	60
21	70	30
23	70	30

In queste condizioni il 6 β -idrossitestosterone eluiva in 6,2 minuti. Il volume di campione iniettato era pari a 100 μ L. La lunghezza d'onda del rivelatore UV era impostata a 245 nm, che corrisponde al massimo di assorbimento per il 6 β -idrossitestosterone. Per quantificare il 6 β -idrossitestosterone prodotto, è stata costruita una retta di taratura con concentrazioni note di 6 β -idrossitestosterone e comprese tra 1 μ M e 50 μ M (n=8). L'equazione della retta così ottenuta è stata utilizzata per quantificare il 6 β -testosterone in tutti gli esperimenti eseguiti, mediante regressione lineare.

Analisi dei dati. L'analisi dei dati è stata eseguita esattamente come sopra descritto per le attività EROD e MROD.

3.16 Valutazione dell'attività di idrossilazione del midazolam in preparazioni di microsomi epatici di ratto

Sono stati eseguiti studi cinetici per valutare l'attività di idrossilazione del midazolam in posizione 4 e 1' catalizzata dai CYP3A1 e CYP3A2, sulle frazioni microsomiali di tutti gli animali di controllo e indotti con DEX. L'attività dei CYP nei confronti del midazolam è stata valutata in base alla formazione dei due prodotti d'idrossilazione 4-idrossimidazolam (4OH-MDZ) e 1'-idrossimidazolam (1'OH-MDZ).

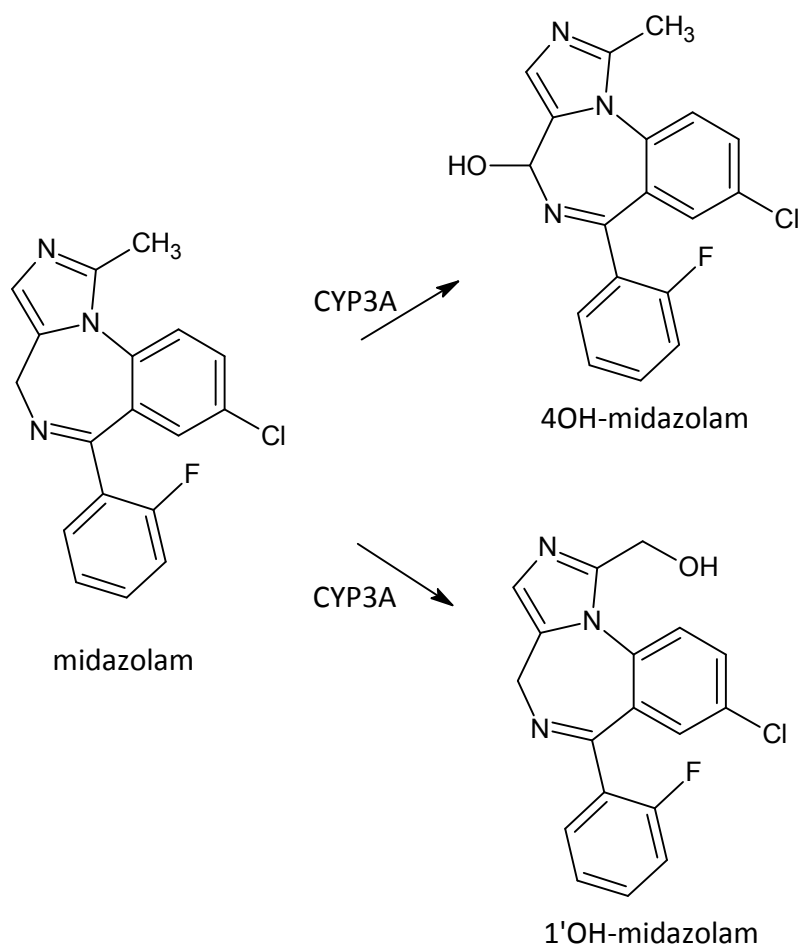


Figura 10 Reazione di idrossilazione del midazolam in posizione 4 e 1' catalizzata dal CYP3A.

Studi di linearità. Per operare in condizioni di linearità, sono stati eseguiti studi preliminari in cui variavano la quantità di proteine utilizzate e il tempo d'incubazione. Quantità crescenti di proteine (tra 0,5 pmoli e 2 pmoli per i microsomi esperimenti CYP3A1 e CYP3A2 ricombinanti, tra 10 µg e 20 µg per i microsomi di ratti non indotti e tra 1 µg e 10 µg per i trattati con DEX) sono state incubate a 37° C per tempi diversi (3, 5 e 10 min) in presenza di 0,5 µM midazolam in un mezzo costituito da 0,1M KH_2PO_4 (pH 7,4). La reazione metabolica è stata iniziata mediante l'aggiunta del cofattore NADPH e bloccata, alla fine del tempo d'incubazione, con 100 µL di metanolo freddo. I campioni sono stati sottoposti a centrifugazione per 10 minuti a 20000 xg (Beckman Coulter), i supernatanti prelevati ed analizzati mediante HPLC.

Studi cinetici. Per analizzare le cinetiche di formazione di 4OH-MDZ e 1'OH-MDZ ad opera di CYP3A1 e CYP3A2, concentrazioni crescenti di midazolam (comprese tra 0,5 μM e 100 μM) sono state incubate, in un volume totale di 200 μL con 0,1 M KH_2PO_4 , con la quantità di proteine microsomiali ritenuta più adatta sulla base degli studi di linearità descritti sopra. Per i microsomi esperimenti CYP3A1 o CYP3A2 ricombinante sono state utilizzate 0,5 pmoli di proteine microsomiali. Per i gruppi di ratti non indotti sono stati utilizzati 10 μg di proteine microsomiali, mentre per i ratti indotti con DEX 1 μg . La reazione veniva iniziata per aggiunta di 0,5 mM NADPH e fatta procedere per il tempo di incubazione più opportuno, come descritto dettagliatamente in precedenza e riportato nella Tabella 9. Il tempo d'incubazione era di 5 minuti per tutte le preparazioni microsomiali utilizzate. Al termine dell'incubazione, la reazione veniva bloccata con 100 μL di metanolo freddo.

Tabella 9 Schema dei componenti di reazione per gli studi cinetici di idrossilazione del midazolam.

	Mezzo d'incubazione	Tempo (min)
KH_2PO_4 0,2 M (pH 7,4)	100 μL	0
diluizione MDZ	2 μL	0
diluizione microsomi	10 μL	0
H_2O ultrapura	43 μL	0
NADPH 4 mM	50 μL	3
Metanolo freddo	100 μL	5

I campioni venivano centrifugati a 20000 $\times g$ per 10 minuti (Beckman Coulter, rotore JA25.15). I supernatanti sono stati prelevati e analizzati mediante HPLC.

Studi d'inibizione. L'effetto inibitorio del clotrimazolo sulle isoforme CYP3A1 e CYP3A2 è stato valutato sui *pool* di ogni gruppo di ratti in studio, non indotti ed indotti con DEX. I *pool* sono stati preparati miscelando le frazioni microsomiali di tutti i ratti appartenenti allo stesso gruppo, opportunamente diluite con tampone fosfato KH_2PO_4 0,1 M. Per i gruppi di ratti non indotti sono stati utilizzati 10 μg di proteine microsomiali, mentre per i ratti indotti 2 μg per ogni prova. L'inibitore è stato diluito in acetonitrile e sono state incubate concentrazioni crescenti di clotrimazolo (da 1 a 50 nM, n=6) mantenendo costante la concentrazione di

testosterone (50 μM). Le prove sono state condotte seguendo le modalità descritte precedentemente per gli studi cinetici.

Analisi HPLC. La strumentazione HPLC utilizzata è costituita dal un sistema Shimadzu precedentemente descritto. La separazione cromatografica dei campioni da analizzare è stata condotta utilizzando una colonna Zorbax RX-C18, 5 μm , 4,6 x 250 mm (Agilent Technologies) con la temperatura mantenuta a 35° C. La fase mobile era costituita da una soluzione di KH_2PO_4 10 mM (pH 7.4) (fase A) e acetonitrile (fase B) in proporzione 60:40. L'eluizione isocratica era condotta a flusso costante di 1mL/min per 20 minuti. In queste condizioni il 4OH-MDZ eluiva dopo 6,4 minuti e l'1'OH-MDZ 8,4 dopo minuti. Il volume di campione iniettato era pari a 100 μL . La lunghezza d'onda del rivelatore UV di 220 nm, che corrisponde al massimo di assorbimento dei due metaboliti del midazolam.

Per quantificare dei prodotti di reazione sono state costruite due rette di taratura con concentrazioni di 4OH-MDZ e 1'OH-MDZ comprese tra 0,05 μM e 20 μM (n=9). I valori dell'area del picco corrispondente al prodotto cercato sono stati calcolati mediante regressione lineare.

Analisi dei dati. L'analisi dei dati è stata eseguito esattamente come sopra descritto per le attività EROD e MROD.

Risultati

4.1 Effetto differenziale del BaP sull'induzione dei CYP1A nei ratti Wistar e Sprague-Dawley

È stato intrapreso uno studio preliminare per valutare se esistono differenze significative nell'induzione dei CYP1A prodotta dal benzo[a]pirene in due ceppi di ratto differenti: Sprague-Dawley e Wistar. Esiste in merito un solo studio in letteratura¹⁷, in cui si afferma che questi due ceppi di ratto hanno una diversa suscettibilità agli induttori dei CYP1A1 e CYP1A2, ma non è stata valutata l'induzione ad opera del BaP. Nel presente lavoro sperimentale è stato quindi paragonato l'effetto del BaP sulle isoforme di CYP1A in ratti Sprague-Dawley e Wistar, come descritto nella sezione Materiali e metodi. La suscettibilità dei roditori all'azione cancerogena degli idrocarburi policiclici aromatici e delle amine/amidi eterocicliche aromatiche è strettamente correlata con l'espressione dei citocromi CYP1A nell'organo bersaglio. Di conseguenza, una quantificazione del grado di induzione è importante per spiegare la differenza di suscettibilità cancerogena tra le specie. Nonostante esistano diversi modelli *in vitro* per valutare il potenziale di induzione dei CYP a livello epatico (fettine di fegato, epatociti primari e linee di cellule epatiche immortalizzate), per studiare questo fenomeno vengono generalmente eseguiti esperimenti su animali di laboratorio *in vivo* ed *ex vivo* perché gli animali sono il modello che meglio predice gli effetti induttori nell'uomo. In questo lavoro è stata valutata l'attività inducente del BaP confrontando 3 diverse tecniche: la qRT-PCR, il Western blot e l'attività enzimatica dei CYP tramite reazioni *marker*.

L'espressione genica di CYP1A1 e CYP1A2 è stata valutata mediante qRT-PCR sul tessuto epatico dei ratti Sprague-Dawley e Wistar, di controllo e indotti con BaP, e i risultati sono riportati nella Figura 11. In entrambi i ceppi di ratto, l'espressione genica basale risulta simile negli animali di controllo, mentre il trattamento con BaP produce un notevole e significativo aumento dei livelli di mRNA di CYP1A1.

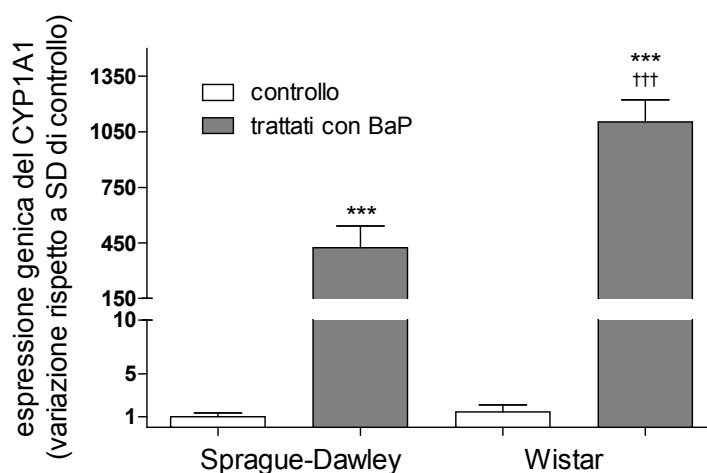


Figura 11 Livelli di trascrizione genica del CYP1A1 nei ratti Sprague-Dawley e Wistar, di controllo ed indotti con BaP. I dati sperimentali riguardanti l'mRNA del CYP1A1 sono presentati come variazione rispetto ai ratti Sprague-Dawley di controllo (media \pm S.E.M), il cui valore è stato arbitrariamente posto pari a 1. *** $p < 0,001$ vs. il gruppo degli animali non indotti dello stesso ceppo. ††† $p < 0,001$ vs. il corrispondente gruppo di ratti Sprague-Dawley.

Nella Figura 12 è riportata l'espressione genica del CYP1A2. Il livello di espressione genica basale di CYP1A2 risulta significativamente maggiore nei ratti Wistar che negli Sprague-Dawley. Come per il CYP1A1, anche l'espressione genica del CYP1A2 risulta significativamente aumentata dal trattamento con BaP. È da evidenziare inoltre che l'incremento dell'espressione genica basale di CYP1A1 e CYP1A2 rispetto al rispettivo gruppo di ratti di controllo è significativamente maggiore nei ratti Wistar rispetto agli Sprague-Dawley.

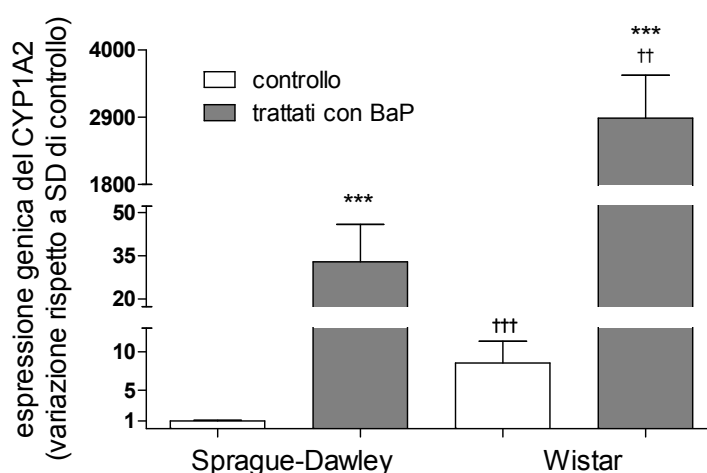


Figura 12 Livelli di trascrizione genica del CYP1A2 nei ratti Sprague-Dawley e Wistar, di controllo ed indotti con BaP. I dati sperimentali riguardanti l'mRNA del CYP1A2 sono presentati come variazione rispetto ai ratti Sprague-Dawley di controllo, il cui valore è stato arbitrariamente posto pari a 1. *** $p < 0,001$ vs. il gruppo degli animali non indotti dello stesso ceppo. †† $p < 0,01$ e ††† $p < 0,001$ vs. il corrispondente gruppo di ratti Sprague-Dawley.

Sui microsomi epatici dei ratti Sprague-Dawley e Wistar di controllo e indotti con BaP è stata effettuata un'analisi *Western blot* per determinare i livelli di espressione proteica di CYP1A1 e CYP1A2. Nella Figura 13 è riportato un *Western blot* rappresentativo dell'espressione proteica delle due isoforme in cui si evidenziano due bande, una corrispondente al peso molecolare di 58 KDa relativa al CYP1A1 e l'altra corrispondente al peso di 54 KDa relativa al CYP1A2. Nei microsomi epatici dei ratti di controllo (*lane* 3 e 5) il CYP1A1 non è rilevabile, in quanto non costitutivamente presente, mentre il CYP1A2 è presente in tutte le preparazioni microsomiali prese in esame (Figura 13 e Figura 14).

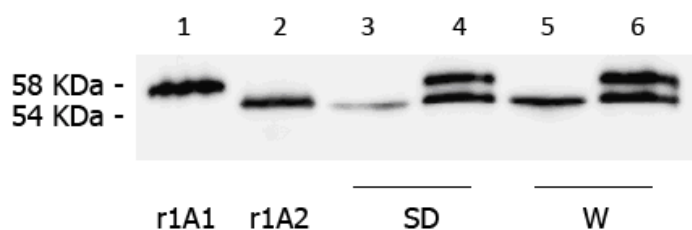


Figura 13 Western blot esemplificativo dell'espressione proteica di CYP1A1 e CYP1A2. Come standard di riferimento, sono stati caricati nelle *lane* 1 e 2, rispettivamente, delle preparazioni microsomiali esprimenti CYP1A1 e CYP1A2 ricombinanti. *Lane* 3-4: ratti Sprague-Dawley di controllo e indotti con BaP, rispettivamente. *Lane* 5-6: ratti Wistar di controllo e indotti con BaP, rispettivamente.

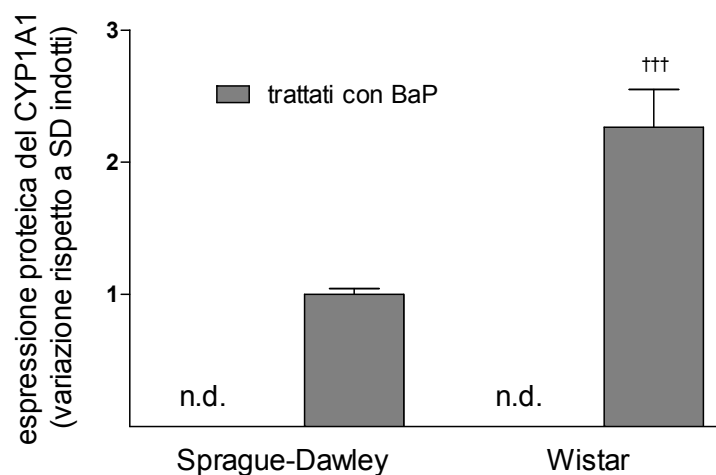


Figura 14 Analisi densitometrica delle bande di CYP1A1. I risultati sono riportati come medie \pm S.E.M. e calcolati come variazione rispetto ai ratti Sprague-Dawley trattati con BaP. I livelli di CYP1A1 nei ratti di controllo non sono mostrati in quanto non determinabili (n.d.). $††† p < 0,001$ vs. il corrispondente gruppo di ratti Sprague-Dawley.

Un aumento sia di CYP1A1 sia di CYP1A2 è stato osservato in seguito al trattamento con BaP in entrambi i ceppi di ratto (Figura 14 e Figura 15). Tale aumento risulta significativamente maggiore nei ratti Wistar rispetto agli Sprague-Dawley. Va notato che la differenza dell'espressione di CYP1A2 tra animali di controllo e indotti con BaP è molto maggiore di quella che appare dalla Figura 13 in quanto le quantità di proteine microsomiali caricate per *lane* erano 40 volte maggiori per i ratti non indotti rispetto a quelle dei ratti trattati con BaP.

Coerentemente con i risultati di qRT-PCR, dalla quantificazione densitometrica della banda relativa al CYP1A2 emerge che l'espressione di questa isoforma è significativamente maggiore nei microsomi di ratti di controllo Wistar rispetto agli Sprague-Dawley (Figura 15).

Le differenze tra i due ceppi nei livelli basali del contenuto totale CYP non sono significative. Il contenuto di CYP totale delle frazioni microsomiali ottenute da ratti Sprague-Dawley e Wistar indotti ($1,13 \pm 0,04$ e $0,94 \pm 0,10$ nmol/mg di proteina, rispettivamente) è significativamente maggiore ($p < 0,001$) a quella di microsomi da animali di controllo ($0,62 \pm 0,02$ e $0,61 \pm 0,05$ nmol/mg di proteina in Sprague-Dawley e ratti Wistar, rispettivamente), a conferma di una marcata induzione delle due proteine CYP1A1 e CYP1A2.

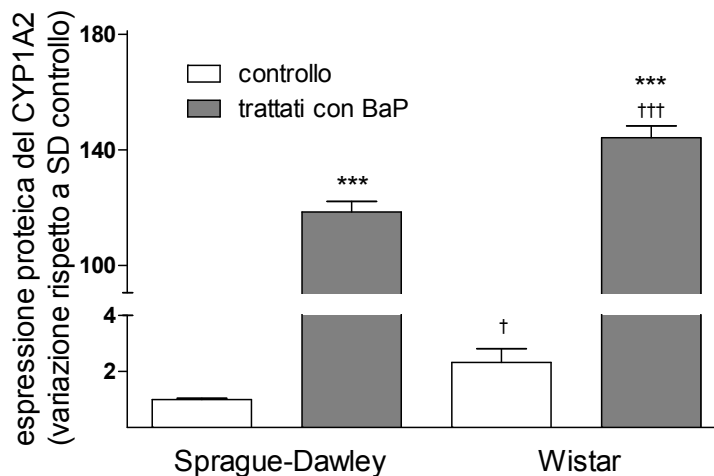


Figura 15 Analisi densitometrica delle bande di CYP1A2. I risultati sono riportati come medie \pm S.E.M. e rappresentano la variazione rispetto ai ratti Sprague-Dawley di controllo posti arbitrariamente posto pari a 1. *** $p < 0,001$ vs. il gruppo degli animali non indotti dello stesso ceppo. † $p < 0,05$ e ††† $p < 0,001$ vs. il corrispondente gruppo di ratti Sprague-Dawley.

Al fine di confermare i precedenti dati di letteratura ottenuti in ratti Sprague-Dawley riguardanti la specificità delle attività 7-etossiresorufina-O-deetilasi (EROD) e 7-

metossiresorufina-demetilasi (MROD) nei confronti di CYP1A1 e CYP1A2, rispettivamente, sono stati analizzati gli effetti dell' α -naftoflavone (ANF), inibitore del CYP1A, e della furafillina, inibitore selettivo del CYP1A2, su preparazioni microsomiali sia di ratti Sprague-Dawley che Wistar.

La Figura 16 mostra che l'ANF causa l'inibizione pressoché completa dell'attività MROD a concentrazioni nM in entrambi i ceppi di ratti di controllo. Al contrario, l'attività EROD basale risulta essere quasi totalmente insensibile all'inibizione da ANF. Nei ratti indotti con BaP l'ANF causa la completa inibizione di entrambe le attività MROD e EROD, a riprova del fatto che tali attività sono affidabili reazioni *marker* per misurare l'attività delle due isoforme di CYP1A nei ratti indotti.

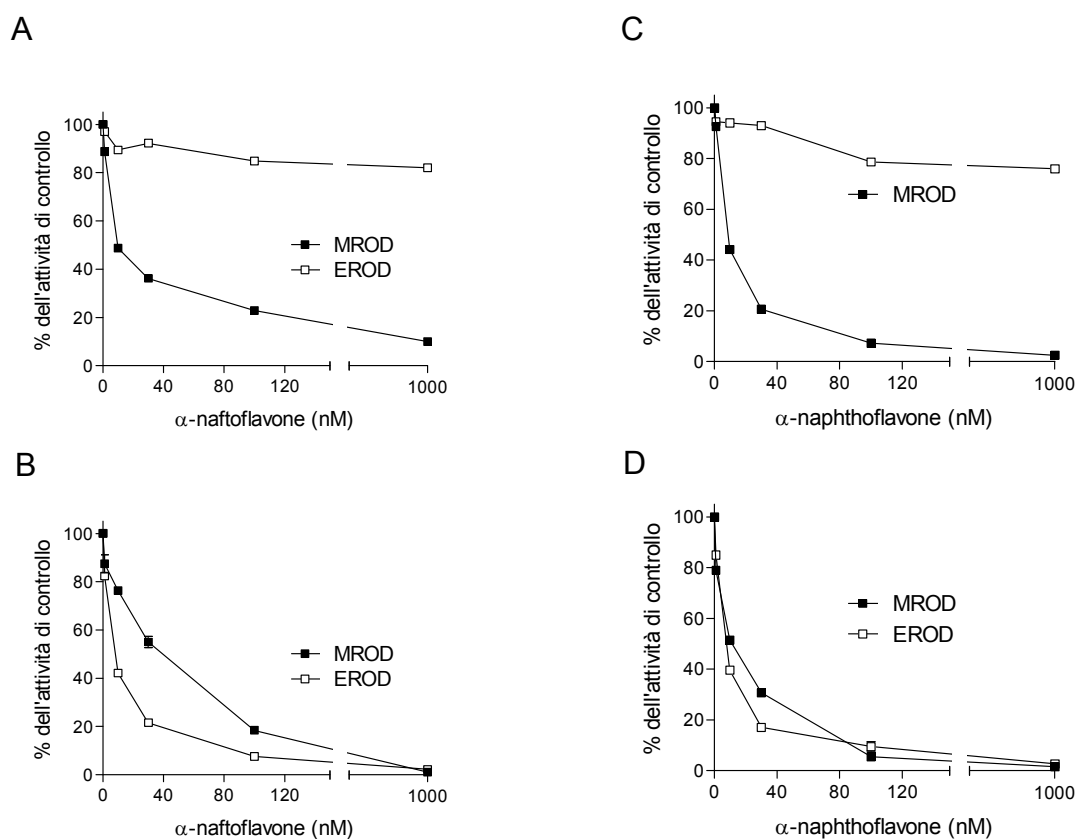


Figura 16 Effetto inibitorio dell' α -naftoflavone sull'attività EROD (\square) e MROD (\blacksquare) di pool di preparazioni microsomiali ottenuti da ratti Sprague-Dawley di controllo (A) e indotti (B) e Wistar di controllo (C) e indotti (D).

La Figura 17 mostra l'effetto inibitorio della furafillina sull'attività MROD dei microsomi da ratti Sprague-Dawley e Wistar, di controllo e trattati con BaP, ed evidenzia che l'inibizione è totale nei ratti Sprague-Dawley. Sebbene l'attività MROD risulti meno sensibile alla furafillina nei ratti Wistar, anche in questo ceppo si osserva una quasi completa inibizione. A causa del limite di solubilità della furafillina, non è stato possibile impiegare concentrazioni superiori a 150 μM .

Come discusso in dettaglio nel seguito, i dati di cui sopra confermano le conclusioni di Burke e collaboratori⁷ secondo cui le attività EROD e MROD sono reazioni *marker* per CYP1A1 e 1A2, rispettivamente, nei ratti indotti con BaP, mentre nei ratti di controllo solo l'attività MROD è specifica per il CYP1A2.

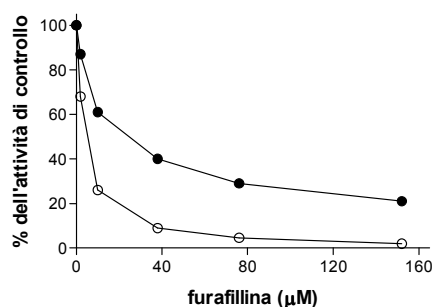


Figura 17 Effetto inibitorio della furafillina sull'attività MROD di pool di preparazioni microsomiali ottenute da ratti Sprague-Dawley (\circ) e Wistar (\bullet).

Le cinetiche delle attività EROD e MROD sono state studiate in condizioni di velocità iniziale rigorosamente controllata, determinando la velocità di formazione della resorufina in presenza di concentrazioni crescenti di 7-etossiresorufina e 7-metossiresorufina.

La cinetica di formazione della resorufina dalla 7-etossiresorufina (EROD) segue una cinetica di Michaelis-Menten a un sito sia negli animali di controllo che in quelli trattati con BaP (Figura 18).

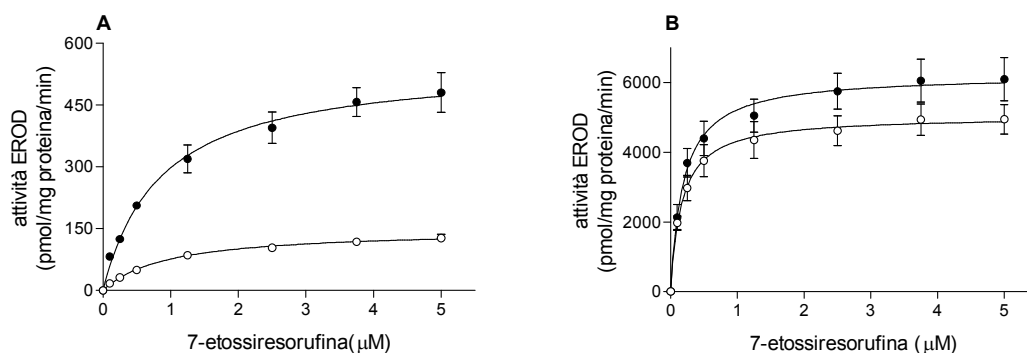


Figura 18 Cinetica dell'attività EROD in microsomi epatici ottenuti da ratti di controllo (A) e indotti con BaP (B), Sprague-Dawley (○) e Wistar (●). I dati sono le medie \pm S.E.M. di 3 determinazioni per ratto.

I relativi parametri farmacocinetici sono riportati nella Tabella 10. Nonostante l'assenza della proteina CYP1A1 (Figura 14), i ratti di controllo, Sprague-Dawley e Wistar, mostrano una significativa attività EROD, nettamente superiore nei ratti Wistar (Tabella 10 e Figura 19). Il trattamento con BaP causa un aumento di un ordine di grandezza di tale attività. I valori di K_m sono molto simili negli animali trattati con BaP e differiscono significativamente da quelli osservati negli animali di controllo, a conferma del fatto che l'attività EROD è catalizzata da enzimi differenti negli animali di controllo e indotti.

Tabella 10 Parametri cinetici dell'attività EROD.

	V_{max} (pmol/mg/min)	K_m (μ M)	CL_{int} (μ L/mg/min)
Sprague-Dawley			
Controllo	147,7 \pm 10,3	0,91 \pm 0,04	162,7 \pm 12,5
Indotti con BaP	5042 \pm 466 ^{***}	0,17 \pm 0,01 ^{***}	30437 \pm 4797 ^{***}
Wistar			
Controllo	556,0 \pm 16,7 ^{†††}	0,86 \pm 0,09 ^{†††}	646,0 \pm 32,0
Indotti con BaP	6278 \pm 585 ^{***}	0,19 \pm 0,02 ^{***}	40241 \pm 8916 ^{***}

I dati sono le medie \pm S.D. ^{***} $p < 0,001$ vs. il gruppo degli animali non indotti dello stesso ceppo. ^{†††} $p < 0,001$ vs. il corrispondente gruppo di ratti Sprague-Dawley.

Dai risultati fin qui descritti risulta evidente una mancanza di proporzionalità nei ratti indotti tra i valori di V_{max} dell'attività EROD, che sono simili nei due ceppi, ed i livelli di mRNA e proteina CYP1A1, che risultano significativamente più alti nei ratti Wistar (Figura 11 e Figura 14, rispettivamente).

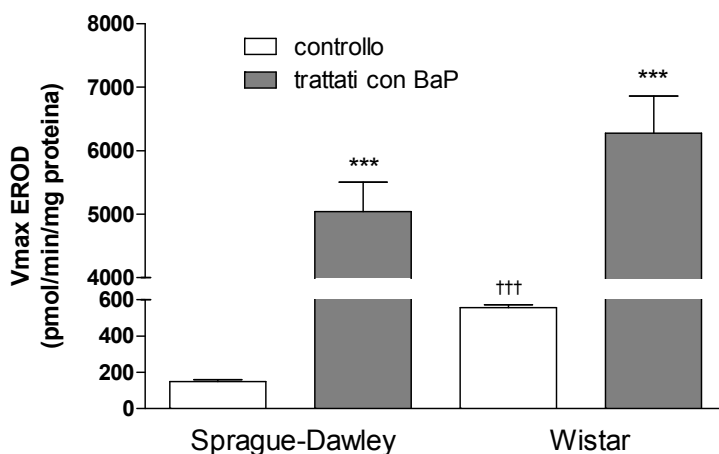


Figura 19 Valori di V_{max} dell'attività EROD. I risultati sono riportati come medie \pm S.E.M. *** $p < 0,001$ vs. il gruppo degli animali non indotti dello stesso ceppo. ††† $p < 0,001$ vs. il corrispondente gruppo di ratti Sprague-Dawley.

La cinetica di formazione della resorufina dalla 7-metossiresorufina (MROD) segue un modello cinetico di Michaelis-Menten a un enzima con inibizione da substrato (Figura 20).

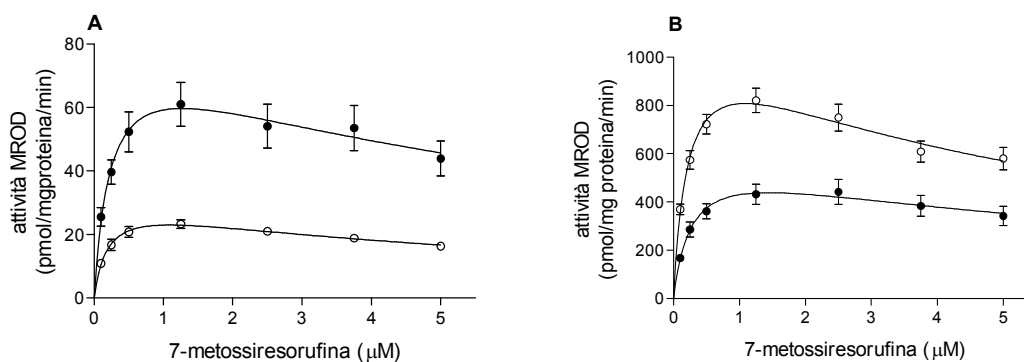


Figura 20 Cinetica dell'attività MROD in microsomi epatici ottenuti da ratti di controllo (A) e indotti con BaP (B), Sprague-Dawley (○) e Wistar (●). I dati sono le medie \pm S.E.M. di 3 determinazioni per ciascun ratto.

I parametri farmacocinetici sono riportati nella Tabella 11. I valori di K_m e k_{si} sono simili nei ratti Sprague-Dawley e Wistar, di controllo e trattati BaP. Per contro, il valore di V_{max} , e di conseguenza il valore di CL_{int} , misurato nei microsomi dei ratti Wistar di controllo è significativamente superiore a quello osservato nei ratti Sprague-Dawley (Figura 21).

Tabella 11 Parametri cinetici dell'attività MROD.

	V_{max} (pmol/mg/min)	K_m (μ M)	K_{si} (μ M)	CL_{int} (μ L/mg/min)
Sprague-Dawley				
Controllo	33,0 \pm 2,4	0,22 \pm 0,01	6,59 \pm 2,47	154 \pm 18
Indotti con BaP	1153 \pm 60 ^{***}	0,23 \pm 0,01	5,33 \pm 1,16	5107 \pm 352 ^{***}
Wistar				
Controllo	86,9 \pm 10,6	0,26 \pm 0,02	6,58 \pm 1,88	323 \pm 30
Indotti con BaP	635 \pm 75 ^{***,†††}	0,29 \pm 0,03	7,04 \pm 0,22	2165 \pm 162 ^{***,†††}

^{***} p<0,001 vs. il gruppo degli animali non indotti dello stesso ceppo. ^{†††} p<0,001 vs. il corrispondente gruppo di ratti Sprague-Dawley.

Il trattamento con BaP causa un significativo aumento della V_{max} dell'attività MROD e, di conseguenza, dei valori CL_{int} in entrambi i ceppi di ratto. È stata riscontrata una differenza significativa nel grado di induzione tra i due ceppi di ratto in seguito al trattamento con BaP: nei ratti Sprague-Dawley, V_{max} e CL_{int} aumentano di oltre 30 volte rispetto agli animali di controllo, mentre nei ratti Wistar aumentano di solo 7 volte.

La Figura 21 mette in evidenza che l'attività MROD è notevolmente superiore nei Wistar di controllo rispetto agli Sprague-Dawley. Al contrario, nei ratti indotti con BaP, l'attività MROD è significativamente maggiore nei ratti Sprague-Dawley, cosicché, come precedentemente osservato per l'attività EROD, l'aumento dell'attività MROD nei due ceppi di ratto è inversamente proporzionale a quello osservato per l'espressione genica e proteica (Figura 12 e Figura 15, rispettivamente).

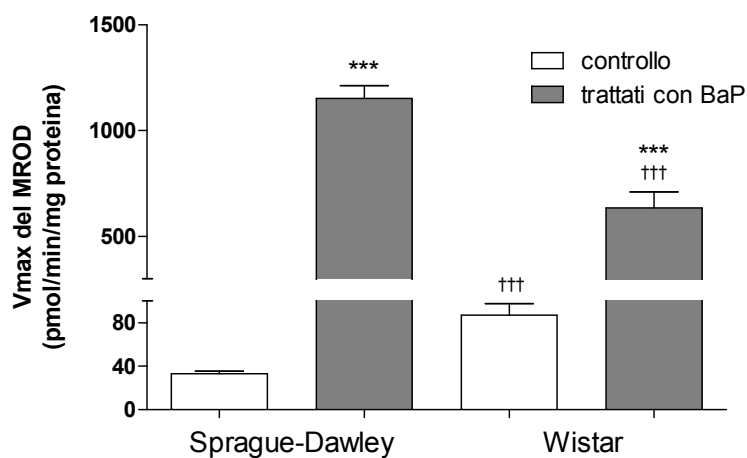


Figura 21 Valori di Vmax dell'attività MROD nei gruppi di ratti di controllo e indotti con BaP. I risultati sono riportati come medie \pm S.E.M. *** $p < 0,001$ vs. il gruppo degli animali non indotti dello stesso ceppo. ††† $p < 0,001$ vs. il corrispondente gruppo di ratti Sprague-Dawley.

Poiché il recettore Ah (AhR) controlla la trascrizione dei geni CYP1A1 e CYP1A2 e in letteratura sono riportati risultati contrastanti riguardo all'effetto degli induttori dei CYP1A sull'espressione genica e proteica dell'AhR nel tessuto epatico^{39,40,41}, abbiamo deciso di valutare i livelli di mRNA e proteici di tale recettore nei ratti di controllo e indotti di entrambi i ceppi. I risultati dell'espressione genica, riportati nella Figura 22, indicano che l'espressione genica basale dell'AhR è simile nei due ceppi e aumenta significativamente in seguito al trattamento con BaP. Nonostante la grande variabilità osservata nei ratti Wistar, l'aumento di trascrizione genica rispetto al livello basale è significativamente maggiore in questo ceppo di ratti, rispetto agli Sprague-Dawley.

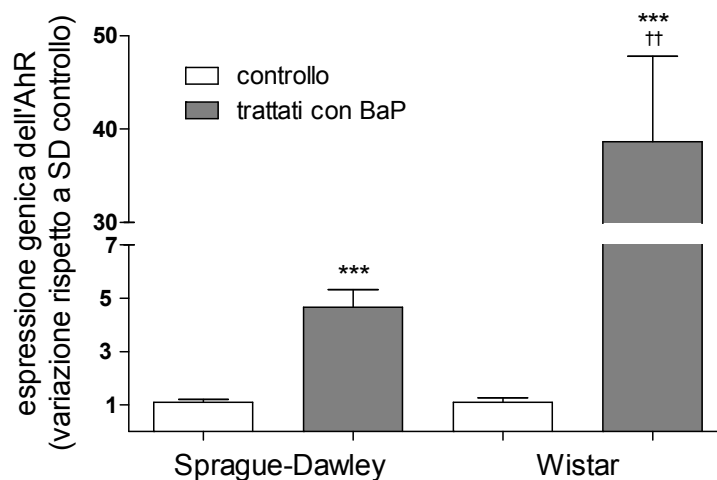


Figura 22 Livelli di trascrizione genica dell'AhR nei ratti di controllo ed indotti con BaP. I dati sperimentali riguardanti l'mRNA dell'AhR sono presentati come variazione rispetto ai ratti Sprague-Dawley di controllo, il cui valore è stato arbitrariamente posto pari a 1. I risultati sono riportati come medie \pm S.E.M. *** $p < 0,001$ vs. il gruppo degli animali non indotti dello stesso ceppo. †† $p < 0,01$ vs. il corrispondente gruppo di ratti Sprague-Dawley.

Coerentemente con i risultati di qRT-PCR, l'analisi *Western blot* ha rivelato che l'espressione proteica dell'AhR è simile nei fegati degli animali di controllo di entrambi i ceppi, mentre risulta significativamente aumentata nei ratti indotti con BaP (Figure 23 e Figura 24). Inoltre il grado d'induzione risulta significativamente maggiore nei ratti Wistar rispetto agli Sprague-Dawley.

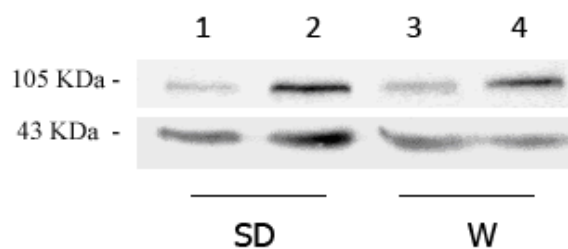


Figura 23 Western blot esemplificativo dell'espressione proteica dell'AhR. Nelle *lane* 1 e 2 sono stati caricati omogenati di fegato di ratti Sprague-Dawley di controllo e indotti con BaP, rispettivamente. Nelle *lane* 3 e 4 sono stati caricati omogenati di fegato di ratti Wistar di controllo e indotti con BaP, rispettivamente.

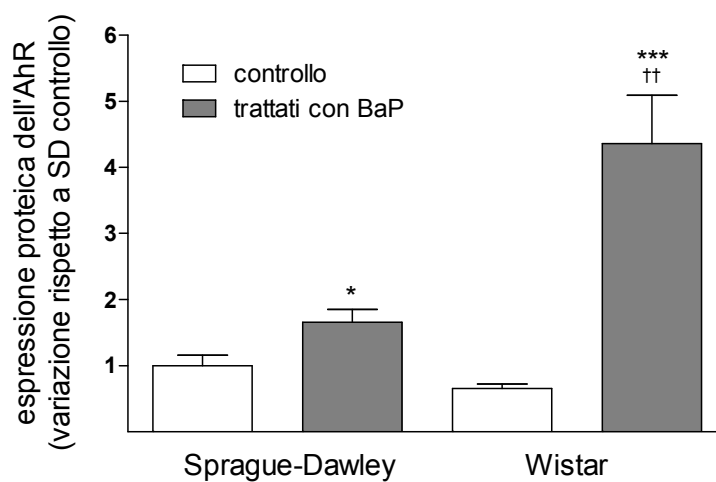


Figura 24 Analisi densitometrica delle bande dell'AhR. I risultati sono riportati come medie \pm S.E.M e sono presentati come variazione rispetto ai ratti Sprague-Dawley di controllo, il cui valore è stato arbitrariamente posto pari a 1. I risultati sono riportati come medie \pm S.E.M. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ vs. il gruppo degli animali non indotti dello stesso ceppo. †† $p < 0,01$ vs. il corrispondente gruppo di ratti Sprague-Dawley.

4.2 Effetto della cirrosi sull'induzione dei CYP1A

Dal momento che in letteratura sono stati descritti protocolli alquanto variabili per l'induzione della cirrosi⁴², questa fase della ricerca è stata dedicata alla messa a punto del metodo per indurre nei ratti cirrosi sia compensata che scompensata (dedotta dalla presenza di ascite).

Il modello animale di cirrosi epatica oggi più comunemente utilizzato è quello ottenuto nel ratto sottoposto a trattamento con CCl₄ associato al fenobarbital, trattamento di cui esistono in letteratura diversi protocolli sperimentali che si differenziano essenzialmente per la via di somministrazione usata per il CCl₄ (mediante sondino intragastrico, iniezione intraperitoneale o sottocutanea, inalazione), per la sua concentrazione, per la frequenza delle somministrazioni e la durata del trattamento⁴². Qualunque sia il protocollo sperimentale scelto, è comunque noto (ed è stato confermato anche dai nostri risultati) che l'efficacia del trattamento è soggetto ad un'alta variabilità interindividuale e la mortalità degli animali è sempre molto elevata⁴². I ratti di ceppo Sprague-Dawley inizialmente scelti sulla base di precedenti pubblicazioni si sono dimostrati inadatti allo scopo, in quanto assai resistenti all'induzione di cirrosi scompensata, anche in seguito a trattamento prolungato con CCl₄ associato a fenobarbital. Per quanto riguarda gli studi sulla cirrosi è stato pertanto preso in considerazione solamente il ceppo Wistar.

In questo studio è stato utilizzato il protocollo descritto da Angeli e collaboratori³³ che prevede la somministrazione di CCl₄ per inalazione due volte alla settimana per un periodo di trattamento di 10-15 settimane. Durante il trattamento con CCl₄ è stata registrata una notevole mortalità: circa il 35% degli animali non è sopravvissuto alla somministrazione del CCl₄.

Gli animali sono stati divisi in tre gruppi: sani (non sottoposti a trattamento con CCl₄), cirrotici non ascitici e cirrotici ascitici, in base alla presenza o meno di ascite al termine del trattamento. Ogni gruppo è stato quindi suddiviso in due sottogruppi: controlli (trattati con veicolo) ed indotti (trattati con BaP o DEX). L'efficacia del trattamento con CCl₄, ovvero il grado di danno epatico prodotto, è valutabile quantitativamente nei singoli animali solo al momento

del sacrificio sulla base dell'analisi istologica del fegato e della determinazione di alcuni parametri biochimici di funzionalità epatica, quali i livelli plasmatici di albumina e i livelli di alanina-transaminasi (ALT) e aspartato-transaminasi (AST). Questi enzimi hanno una localizzazione citosolica negli epatociti, per cui un loro innalzamento nel sangue è in genere considerato un segno di lisi dell'epatocita. L'albuminemia è, invece, un probante indice delle capacità biosintetiche del fegato.

I risultati dei test biochimici di funzionalità epatica e dell'esame istologico effettuati sui ratti destinati allo studio dell'induzione del CYP1A sono riportati nella Tabella 12.

Tabella 12 Test biochimici e punteggio dell'esame istologico.

	<i>Sani controllo</i>	<i>Sani BaP</i>	<i>Non ascitici controllo</i>	<i>Non ascitici BaP</i>	<i>Ascitici controllo</i>	<i>Ascitici BaP</i>
Albumina (g/L)	40,2 ± 2,8	38,0 ± 2,3	35,0 ± 1,2 ^{SSS}	33,8 ± 1,1 ^{SS}	30,2 ± 2,0 ^{SSS,###}	28,0 ± 5,7 ^{SSS,##}
AST (U/L)	126 ± 21	131 ± 12	151 ± 23	146 ± 49	306 ± 75 ^{SSS,###}	423 ± 127 ^{SSS,###}
ALT (U/L)	40 ± 6	35 ± 5	62 ± 6	61 ± 18	99 ± 40 ^{SSS,##}	130 ± 51 ^{SSS,###}
Contenuto di CYP totale (nmol/mg proteina)	0,61 ± 0,10	0,94 ± 0,15 ^{***}	0,64 ± 0,07	0,88 ± 0,14 ^{**}	0,48 ± 0,05 ^{SS,##}	0,53 ± 0,11 ^{SSS,###}
Score di Ishak (0-6)	0 (0-0)	0 (0-0)	4 (3-5)	4 (3-5)	6 (6-6)	6 (6-6)

I dati sono riportati come media ± D.S. ^{**}p<0,01 e ^{***}p<0,001 vs. il rispettivo gruppo di controllo. ^Sp<0,05, ^{SS}p<0,01 e ^{SSS}p<0,001 vs. il rispettivo gruppo di animali sani. [#]p<0,05, ^{##}p<0,01 e ^{###}p<0,001 vs. il rispettivo gruppo di animali non ascitici.

Negli animali di controllo, l'albuminemia decresce progressivamente e significativamente nei ratti cirrotici non ascitici e ascitici. L'ALT e l'AST aumentano significativamente nei ratti ascitici di controllo rispetto sia ai ratti sani che a quelli non ascitici. Nei ratti indotti con BaP, l'albuminemia diminuisce parallelamente a quella osservata nei ratti di controllo e non vi sono differenze significative rispetto al gruppo di controllo, a dimostrazione che il trattamento con BaP non influisce sulla funzionalità epatica. Nei ratti indotti con BaP il contenuto di CYP totale aumenta in modo significativo nei ratti sani e non ascitici ma non nei ratti ascitici.

I valori del punteggio di Ishak basati sulle analisi istologiche (Tabella 12 e Figura 25) confermano nella sostanza i dati di laboratorio: i ratti sani hanno una normale architettura epatica; i ratti cirrotici non ascitici hanno sviluppato un moderato grado di cirrosi, con presenza

di diversi setti fibrotici e una discreta infiammazione a livello portale (score complessivo di danno tra 3 e 5, sulla scala di Ishak da 0 a 6); i ratti cirrotici ascitici presentano all'esame istologico un danno epatico molto marcato (score massimo: 6) con presenza di aree fibrotiche, che circondano i noduli cirrotici, e completa distruzione della struttura epatica originale.

Complessivamente i dati di cui sopra indicano che il danno epatico è di grado moderato nei ratti con cirrosi non ascitica e di grado severo in quelli ascitici.

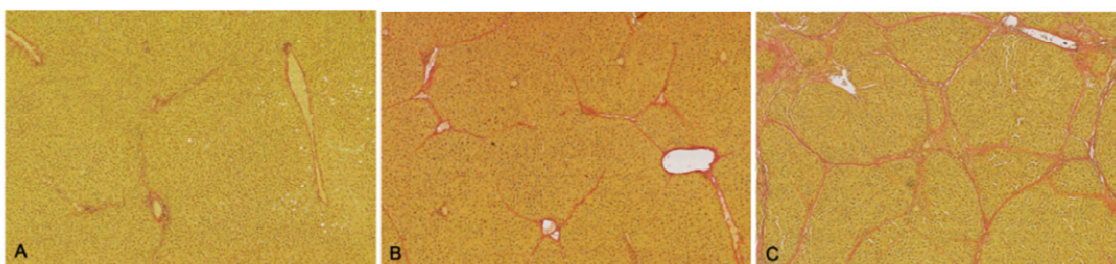


Figura 25 Microfotografie (magnificazione 50X) rappresentative di sezioni di fegati prelevati da un ratto sano (Ishak score = 0) (A), uno non-ascitico (Ishak score = 4) (B), e uno ascitico (punteggio di Ishak = 6) (C).

Nella Figura 26 è riportata l'espressione genica del CYP1A1 nel tessuto epatico dei ratti di controllo e indotti con BaP. L'espressione genica di CYP1A1, presente a livelli estremamente bassi, rimane invariata nei 3 gruppi di ratti di controllo, aumenta significativamente negli animali sani e non ascitici indotti, mentre nei ratti ascitici l'induzione è significativamente minore.

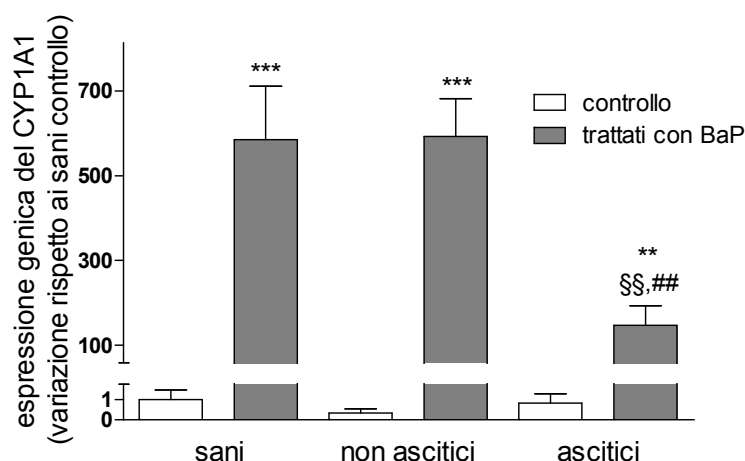


Figura 26 Livelli di trascrizione genica del CYP1A1 nei ratti di controllo ed indotti con BaP. I dati sperimentali riguardanti l'mRNA del CYP1A1 sono presentati in rapporto a quelli dei ratti sani di controllo, il cui valore è stato arbitrariamente posto pari a 1. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ vs. il rispettivo gruppo di animali di controllo. ^{§§} $p < 0,01$ vs. il rispettivo gruppo di animali sani. ^{##} $p < 0,01$ vs. il rispettivo gruppo di animali non ascitici.

Nella Figura 27 è rappresentata l'espressione genica del CYP1A2. È evidente una diminuzione significativa e progressiva dell'espressione basale all'aumentare della gravità della cirrosi epatica. L'induzione ha un andamento simile a quello osservato per il CYP1A1: il BaP induce l'espressione genica di CYP1A2 in modo significativamente inferiore nei ratti ascitici, rispetto agli animali sani e non ascitici.

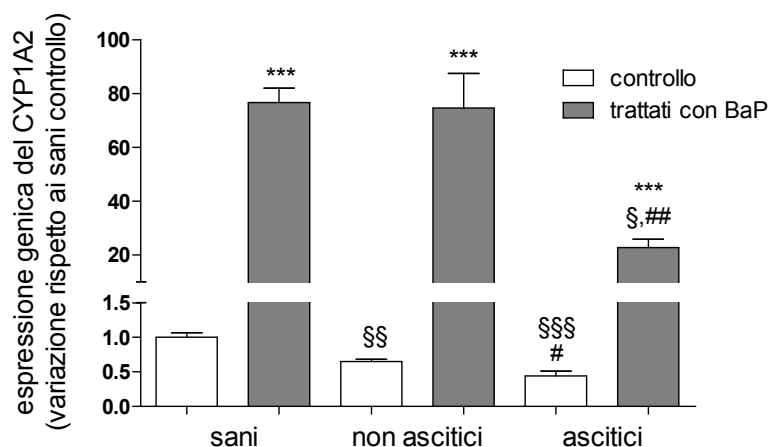


Figura 27 Livelli di trascrizione genica del CYP1A2 nei ratti di controllo ed indotti con BaP. I dati sperimentali riguardanti l'mRNA del CYP1A2 sono presentati in rapporto a quelli dei ratti sani di controllo (media \pm S.E.M.), il cui valore è stato arbitrariamente posto pari a 1. *** $p < 0,001$ vs. il rispettivo gruppo di animali di controllo. $^{\$}$ $p < 0,05$, SS $p < 0,01$ e SSS $p < 0,001$ vs. il rispettivo gruppo di animali sani. $^{##}$ $p < 0,01$ vs. il rispettivo gruppo di animali non ascitici.

È stata quindi analizzata l'espressione proteica delle due isoforme di CYP1A effettuando un'analisi *Western Blot* sulle preparazioni microsomiali dei ratti sani e cirrotici di controllo e indotti con BaP. La Figura 28 rappresenta un Western blot esemplificativo di quanto osservato nei gruppi di animali esaminati.

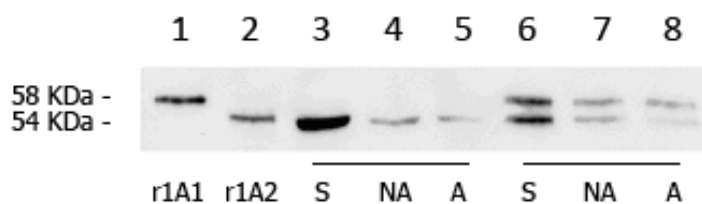


Figura 28 Western blot esemplificativo dell'espressione proteica di CYP1A1 e CYP1A2. Come standard di riferimento, sono state caricate nelle *lane* 1 e 2 rispettivamente le preparazioni microsomiali esprimenti CYP1A1 e CYP1A2 ricombinanti. *Lane* 3-5: ratti di controllo sani, non ascitici e ascitici, nell'ordine. *Lane* 6-8: ratti indotti con BaP sani, non ascitici e ascitici, nell'ordine.

I risultati della quantificazione proteica sono in accordo con quelli della qRT-PCR: nei microsomi epatici di ratti di controllo (*lane* 3-5) il CYP1A1 non è costitutivamente espresso, mentre il CYP1A2 è costitutivamente presente e diminuisce in modo significativo al progredire della cirrosi. Nelle preparazioni microsomiali dei ratti indotti con BaP (*lane* 6-8) si osserva l'induzione di entrambe le isoforme di CYP1A. La differenza nel contenuto di CYP1A2 tra animali di controllo e trattati con BaP è in realtà molto maggiore che quella che appare dalla Figura 28, in quanto sono state caricate quantità di proteine microsomiali 20 volte maggiori per i microsomi ottenuti da ratti di controllo. Dai dati si evidenzia che le proteine CYP1A1 e CYP1A2 vengono indotte a livelli simili (

Figura 29 e

Figura 30) nei ratti sani e cirrotici non ascitici, mentre la loro induzione è significativamente più bassa nei ratti ascitici. L'aumento relativo rispetto ai controlli del contenuto di CYP1A2 è pari a 50 volte nei gruppi di ratti sani e non ascitici, e pari a 7 volte nel gruppo di animali ascitici.

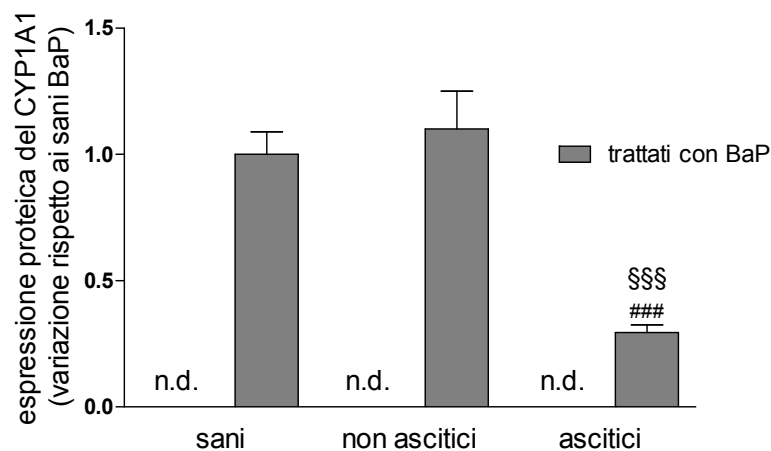


Figura 29 Analisi densitometrica delle bande di CYP1A1. I risultati sono riportati come medie \pm S.E.M. e sono espressi come variazione rispetto ai ratti sani indotti con BaP. I livelli di CYP1A1 nei ratti di controllo non sono mostrati in quanto non determinabili (n.d.). §§§ $p < 0,001$ vs. il rispettivo gruppo di animali sani. ### $p < 0,001$ vs. il rispettivo gruppo di animali non ascitici.

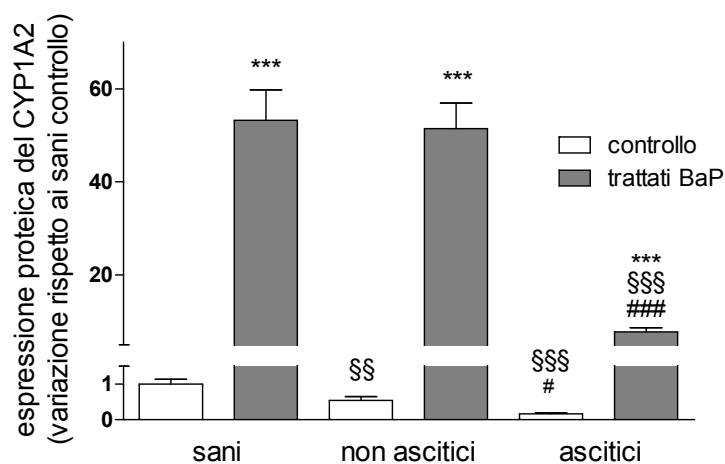


Figura 30 Analisi densitometrica delle bande di CYP1A2. I risultati sono riportati come medie \pm S.E.M. *** $p < 0,01$ vs. il rispettivo gruppo di animali di controllo. *** $p < 0,001$ vs. il rispettivo gruppo di animali di controllo. §§ $p < 0,01$ e §§§ $p < 0,001$ vs. il rispettivo gruppo di animali sani. # $p < 0,05$ e ### $p < 0,001$ vs. il rispettivo gruppo di animali non ascitici.

È stata, infine, valutata l'attività delle due isoforme utilizzando le due reazioni *marker*, EROD e MROD, catalizzate dal CYP1A1 e dal CYP1A2, rispettivamente come precedentemente descritto, in condizioni di velocità iniziale rigorosamente controllata, determinando la velocità di formazione della resorufina in presenza di concentrazioni crescenti di 7-etossiresorufina e 7-metossiresorufina.

Come si può vedere nella Figura 31 l'attività EROD segue una cinetica di Michaelis-Menten a un sito, mentre l'attività MROD segue un modello cinetico di Michaelis-Menten a un enzima con inibizione da substrato.

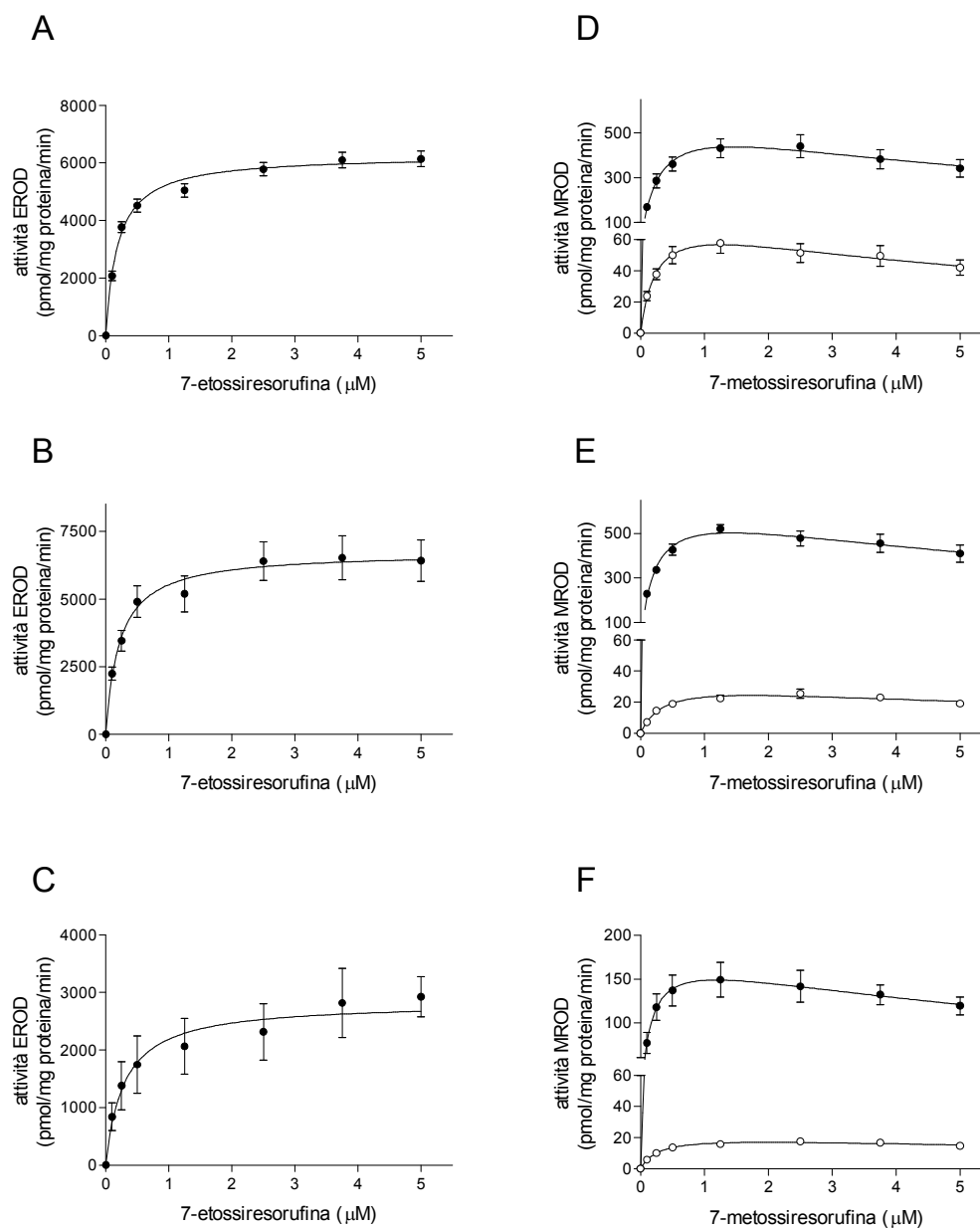


Figura 31 Cinetiche dell'attività EROD (colonna a sinistra) e MROD (colonna a destra). L'attività è stata misurata nei microsomi epatici ottenuti dai ratti sani (A-D), non ascitici (B-E) e ascitici (C-F), controlli (○) o indotti (●) con BaP. I risultati sono le medie \pm S.E.M. dei dati ottenuti da 8 ratti per gruppo. Per ciascun ratto le determinazioni sono state eseguite in doppio.

Nella Tabella 13 sono riportati i parametri cinetici dell'attività EROD misurata sulle frazioni microsomiali epatiche di animali sani, non ascitici e ascitici di controllo e indotti con BaP. Sebbene la proteina CYP1A1 risulti non essere costitutivamente presente nei microsomi

ottenuti da ratti di controllo (Figura 28), è stata osservata una significativa attività EROD, non riportata in tabella, in quanto imputabile all'attività di altre forme CYP (vedere discussione).

Tabella 13 Parametri cinetici dell'attività EROD catalizzata dal CYP1A1.

Ratti	Parametri cinetici		
	V_{max} (pmol/mg/min)	K_m (μ M)	CL_{int} (μ L/mg/min)
Sani controllo	-	-	-
Sani indotti con BaP	6282 \pm 339	0,20 \pm 0,02	34953 \pm 16146
Non ascitici controllo	-	-	-
Non ascitici indotti con BaP	6657 \pm 839	0,21 \pm 0,02	33737 \pm 13291
Ascitici controllo	-	-	-
Ascitici indotti con BaP	2674 \pm 249 ^{§§§,###}	0,20 \pm 0,04	12553 \pm 11315

I risultati sono riportati come valore medio \pm S.D. dei risultati ottenuti da 8 ratti per gruppo. L'analisi statistica tra i diversi gruppi è stata eseguita con il test ANOVA seguito dal test di Newman-Keuls. ^{§§§}p<0,001 vs. il rispettivo gruppo di animali sani. ^{###}p<0,001 vs. il rispettivo gruppo di animali non ascitici.

In seguito al trattamento con BaP, l'attività EROD risulta notevolmente aumentata nei ratti sani e non ascitici rispetto a quelli ascitici. Coerentemente con queste osservazioni, la Tabella 13 mostra che, negli animali indotti, i valori di V_{max} e CL_{int} sono significativamente più alti nei ratti sani e non ascitici rispetto agli ascitici. I valori di K_m sono simili in tutti i gruppi di ratti trattati con BaP a riprova del fatto che l'enzima responsabile della dealchilazione della 7-etossiresorufina è lo stesso negli animali sani, cirrotici non ascitici e ascitici. I risultati relativi alla V_{max} sono ulteriormente visualizzati nella Figura 32.

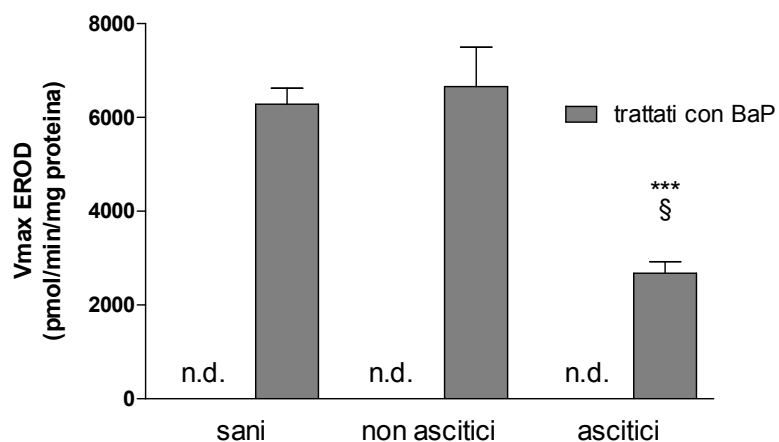


Figura 32 Valori di Vmax dell'attività EROD nei gruppi di ratti controllo e indotti a BaP (media \pm S.E.M.). N.d. non determinata. *** $p < 0,001$ vs. il rispettivo gruppo di animali di controllo. § $p < 0,05$ vs. il rispettivo gruppo di animali sani.

Nella Tabella 14 sono riportati i parametri cinetici dell'attività MROD misurata sulle frazioni microsomiali epatiche di animali sani, non ascitici e ascitici di controllo e indotti con BaP. Anche in questo caso, i valori di K_m sono molto simili in tutti i gruppi di ratti, a riprova del fatto che lo stesso enzima catalizza l'attività MROD nei ratti di controllo e trattati a BaP. Come per l'attività EROD, la V_{max} e la CL_{int} dell'attività MROD risultano significativamente aumentate, a livelli simili, nei ratti sani e non ascitici trattati con BaP mentre si osserva un livello significativamente inferiore di induzione nei ratti ascitici.

Tabella 14 Parametri cinetici dell'attività MROD catalizzata dal CYP1A2.

Ratti	Parametri cinetici			
	V_{max} (pmol/mg/min)	K_m (μ M)	K_{si} (μ M)	CL_{int} (μ L/mg/min)
Sani controllo	82,6 \pm 7,3	0,26 \pm 0,01	6,08 \pm 1,65	310 \pm 72
Sani indotti con BaP	635,2 \pm 47,1 ^{***}	0,29 \pm 0,03	7,05 \pm 1,23	2134 \pm 384 ^{***}
Non ascitici controllo	40,79 \pm 1,79 ^{§§§}	0,29 \pm 0,05	6,34 \pm 6,23	106 \pm 0,1 ^{§§}
Non ascitici indotti con BaP	658,1 \pm 37,5 ^{***}	0,27 \pm 0,03	7,48 \pm 4,91	3548 \pm 1132 ^{***,§}
Ascitici controllo	26,5 \pm 1,4 ^{§§§,#}	0,28 \pm 0,05	8,49 \pm 3,51	106 \pm 57 ^{§§}
Ascitici indotti con BaP	184,3 \pm 13,2 ^{***,§§§,###}	0,28 \pm 0,05	14,11 \pm 6,04	1007 \pm 709 ^{***,##}

I risultati sono riportati come valore medio \pm S.D. dei risultati ottenuti da 8 ratti per gruppo. L'analisi statistica tra i diversi gruppi è stata eseguita con il test ANOVA seguito dal test di Newman-Keuls. *** p <0,001 vs. il rispettivo gruppo di animali di controllo. § p <0,05, §§ p <0,01 e §§§ p <0,001 vs. il rispettivo gruppo di animali sani. # p <0,05, ## p <0,01 e ### p <0,001 vs. il rispettivo gruppo di animali non ascitici.

La Figura 33 mette in evidenza che l'attività basale del CYP1A2 diminuisce all'aumentare della compromissione della funzionalità epatica e che il BaP induce l'attività in modo significativamente inferiore nei ratti ascitici.

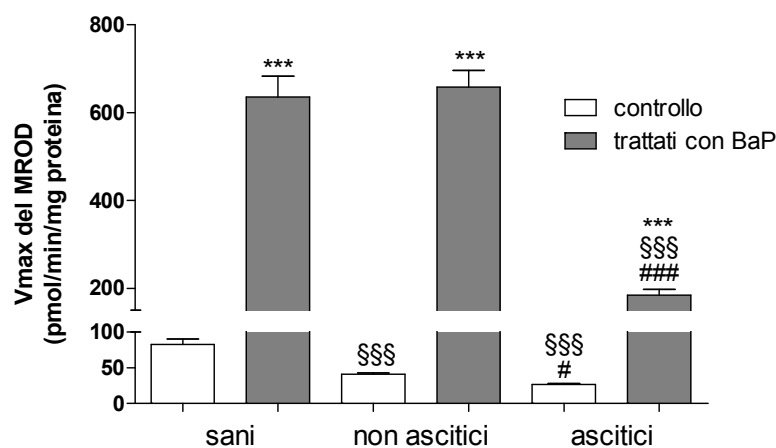


Figura 33 Confronto tra i valori di V_{max} delle attività EROD e MROD nei gruppi di ratti controllo e indotti con BaP. *** p <0,001 vs. il rispettivo gruppo di animali di controllo. §§§ p <0,001 vs. il rispettivo gruppo di animali sani. # p <0,05 e ### p <0,001 vs. il rispettivo gruppo di animali non ascitici.

Poiché il BaP induce i CYP1A tramite l'interazione con il recettore AhR, sono stati misurati i livelli di espressione genica e proteica di tale recettore per vedere se fosse modificata in qualche modo la sua espressione. La Figura 34 mostra che l'espressione genica costitutiva di AhR è comparabile nei ratti sani, non ascitici e ascitici, mentre il trattamento con BaP induce significativamente l'espressione genica in tutti e tre i gruppi di ratti, anche se in maniera sensibilmente minore negli animali ascitici.

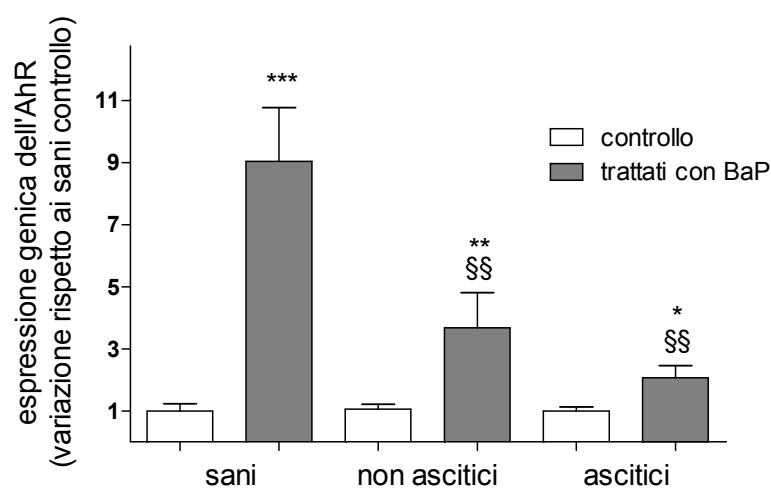


Figura 34 Livelli di trascrizione genica dell'AhR nei ratti di controllo ed indotti con BaP. I dati sperimentali riguardanti l'mRNA dell'AhR sono presentati in rapporto ai ratti sani controllo (media \pm S.E.M.), il cui valore è stato arbitrariamente posto pari a 1. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ vs. il rispettivo gruppo di animali di controllo. §§ $p < 0,01$ vs. il rispettivo gruppo di animali sani.

In Figura 35 è rappresentato un *Western blot* esemplificativo dell'espressione proteica dell'AhR effettuato sugli omogenati totali dei fegati dei ratti esaminati.

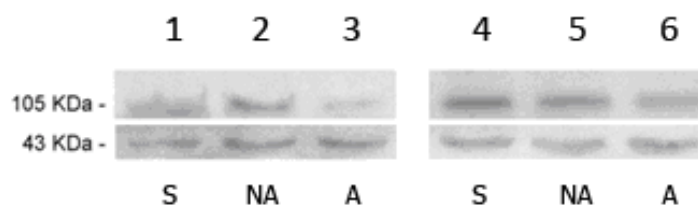


Figura 35 Western blot esemplificativo dell'espressione proteica dell'AhR. La banda a 105 KDa rappresenta l'AhR, mentre quella a 43 KDa la β -actina utilizzata come *loading control*. Lane 1-3: ratti di controllo sani, non ascitici e ascitici, nell'ordine. Lane 4-6: ratti indotti con BaP sani, non ascitici e ascitici, nell'ordine.

In contrasto con i risultati della qRT-PCR, l'analisi dei livelli della proteina AhR ha rivelato che l'espressione basale della proteina è significativamente ridotta nei ratti ascitici (Figura 36).

Tuttavia, l'andamento dell'induzione prodotta dal BaP è del tutto paragonabile a quello osservato per l'espressione genica dell'AhR, poichè si osserva una riduzione significativa dell'induzione nei ratti ascitici rispetto ai ratti sani e non ascitici.

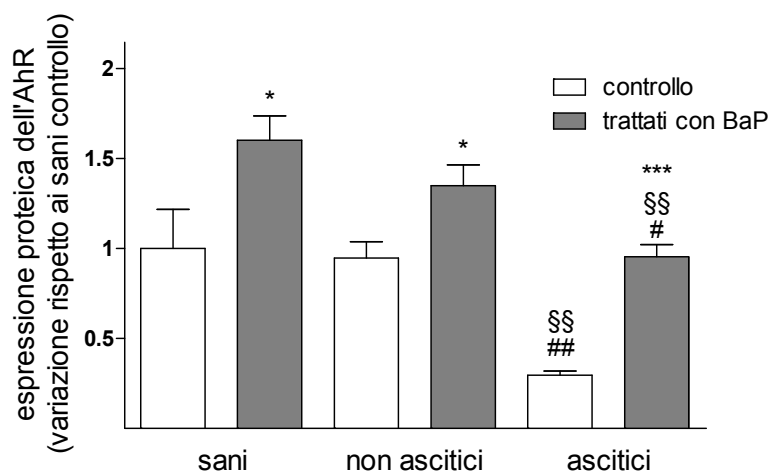


Figura 36 Analisi densitometrica delle bande dell'AhR. I risultati sono riportati come medie \pm S.E.M della variazione rispetto ai ratti sani di controllo. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,01$ vs. il rispettivo gruppo di animali di controllo. §§ $p < 0,01$ vs. il rispettivo gruppo di animali sani. # $p < 0,05$ e ## $p < 0,01$ vs. il rispettivo gruppo di animali non ascitici.

4.3 Effetto della cirrosi sull'induzione dei CYP3A

Il protocollo sperimentale per lo studio sull'effetto della cirrosi dall'induzione dei CYP3A è identico a quello utilizzato per l'induzione dei CYP1A, salvo che agli animali è stato somministrato come induttore desametasone, in luogo di BaP. Analogamente al precedente studio, è stata valutata l'espressione genica e proteica del CYP3A e del recettore che ne controlla la trascrizione (PXR). La sottofamiglia dei CYP3A nel ratto è composta essenzialmente da due isoforme: CYP3A1 e CYP3A2, ortologhe del CYP3A4 umano. È stata valutata anche l'attività enzimatica delle due isoforme utilizzando come reazioni *marker* le attività di idrossilazione del midazolam e del testosterone.

Anche in questo caso gli animali sono stati stratificati in gruppi in seguito ai risultati degli esami biochimici e dell'esame istologico del tessuto epatico. I risultati di questi esami sono riportati nella Tabella 15.

Tabella 15 Test biochimici e punteggio dell'esame istologico.

	<i>Sani controllo</i>	<i>Sani DEX</i>	<i>Non ascitici controllo</i>	<i>Non ascitici DEX</i>	<i>Ascitici controllo</i>	<i>Ascitici DEX</i>
Albumina (g/L)	40±3	38±6	33±3 ^{§§§}	30±4 ^{§§}	31±2 ^{§§§}	28±5 [§]
AST (U/L)	116±28	184±52 ^{***}	127±33	197±58 [*]	168±22 ^{§§§,#}	240±40 ^{***}
ALT (U/L)	41±9	185±46 ^{***}	58±11 [§]	160±36 ^{***}	85±24 ^{§§§,##}	221±3 ^{***}
Contenuto di CYP totale (nmol/mg proteina)	0,710±0,246	1,058±0,295 [*]	0,667±0,181	1,093±0,22 ^{**}	0,577±0,172	0,964±0,247 [*]
Score di Ishak (0-6)	0 (0-0)	0 (0-0)	4 (3-5)	4 (3-5)	6	6

I risultati sono riportati come medie ± D.S. L'analisi statistica dei dati è stata eseguita mediante analisi della varianza ad una via (ANOVA) seguita dal test di Newman-Keuls. * p<0,05, ** p<0,01 e *** p<0,001 vs. il rispettivo gruppo di animali di controllo. [§]p<0,05, ^{§§}p<0,01 e ^{§§§}p<0,001 vs. il rispettivo gruppo di animali sani. # p<0,05 e ## p<0,01 vs. il rispettivo gruppo di animali non ascitici.

Negli animali di controllo, l'albuminemia decresce progressivamente in modo significativo negli animali non ascitici e ascitici. Simile è il progressivo aumento dell'ALT, mentre l'AST aumenta significativamente solo negli ascitici. Nei ratti indotti con DEX, l'albuminemia

diminuisce in modo simile a quello osservato nei ratti di controllo, a dimostrazione che il trattamento con DEX non influisce sulla funzionalità epatica. Al contrario, gli elevati valori di AST e ALT negli indotti sani, che non differiscono da quelli misurati negli indotti cirrotici, sono dovuti all'effetto inducente del DEX su questi enzimi⁴³. Sia nei ratti di controllo che indotti il contenuto di CYP totale tende a diminuire col progredire della cirrosi, ma non in misura significativa neppure nei ratti ascitici, a differenza di quanto osservato per lo studio sul CYP1A. La discordanza di risultati tra le due indagini è dovuta alla maggior variabilità del contenuto di CYP verificatasi in questo studio. L'analisi statistica della potenza ha dimostrato infatti che, con una tale imprevista variabilità, sarebbero stati necessari 10 ratti per gruppo affinché la differenza osservata risultasse statisticamente significativa. La Tabella 15 mostra inoltre che il trattamento con DEX causa un incremento del 50-65% del CYP totale, di simile entità nei ratti sani e nei due gruppi di ratti cirrotici. Questo notevole incremento è giustificato dal fatto che la sottofamiglia 3A rappresenta circa il 30% del CYP totale.

I valori del punteggio di Ishak derivanti dall'esame istologico del tessuto epatico confermano nella sostanza i dati di laboratorio, come già osservato nella serie di animali esaminati per lo studio sui CYP1A. Complessivamente i dati di cui sopra indicano che il danno epatico è di grado moderato nei ratti con cirrosi non ascitica e di grado severo negli ascitici.

La Figura 37 riporta l'espressione genica del CYP3A1. Nei gruppi di ratti non indotti risulta evidente che la cirrosi non provoca alcuna diminuzione significativa della trascrizione del gene *CYP3A1*. Il trattamento con DEX causa un incremento variabile, ma comunque molto elevato, dei livelli di espressione genica. Le differenze di induzione tra ratti sani e cirrotici non ascitici non risultano significative, mentre nei ratti ascitici si osserva un'induzione significativamente inferiore che nei ratti sani.

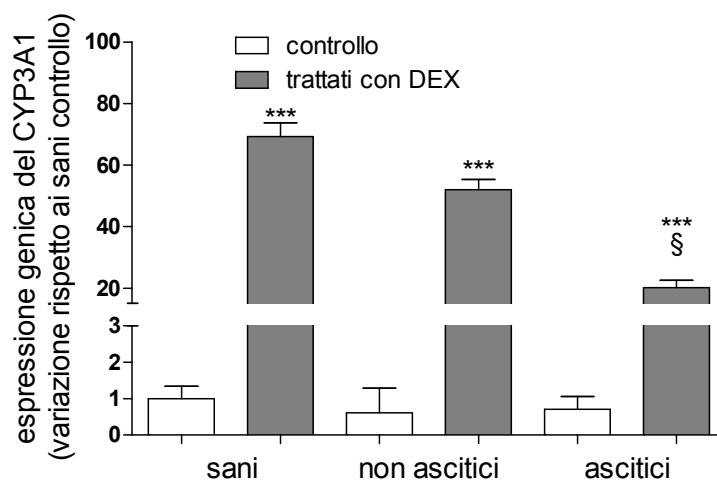


Figura 37 Livelli di trascrizione genica del CYP3A1 nei ratti di controllo ed indotti con DEX. I dati sperimentali riguardanti l'mRNA del CYP3A1 sono presentati in rapporto a quelli dei ratti sani di controllo (media \pm S.E.M.), il cui valore è stato arbitrariamente posto pari a 1. *** $p < 0,001$ vs. il rispettivo gruppo di animali di controllo. § $p < 0,05$ vs. il rispettivo gruppo di animali sani.

Nella Figura 38 sono riportati i risultati dell'analisi qRT-PCR sul gene *CYP3A2*. Come per il *CYP3A1* l'espressione genica basale non è significativamente modificata nei ratti cirrotici rispetto ai sani, mentre il trattamento con DEX causa un significativo aumento della trascrizione di mRNA nei ratti sani e nei cirrotici non ascitici. In accordo con i risultati di altri autori⁴⁴, il grado d'induzione è però molto minore (circa 10 volte) rispetto a quello osservato con il *CYP3A1*. Diversamente dal *CYP3A1*, non vi è invece alcun incremento della trascrizione di mRNA nei ratti cirrotici ascitici.

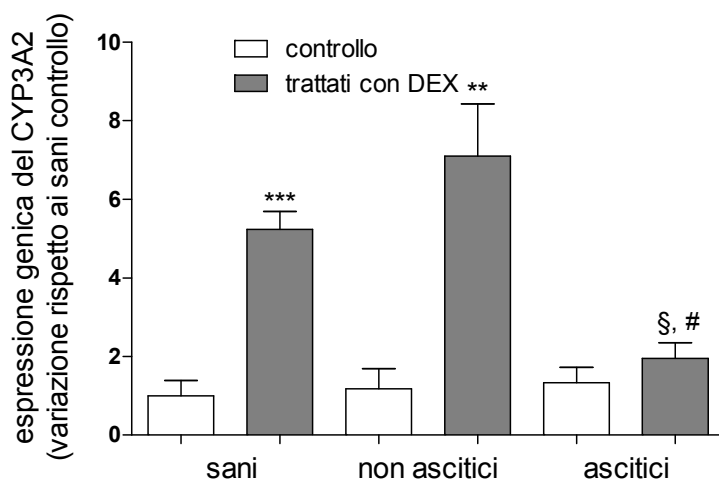


Figura 38 Livelli di trascrizione genica del CYP3A2 nei ratti di controllo ed indotti con DEX. (A) I dati sperimentali riguardanti l'mRNA del CYP3A2 sono presentati in rapporto a quelli dei ratti sani di controllo (media \pm S.E.M.), il cui valore è stato posto arbitrariamente pari a 1. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ vs. il rispettivo gruppo di animali di controllo. § $p < 0,05$ vs. il rispettivo gruppo di animali sani. # $p < 0,05$ vs. il rispettivo gruppo di animali con cirrosi non ascitica.

È stata quantificata l'espressione proteica delle due isoforme di CYP3A effettuando un'analisi *Western Blot* delle preparazioni microsomiali dei ratti sani e cirrotici di controllo e indotti con DEX. La Figura 39 mostra un *Western blot* rappresentativo dell'espressione di CYP3A1 dei sei gruppi di ratti nonché dei citocromi ricombinanti 3A1 e 3A2 (lane 1 e 2).

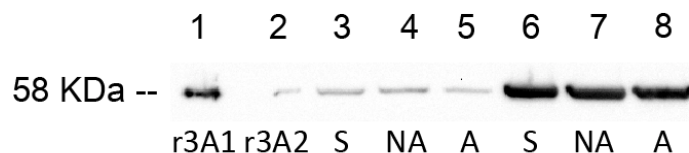


Figura 39 Western blot esemplificativo dell'espressione proteica del CYP3A1. Come standard di riferimento, CYP3A1 e CYP3A2 ricombinanti sono stati caricati nelle lane 1 e 2 rispettivamente. Lane 3-5: ratti di controllo sani (S), cirrotici non ascitici (NA) ed ascitici (A), nell'ordine. Lane 6-8: ratti trattati con DEX sani (S), cirrotici non ascitici (NA) e ascitici (A).

I risultati del *Western Blot* sono riportati quantitativamente nella Figura 40. Essi appaiono coerenti con quelli ottenuti mediante qRT-PCR (Figura 37) sia per quanto riguarda i ratti di controllo che quelli indotti. La cirrosi non ha, infatti, alcun effetto significativo sui livelli basali di proteina CYP3A1, mentre il DEX induce significativamente l'espressione di CYP3A1 sia nei ratti sani che nei due gruppi di ratti cirrotici. La mancanza di una perfetta proporzionalità tra l'espressione genica e proteica, nell'ambito dei ratti indotti, può essere dovuta alla, seppur

limitata, reattività crociata dell'anticorpo anti-CYP3A1 con il CYP3A2, la quale pregiudica l'ottenimento di risultati quantitativamente precisi per quanto riguarda la proteina CYP3A1.

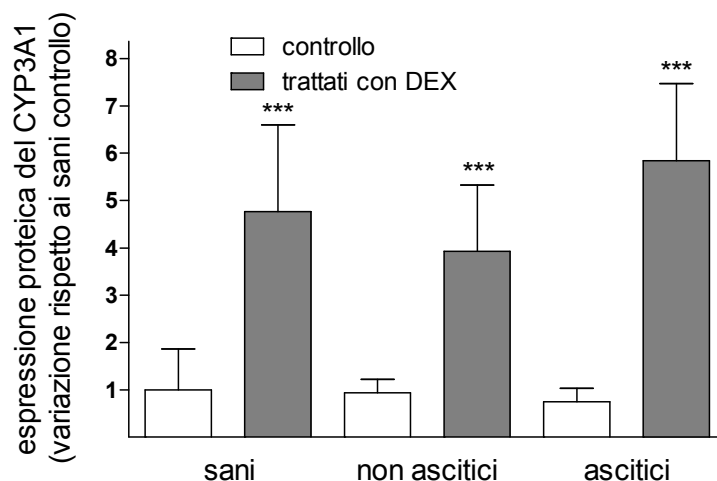


Figura 40 Analisi densitometrica delle bande di CYP3A1. I risultati sono riportati come medie \pm S.E.M. L'analisi statistica dei dati è stata eseguita mediante analisi della varianza ad una via (ANOVA) seguita dal test di Newman-Keuls. *** $p < 0,001$ vs. il rispettivo gruppo di animali di controllo.

La Figura 41 mostra un *Western Blot* rappresentativo, ottenuto mediante anticorpo anti-CYP3A2, con i microsomi dei 6 gruppi di ratti e con microsomi esprimenti gli enzimi ricombinanti. A differenza dell'anticorpo anti-CYP3A1, questo anticorpo risulta assolutamente specifico in quanto nessuna banda è rilevabile nella *lane* del CYP3A1 ricombinante.

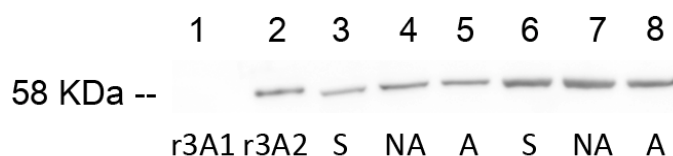


Figura 41 Western blot esemplificativo dell'espressione proteica di CYP3A2. Come standard di riferimento, CYP3A1 e CYP3A2 ricombinanti sono stati caricati nelle *lane* 1 e 2 rispettivamente. *Lane* 3-5: ratti di controllo sani (S), cirrotici non ascitici (NA) ed ascitici (A), nell'ordine. *Lane* 6-8: ratti trattati con DEX sani (S), cirrotici non ascitici (NA) e ascitici (A).

Anche per il CYP3A2 i risultati del *Western Blot* (Figura 42) sono coerenti con quelli ottenuti con la qRT-PCR (Figura 38), in quanto vi è un piccolo, ma non significativo, incremento dei livelli basali di proteina CYP3A2 nei ratti cirrotici. Inoltre il DEX causa una significativa induzione nei ratti sani e con cirrosi non ascitica, mentre non ci sono differenze significative tra gli animali ascitici indotti e non indotti.

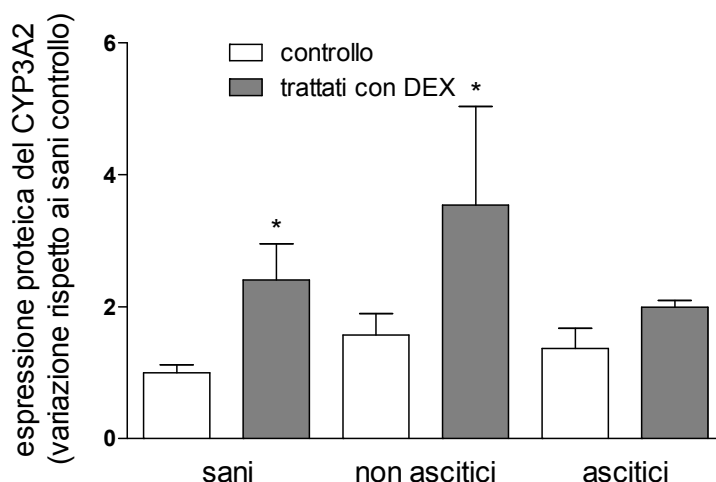


Figura 42 Analisi densitometrica delle bande di CYP3A2. I risultati sono riportati come medie \pm S.E.M. L'analisi statistica dei dati è stata eseguita mediante analisi della varianza ad una via (ANOVA) seguita dal test di Newman-Keuls. * $p < 0,05$ vs. il rispettivo gruppo di animali di controllo.

Le reazioni *marker* generalmente usate per valutare l'attività del CYP3A nel ratto sono la 4- e la 1'-idrossilazione del midazolam e la 6 β -idrossilazione del testosterone. Sebbene queste attività siano considerate reazioni specifiche per la sottofamiglia CYP3A^{10,45}, è stata preventivamente verificata tale specificità sui ratti in esame effettuando studi di inibizione con il clotrimazolo. Questo antimicotico azolico è un inibitore potente e selettivo della sottofamiglia CYP3A ed è attivo a concentrazioni nM, alle quali ha scarso o nullo effetto inibitorio su altre isoforme di CYP³⁵.

La Figura 43 mostra che già alla concentrazione di 50 nM il clotrimazolo inibisce completamente l'attività 6 β -testosterone-idrossilasica delle preparazioni microsomiali di tutti i gruppi di ratti studiati, a dimostrazione che l'attività enzimatica osservata è effettivamente dovuta a isoforme della sottofamiglia CYP3A. I valori di IC₅₀ (concentrazione che causa l'inibizione del 50% della reazione enzimatica) sono riportati nella Tabella 16 e risultano paragonabili a quelli precedentemente osservati nei ratti Sprague-Dawley³⁵, a dimostrazione del fatto che i microsomi dei ratti Wistar da noi studiati hanno una sensibilità simile all'azione del clotrimazolo.

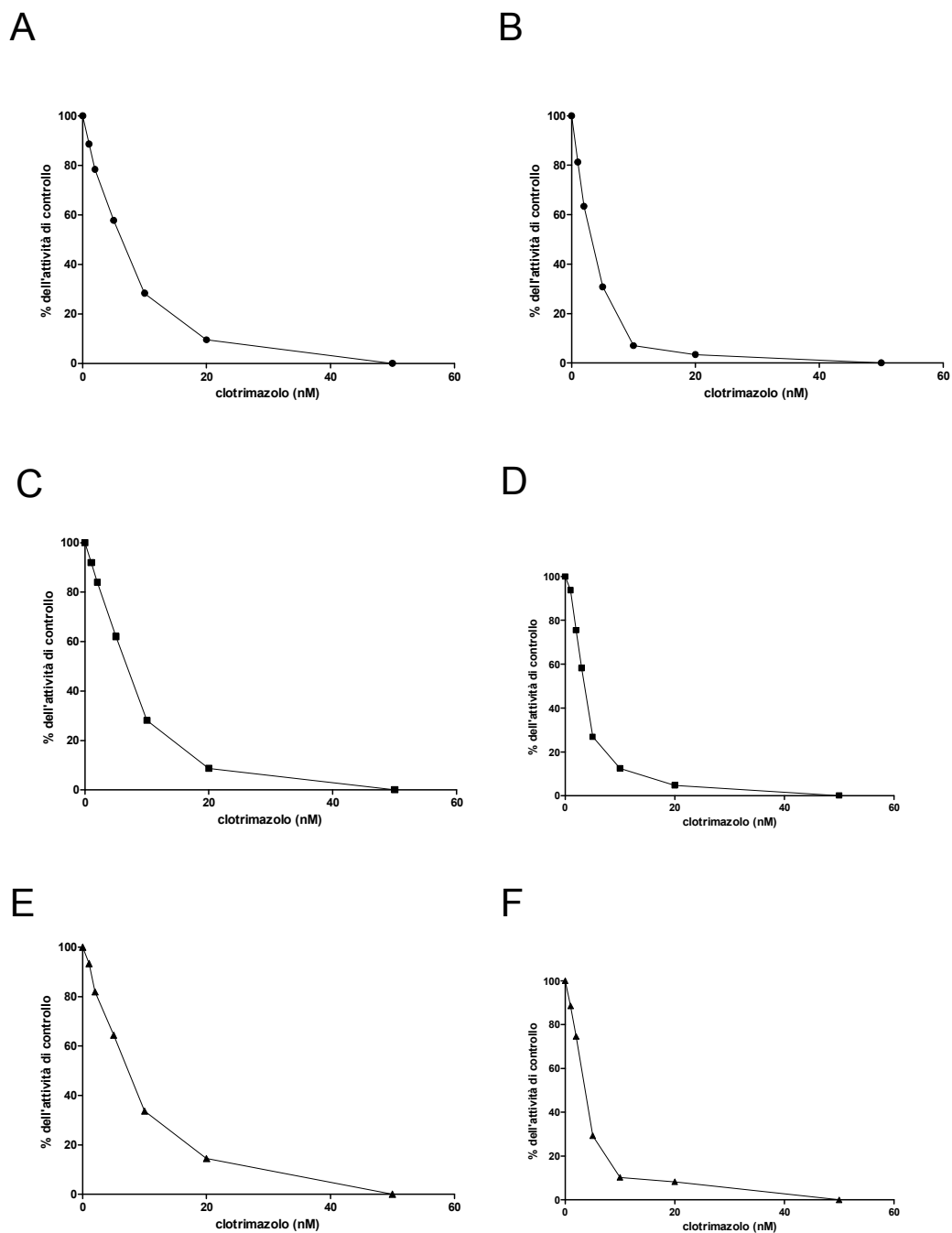


Figura 43 Effetti inibitori del clotrimazolo sull'attività 6 β -testosterone idrossilasica. L'attività è stata misurata in *pool* di preparazioni microsomiali ottenuti miscelando i microsomi di tutti i ratti componenti ciascun gruppo. (A) sani controllo; (B) sani indotti; (C) cirrotici non ascitici controllo; (D) cirrotici non ascitici indotti; (E) ascitici controllo; (F) ascitici indotti.

Tabella 16 Concentrazione di clotrimazolo che inibisce per il 50% (IC_{50}) l'attività 6 β -testosterone idrossilasica.

	IC_{50} (nM)
Sani controllo	6,29
Sani indotti	3,11
Non ascitici controllo	6,80
Non ascitici indotti	3,49
Ascitici controllo	7,18
Ascitici indotti	3,62

La Figura 44 mostra che il clotrimazolo inibisce completamente alla concentrazione di 20 nM la 4-idrossilasilazione del midazolam nelle preparazioni microsomiali di tutti i gruppi di ratti studiati, a dimostrazione che anche questa reazione è catalizzata solamente dalla sottofamiglia CYP3A. I valori di IC_{50} sono riportati nella Tabella 17 e risultano tutti inferiori a 5 nM, a conferma della potenza del clotrimazolo come inibitore.

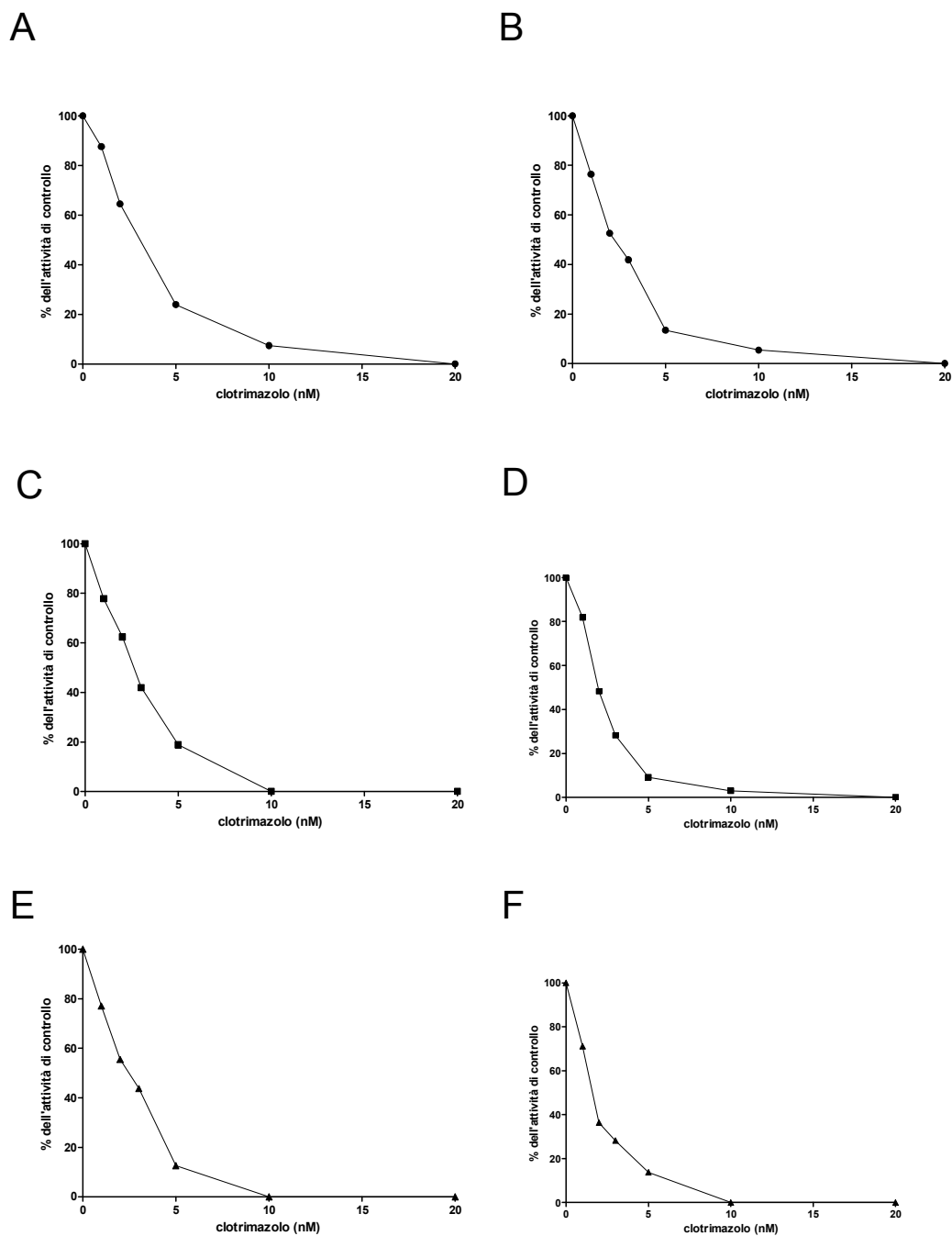


Figura 44 Effetti inibitori del clotrimazolo sulla 4-idrossilazione del midazolam. L'attività è stata misurata in *pool* di preparazioni microsomiali ottenuti miscelando i microsomi di tutti i ratti componenti ciascun gruppo. (A) sani controllo; (B) sani indotti; (C) cirrotici non ascitici controllo; (D) cirrotici non ascitici indotti; (E) ascitici controllo; (F) ascitici indotti.

Tabella 17 Concentrazione di clotrimazolo che inibisce per il 50% (IC_{50}) la reazione di 4-idrossilazione del midazolam.

	IC_{50} (nM)
Sani controllo	3,15
Sani indotti	2,22
Non ascitici controllo	2,60
Non ascitici indotti	1,93
Ascitici controllo	2,43
Ascitici indotti	1,55

Dopo aver confermato la specificità per la famiglia CYP3A delle due reazioni *marker*, sono stati effettuati gli studi cinetici sulle preparazioni microsomiali di tutti i gruppi di ratti in esame.

Le cinetiche di formazione del 6 β -idrossitestosterone sono mostrate nella Figura 45. Nell'intervallo di concentrazioni di TST usate, il modello che meglio descrive i dati cinetici è quello di Michaelis-Menten a due siti, che considera l'attività di due enzimi che agiscono sul medesimo substrato. I grafici della Figura 45 mostrano chiaramente che l'attività 6 β -testosterone idrossilasica complessiva è considerevolmente più elevata negli animali trattati con DEX.

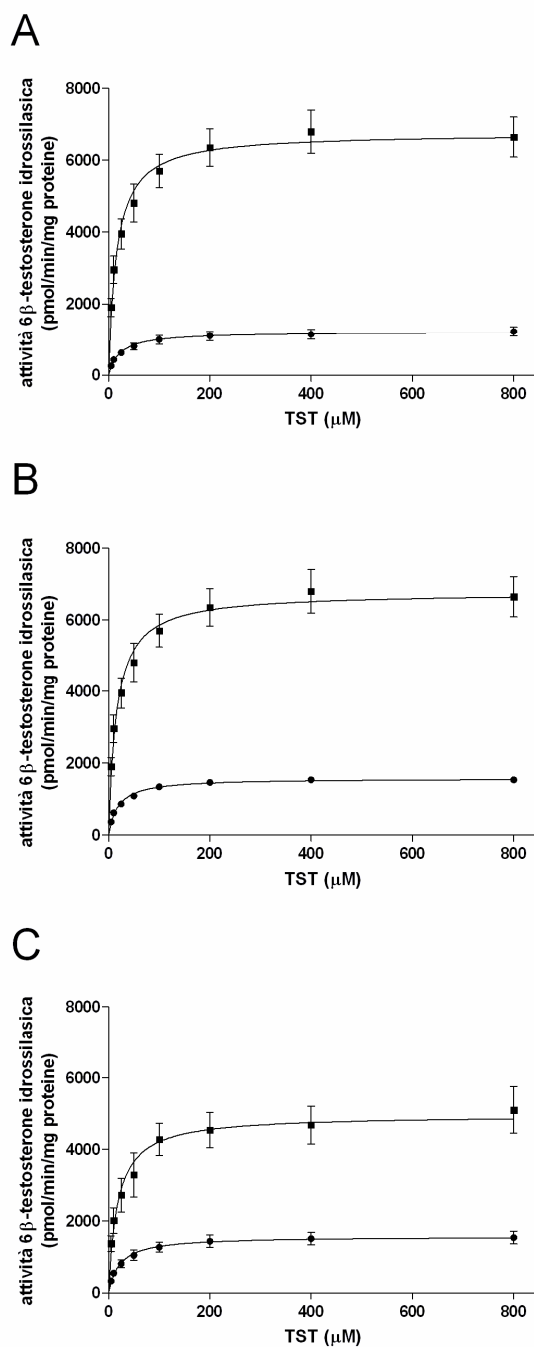


Figura 45 Cinetiche dell'attività 6β -testosterone idrossilasica. L'attività è stata misurata nei microsomi epatici ottenuti dai ratti sani (A), non ascitici (B) e ascitici (C), (●) controlli (■) indotti con DEX. I risultati sono le medie \pm S.E.M. dei dati ottenuti da 8 ratti per gruppo. Per ciascun ratto le determinazioni sono state eseguite in doppio. L'S.E.M. non è mostrato dove la grandezza del simbolo è maggiore di quella della barra dello S.E.M.

Per individuare a quale delle isoforme CYP3A1 e CYP3A2 attribuire i parametri cinetici ottenuti dalle curve di attività, sono stati determinati i parametri cinetici dei due enzimi ricombinanti. La Tabella 18 riporta i valori di V_{max} e K_m misurati nei microsomi esprimenti CYP3A1 e CYP3A2 ricombinanti. Mentre le V_{max} sono alquanto simili, le K_m dei due enzimi sono di un ordine di grandezza diverse, essendo quella del CYP3A1 più di 10 volte maggiore di quella del CYP3A2. In base a questi risultati è stata attribuita al CYP3A1 l'attività con la K_m maggiore e al CYP3A2 l'attività con la K_m di un ordine di grandezza minore.

Tabella 18 Parametri cinetici degli enzimi ricombinanti per la 6 β -idrossilazione del testosterone.

	V_{max} (<i>pmol/pmol/min</i>)	K_m (μM)
Ricombinante 3A1	5,29 \pm 1,03	34,35 \pm 1,67
Ricombinante 3A2	7,39 \pm 0,32	2,63 \pm 0,12

La Tabella 19 riporta i parametri cinetici dell'attività 6 β -testosterone idrossilasica misurati nelle preparazioni microsomiali dei ratti di controllo e indotti con DEX. In accordo con i dati ottenuti dalle analisi qRT-PCR e Western blot, la V_{max} del CYP3A1 è significativamente aumentata in tutti e tre i gruppi di ratti indotti, mentre la V_{max} del CYP3A2 è aumentata in modo significativo negli animali indotti sani e non ascitici, ma non negli ascitici. I valori di K_m risultano simili in tutti i gruppi di ratti analizzati e paragonabili a quelle degli enzimi ricombinanti, a riprova del fatto che tale reazione è catalizzata dai CYP3A.

Tabella 19 Parametri cinetici della reazione 6 β -testosterone idrossilasica catalizzata dai CYP3A1 e CYP3A2 microsomiali dei diversi gruppi di ratti di controllo e trattati con DEX

	CYP3A1		CYP3A2	
	V _{max} (pmol/mg/min)	K _m (μ M)	V _{max} (pmol/mg/min)	K _m (μ M)
Sani controllo	984 \pm 636	64 \pm 25	374 \pm 175	5,27 \pm 3,59
Sani indotti	5275 \pm 1091 ^{***}	45 \pm 9	1561 \pm 903 ^{***}	2,69 \pm 1,41
Non ascitici controllo	1224 \pm 325	48 \pm 13	508 \pm 267	4,21 \pm 1,56
Non ascitici indotti	4302 \pm 1215 ^{***}	47 \pm 17	2853 \pm 1502 ^{**}	5,17 \pm 3,53
Ascitici controllo	1081 \pm 298	55 \pm 15	468 \pm 224	4,85 \pm 0,64
Ascitici indotti	3330 \pm 423 ^{***,§}	48 \pm 9	1005 \pm 598 ^{#,§}	2,74 \pm 2,37

I risultati sono riportati come valore medio \pm S.D. dei risultati ottenuti da 8 ratti per gruppo. L'analisi statistica tra i diversi gruppi è stata eseguita con il test ANOVA seguito dal test di Newman-Keuls. ^{**}p<0,01 e ^{***}p<0,001 vs. il rispettivo gruppo di animali di controllo. [§]p<0,05 vs. il rispettivo gruppo di animali sani. [#]p<0,05 vs. il rispettivo gruppo di animali non ascitici.

Questi risultati sono ulteriormente rappresentati nella Figura 46, in cui si evidenzia anche che la cirrosi non ha alcun effetto significativo sull'attività basale dei due enzimi.

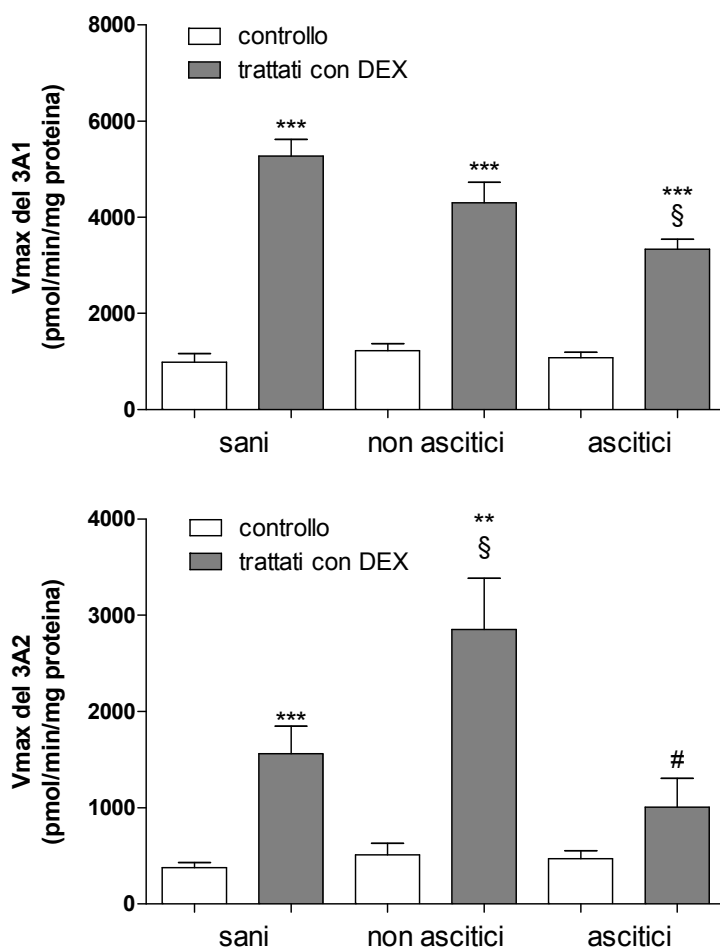


Figura 46 Confronto tra i valori di V_{max} dell'attività 6 β -testosterone idrossilasica nei gruppi di ratti studiati. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ vs. il rispettivo gruppo di animali di controllo. § $p < 0,05$ vs. il rispettivo gruppo di animali sani. # $p < 0,05$ vs. il rispettivo gruppo di animali non ascitici.

Le cinetiche di formazione di 4-OH-MDZ e 1'-OH-MDZ sono riportate nella Figura 47. Nell'intervallo di concentrazioni di midazolam usate, il modello cinetico che meglio descrive i dati cinetici è quello di Michaelis-Menten con inibizione da substrato per entrambe le reazioni *marker*. I grafici evidenziano che le attività complessive di 4- e 1'-idrossilazione del midazolam sono considerevolmente più elevate negli animali trattati con DEX.

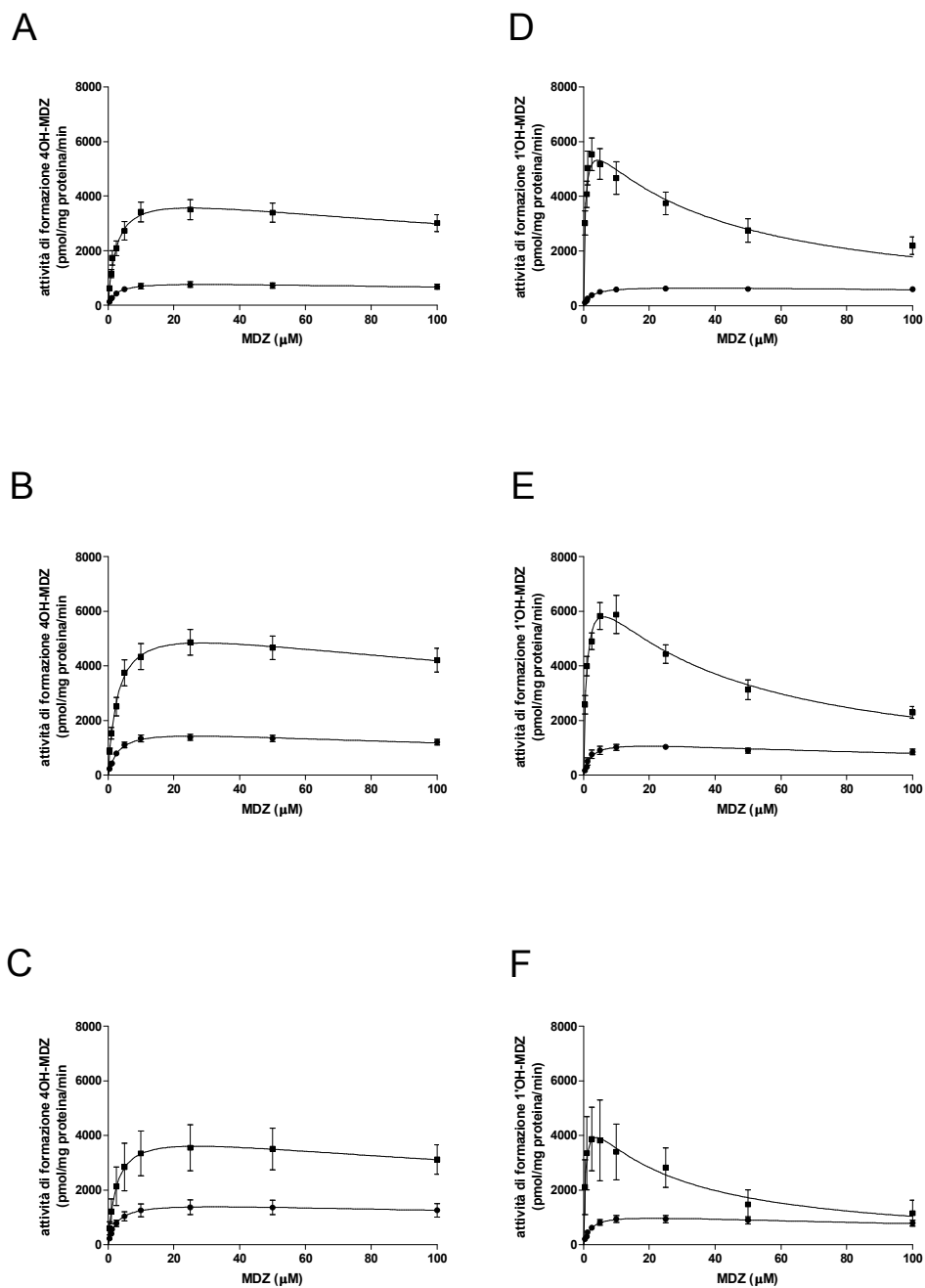


Figura 47 Cinetiche dell'attività di idrossilazione del MDZ in posizione 4 (colonna a sinistra) e 1' (colonna a destra). L'attività è stata misurata nei microsomi epatici ottenuti dai ratti sani (A-D), non ascitici (B-E) e ascitici (C-F), (●) controlli o (■) indotti con DEX. I risultati sono le medie \pm S.E.M. dei dati ottenuti da 8 ratti per gruppo. Per ciascun ratto le determinazioni sono state eseguite in doppio.

Anche in questo caso abbiamo preliminarmente determinato i parametri cinetici dei due enzimi ricombinanti. La Tabella 20 riporta i valori di V_{max} , K_m e K_{si} misurati nei microsomi esprimenti CYP3A1 e CYP3A2 ricombinanti. Le K_m dei due enzimi sono molto simili, quindi non si può discriminare a quale dei due enzimi appartenga l'attività osservata, essendo presenti in proporzioni non note nelle preparazioni microsomiali dei ratti in studio.

Tabella 20 Parametri cinetici degli enzimi ricombinanti.

	4OH-MDZ			1'OH-MDZ		
	V_{max} (pmol/mg/min)	K_m (μ M)	K_{si} (μ M)	V_{max} (pmol/mg/min)	K_m (μ M)	K_{si} (μ M)
Ricombinante 3A1	1,95 \pm 0,32	3,60 \pm 0,54	-	7,57 \pm 0,87	0,98 \pm 0,14	8,97 \pm 1,31
Ricombinante 3A2	12,72 \pm 1,41	1,72 \pm 0,13	152,6 \pm 4,5	14,25 \pm 1,32	1,42 \pm 0,71	33,99 \pm 5,11

La Tabella 21 e la Figura 48 riportano i parametri cinetici delle reazioni di idrossilazione del midazolam misurati nelle preparazioni microsomiali dei ratti di controllo e indotti con DEX. A differenza di quanto precedentemente osservato nell'uomo e in altri ceppi di ratto^{46,47}, la V_{max} relativa alla formazione di 4OH-MDZ aumenta significativamente nei ratti cirrotici rispetto ai ratti sani di controllo. Il trattamento con DEX aumenta significativamente la V_{max} relativa alla formazione di 4OH-MDZ dei ratti sani e non ascitici, mentre non vi sono differenze significative tra ratti ascitici di controllo e indotti. Per quanto riguarda la formazione di 1'OH-MDZ, l'andamento della V_{max} è paragonabile a quello osservato per il 4OH-MDZ nei ratti di controllo, mentre l'aumento di attività prodotto dal DEX risulta significativo anche nei ratti ascitici. La più probabile spiegazione per questa apparente incongruenza è che il 4OH-MDZ sia prodotto prevalentemente dal CYP3A2, mentre l'1'OH-MDZ sia prodotto principalmente dal CYP3A1. Dalla Tabella 20 risulta infatti che la K_m (misura inversa dell'affinità) per la 4-idrossilazione è minore con il CYP3A2, mentre la K_m per l'1'-idrossilazione è minore per il CYP3A1.

Tabella 21 Parametri cinetici della reazione di idrossilazione del MDZ catalizzata dai CYP3A1 e CYP3A2 microsomiali dei diversi gruppi di ratti di controllo e trattati con DEX.

	4OH-MDZ			1'OH-MDZ		
	V _{max} (pmol/mg/min)	K _m (μM)	K _{si} (μM)	V _{max} (pmol/mg/min)	K _m (μM)	K _{si} (μM)
Sani controllo	905 ± 469	2,7 ± 0,8	347 ± 162	814 ± 352	3,2 ± 1,6	409 ± 218
Sani indotti	4639 ± 1606 ^{***}	2,9 ± 0,7	298 ± 204	6439 ± 1510 ^{***}	1,4 ± 1,1	81 ± 93 ^{***}
Non ascitici controllo	1750 ± 340 [§]	3,0 ± 0,2	227 ± 20	1444 ± 307 [§]	3,6 ± 1,6	145 ± 46
Non ascitici indotti	5707 ± 921 ^{***,§}	3,7 ± 1,8	260 ± 153	7512 ± 983 ^{***}	1,1 ± 0,6	44 ± 20 ^{***}
Ascitici controllo	1644 ± 862 [§]	3.1 ± 1.2	353 ± 114	1133 ± 510	2,2 ± 1,0	338 ± 164
Ascitici indotti	3608 ± 2264 ^{§,###}	2,7 ± 1,0	260 ± 42	4524 ± 2572 ^{**,#}	0,5 ± 0,4	28 ± 6 ^{***}

I risultati sono riportati come valore medio ± S.D. dei risultati ottenuti da 8 ratti per gruppo. L'analisi statistica tra i diversi gruppi è stata eseguita con il test ANOVA seguito dal test di Newman-Keuls. ^{**}p<0,01 e ^{***}p<0,001 vs. il rispettivo gruppo di animali di controllo. [§]p<0,05 vs. il rispettivo gruppo di animali sani. [#]p<0,05 e ^{###}p<0,001 vs. il rispettivo gruppo di animali non ascitici.

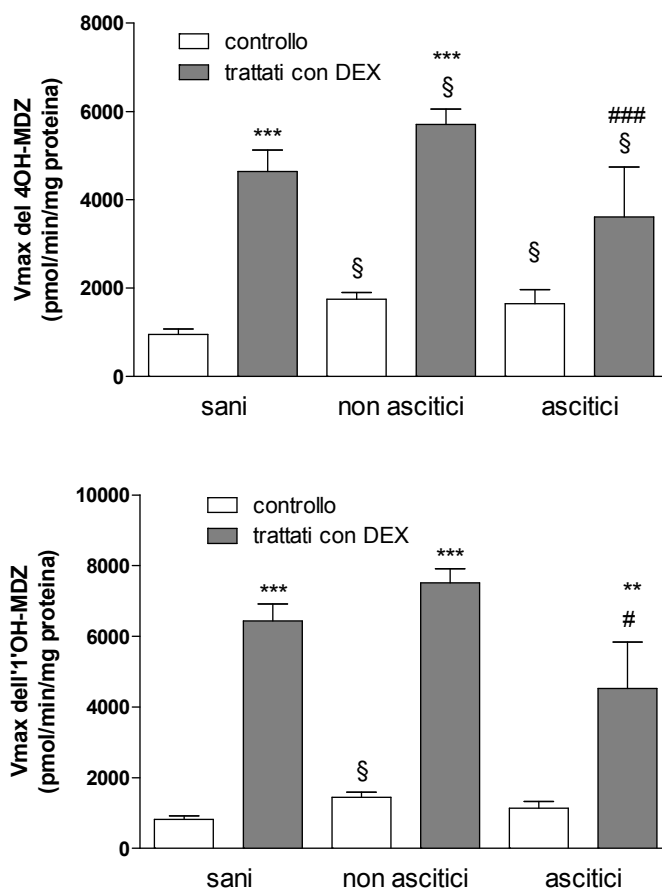


Figura 48 Confronto tra i valori medi di $V_{max} \pm S.E.M.$ delle due reazioni di idrossilazione del MDZ nei gruppi di ratti studiati. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ vs. il rispettivo gruppo di animali di controllo. § $p < 0,05$ vs. il rispettivo gruppo di animali sani. # $p < 0,05$ e ### $p < 0,001$ vs. il rispettivo gruppo di animali non ascitici.

Poiché l'induzione dei CYP3A da parte del DEX è dovuta all'attivazione del recettore nucleare PXR, è stato valutato il possibile effetto del trattamento con DEX sull'espressione genica e proteica del PXR. A differenza di quanto precedentemente osservato per l'Ahr, i livelli di mRNA del PXR non appaiono significativamente modificati nei ratti trattati con DEX e la cirrosi non ha effetto sui livelli basali di espressione genica (Figura 49).

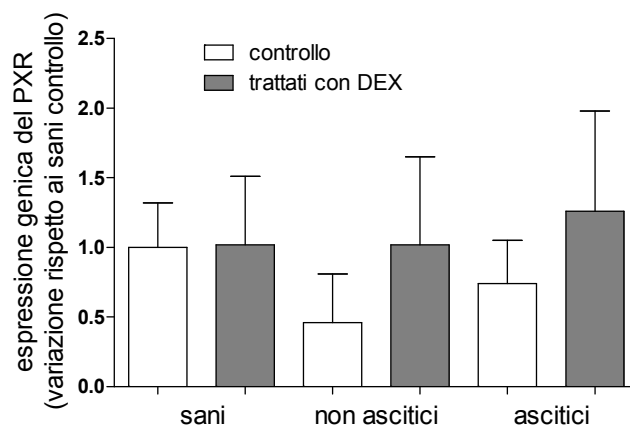


Figura 49 Livelli di trascrizione genica del PXR in ratti controllo e trattati con DEX. I dati sperimentali (medie \pm S.E.M.) riguardanti l'mRNA del PXR sono presentati in rapporto a quelli dei ratti sani di controllo, il cui valore è stato posto arbitrariamente pari a 1.

In accordo con l'espressione genica, i risultati dell'analisi *Western blot*, rappresentati nelle Figura 50 e Figura 51, non hanno evidenziato differenze significative nei gruppi di ratti analizzati.

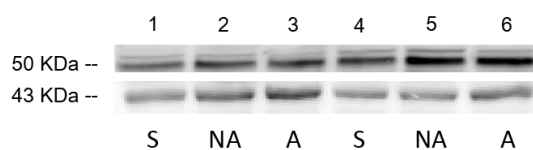


Figura 50 Western blot esemplificativo dell'espressione proteica del PXR. 50 e 43 KDa sono i pesi molecolari di PXR e β -actina, rispettivamente. Lane 1-3: ratti di controllo sani (S), cirrotici non ascitici (NA) ed ascitici (A), nell'ordine; lane 4-6 ratti indotti sani (S), cirrotici non ascitici (NA) ed ascitici (A), nell'ordine.

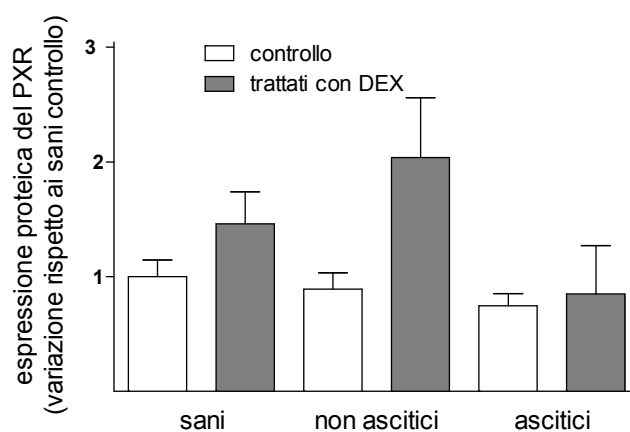


Figura 51 Analisi densitometrica delle bande di PXR su omogenati totali di fegato. I risultati sono riportati come medie \pm S.E.M. L'analisi statistica dei dati, eseguita mediante analisi della varianza ad una via (ANOVA) seguita dal test di Newman-Keuls, non ha indicato alcuna differenza significativa.

Discussione

Nel primo di questi tre studi sono state messe a confronto tre diverse tecniche (qRT-PCR, *Western blot* e determinazione dell'attività enzimatica) per valutare l'induzione dei CYP1A prodotta dal BaP in due ceppi di ratto (Sprague-Dawley e Wistar), i quali, secondo un precedente studio, presentano una diversa sensibilità all'induzione da AhR³⁹. La qRT-PCR ha evidenziato che l'espressione genica basale del CYP1A2 è circa 8 volte superiore nei ratti Wistar rispetto agli Sprague-Dawley, un risultato in sostanziale accordo con quelli ottenuti da Kishida³⁹ che ha riportato un valore di 3 volte superiore nei Wistar. Tuttavia, a differenza di Kishida³⁹, che aveva osservato un'espressione genica di CYP1A1 8 volte superiore nei ratti Wistar, sono stati osservati livelli basali di espressione genica di CYP1A1 trascurabili in entrambi i ceppi di ratto. In accordo con i risultati della qRT-PCR, l'analisi *Western blot* ha confermato che la proteina CYP1A2 è costitutivamente espressa a un livello significativamente più alto nei ratti Wistar, mentre la proteina CYP1A1 non è presente nei microsomi dei ratti non indotti di entrambi i ceppi. I risultati di qRT-PCR e *Western Blot* sono concordi anche per quanto riguarda gli animali indotti con BaP. Sia l'espressione genica e proteica di CYP1A1 che CYP1A2 risultano infatti aumentate in modo significativamente più elevato nei ratti Wistar rispetto agli Sprague-Dawley.

La trascrizione dei CYP1A è indotta dal BaP tramite attivazione dell'AhR, la cui espressione risulta aumentata in seguito a trattamento con vari legandi del recettore stesso. In particolare, Lindros e collaboratori⁴⁰ hanno osservato un aumento significativo dell'espressione genica dell'AhR nel fegato di ratti Wistar trattati con 3-metil-colantrene o β -naftoflavone, e Franc e collaboratori⁴¹ hanno scoperto che la somministrazione di 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-diossina (TCDD) aumenta sia l'espressione genica sia quella proteica di AhR in vari ceppi di ratto. Pertanto, nel tentativo di spiegare le differenze nel grado d'induzione di CYP1A1 e CYP1A2 osservate nei ratti Sprague-Dawley e Wistar, abbiamo valutato l'espressione dell'AhR. Il trattamento con BaP provoca un aumento proporzionale dell'espressione genica e proteica dell'AhR, a conferma del fatto che l'attivazione recettore induce un aumento dell'espressione della proteina aumentandone la trascrizione genica. L'aumento maggiore di CYP1A1 e CYP1A2

osservato nel ceppo Wistar può essere spiegato alla maggiore induzione dell'espressione dell'AhR osservata in questo ceppo.

Negli studi precedenti sull'induzione dei CYP1A sono state confrontate le attività MROD e EROD, basali e indotte, utilizzando una sola concentrazione di substrato, che non fornisce una misura quantitativa dell'induzione, poiché il rapporto tra l'attività nei ratti non indotti e indotti può differire a seconda della concentrazione di substrato a causa di possibili variazioni di K_m . Al contrario, in questo studio è stata effettuata l'analisi cinetica delle attività enzimatiche *marker* per confrontare i parametri cinetici, in particolare i valori di V_{max} , che forniscono una misura quantitativa delle variazioni di attività enzimatica dei CYP1A, e i valori di K_m , che permettono di valutare l'eventuale intervento di altre isoforme di CYP nella reazione enzimatica. Valori diversi di K_m costituiscono infatti una prova inequivocabile del coinvolgimento di enzimi diversi nella stessa reazione, mentre valori uguali di K_m indicano la presenza di un singolo enzima, anche se sono in teoria compatibili con la presenza di due enzimi con affinità molto simile per il substrato. Burke e collaboratori⁷ hanno dimostrato che la 7-etossiresorufina può essere utilizzata come substrato specifico del CYP1A1 solo in microsomi di ratti trattati con induttori dell'AhR, mentre non è selettiva per il CYP1A1 in microsomi di ratti non indotti o trattati con fenobarbital. Al contrario, la 7-metossiresorufina è un *marker* specifico del CYP1A2 sia nei microsomi di ratti di controllo, sia in quelli indotti in seguito all'attivazione dell'AhR. Gli studi d'inibizione effettuati con l' α -naftoflavone (ANF) e la furafillina hanno confermato che i risultati ottenuti da Burke⁷ utilizzando i ratti Sprague-Dawley possono essere estesi anche al ceppo Wistar. Coerentemente con la mancanza della proteina CYP1A1 nei ratti di controllo, l'ANF non inibisce in modo apprezzabile l'attività EROD basale che, secondo osservazioni precedenti, è dovuta principalmente al CYP2C6 e, in misura molto minore, al CYP1A2^{7,48}. Per contro, nei ratti trattati con BaP, l'ANF provoca l'inibizione totale dell'attività EROD a conferma del fatto che anche nel ceppo Wistar tale attività è specifica per il CYP1A1 solo nei ratti indotti con PAH. L'ANF provoca l'inibizione completa dell'attività MROD in entrambi i ceppi di ratti, di controllo e trattati con BaP, escludendo quindi il contributo di altre isoforme di CYP. Dato che il CYP1A1 non è espresso nel fegato dei ratti di controllo, questi dati indicano che l'attività MROD in questo gruppo di animali è catalizzata solo dal CYP1A2. L'inibizione pressoché totale

dell'attività MROD prodotta dalla furafillina nei ratti trattati con BaP conferma che in questi ratti tale attività è specifica per il CYP1A2. Sebbene la selettività della furafillina nel ratto non sia assoluta per il CYP1A2, poiché provoca anche l'inibizione di alcune isoforme del CYP2C⁴⁸, i risultati degli esperimenti d'inibizione con l'ANF escludono qualsiasi coinvolgimento di altri CYP nell'attività MROD. Pertanto, le attività EROD e MROD possono essere utilizzate come reazioni marker per misurare l'attività indotta di CYP1A1 e CYP1A2, rispettivamente.

Un confronto tra i parametri cinetici dell'attività EROD rivela che i valori di K_m sono significativamente differenti negli animali di controllo e indotti, a riprova del fatto che la reazione è catalizzata da enzimi diversi nei ratti di controllo e indotti. Nei ratti trattati con BaP un singolo enzima, il CYP1A1, è responsabile dell'attività EROD, infatti si osserva un significativo aumento dell'attività EROD (da 11 e 32 volte nei ratti Wistar e Sprague-Dawley, rispettivamente) che rende il coinvolgimento della forma inducibile CYP2C6 trascurabile. I valori assoluti dell'attività EROD nei ratti indotti non sono significativamente differenti nei due ceppi di ratto. L'analisi dei parametri cinetici dell'attività MROD nei ratti non indotti mostra che la V_{max} e di conseguenza CL_{int} , sono circa 2,5 volte superiori nei Wistar rispetto agli Sprague-Dawley. Questi risultati sono coerenti con quelli di qRT-PCR e *Western blot* e confermano che il CYP1A2 è costitutivamente espresso ad un livello maggiore nel fegato dei ratti Wistar. Il trattamento con BaP determina un significativo aumento dei valori di V_{max} dell'attività MROD nelle preparazioni microsomiali di entrambi i ceppi di ratto, mentre non provoca alcuna modifica dei valori di K_m . Questo indica che lo stesso enzima catalizza l'attività MROD basale e indotta e conferma i dati di Burke e collaboratori⁷, secondo cui la 7-metossiresorufina è un substrato specifico per il CYP1A2.

Non esiste una correlazione tra gli aumenti di espressione genica e proteica di CYP1A1 e CYP1A2, che sono molto maggiori nei ratti Wistar, e l'aumento dell'attività EROD, simile nei due ceppi di ratto, come pure dell'attività MROD, indotta ad un livello molto più elevato nei ratti Sprague-Dawley. Questi risultati apparentemente contrastanti possono essere riconciliati considerando che l'induttore può avere un effetto differenziale sul *numero di turnover*, ossia sull'efficienza catalitica del CYP1A2 nei due ceppi di ratti. Come sottolineato da Kobayashi e collaboratori⁴⁹, vari fattori, come ad esempio l'abbondanza relativa di NADPH-CYP-reduttasi e

citocromo b5, nonché la composizione dei fosfolipidi del reticolo endoplasmatico liscio, possono influenzare in modo significativo il *numero di turnover* di CYP microsomiali. Pertanto, un maggior *numero di turnover* del CYP1A2 in ratti Sprague-Dawley trattati con BaP può costituire una spiegazione plausibile alla maggiore induzione dell'attività CYP1A2 osservata in questo ceppo ratto, nonostante l'aumento inferiore dell'espressione genica e proteica.

Dato che la misura delle variazioni dell'espressione genica e proteica dei CYP1A non può dare indicazioni quantitativamente corrette sulle variazioni dell'attività enzimatica, che rimane l'unica misura quantitativa del metabolismo dei CYP, i risultati di questo studio hanno implicazioni metodologiche per tutti gli studi che utilizzano ratti Sprague-Dawley e Wistar come modelli animali per studiare il metabolismo dei farmaci mediato dal CYP1A. Tutte e tre le tecniche infatti forniscono risultati concordanti nella valutazione dei livelli basali di CYP1A2, mentre nei ratti indotti con BaP i risultati dipendono dalla tecnica utilizzata. Come discusso in precedenza, la determinazione dell'attività MROD fornisce la misura più affidabile del metabolismo dei farmaci mediato dal CYP1A2. I livelli basali di CYP1A1 possono essere valutati solo determinando l'espressione genica e proteica tramite qRT-PCR e Western blot, in quanto nei ratti di controllo l'attività EROD non è dovuta al CYP1A1. Viceversa, per i ratti indotti l'attività EROD risulta la tecnica migliore per la misura della *clearance* metabolica mediata dal CYP1A1.

Nella seconda parte dello studio è stata valutata l'influenza della cirrosi epatica sull'induzione enzimatica dei CYP1A e CYP3A in ratti Wistar maschi, valutando contemporaneamente i livelli di espressione genica e proteica e l'attività enzimatica dei CYP, nonché l'espressione dei recettori nucleari che mediano la loro induzione, al fine di chiarire il meccanismo alla base dell'effetto della cirrosi sull'induzione enzimatica. La popolazione di ratti Wistar utilizzata in questo studio è stata rigorosamente suddivisa in gruppi stratificati secondo la gravità della cirrosi epatica indotta sperimentalmente.

Come riportato in precedenza, i risultati dell'analisi qRT-PCR mostrano che l'espressione genica basale di CYP1A1 è praticamente assente nel fegato dei ratti di controllo, mentre quella del CYP1A2 è presente ad un livello rilevabile anche nei ratti cirrotici. Coerentemente con i risultati di qRT-PCR, nei microsomi dei ratti di controllo la proteina CYP1A1 è assente, mentre il

CYP1A2 è costitutivamente espresso. I risultati della quantificazione genica e proteica mostrano anche che l'espressione basale di CYP1A2 diminuisce significativamente nei ratti cirrotici in proporzione alla gravità della cirrosi epatica (di circa il 45 e l'80% nei ratti non ascitici e ascitici, rispettivamente). Questo risultato è in accordo con i risultati osservati nell'uomo, in cui l'espressione della proteina CYP1A2 diminuisce in media del 71% nei pazienti con grave cirrosi epatocellulare⁵⁰. In seguito al trattamento con BaP, l'espressione genica e proteica di CYP1A risultano significativamente aumentate a livelli molto simili nei ratti sani e non ascitici, confermando i risultati riportati in letteratura secondo cui l'inducibilità è essenzialmente conservata nello stato di cirrosi compensata^{51,52}. Al contrario, l'aumento dell'espressione genica e proteica di CYP1A1 e CYP1A2 risulta significativamente ridotto nei ratti ascitici, indicando che l'induzione è notevolmente ridotta in cirrosi scompensata.

Nel tentativo di spiegare l'aumento inferiore dei CYP1A nei ratti ascitici indotti, sono state determinate l'espressione genica e proteica dell'AhR. I risultati mostrano una differenza tra l'espressione genica basale, che è simile nei tre gruppi di ratti, e l'espressione della proteina AhR, che è significativamente più bassa negli animali ascitici. Tale differenza è stata osservata con varie proteine, tra cui alcuni CYP, e può essere attribuita alla repressione della traduzione operata dai microRNA⁵³, che sono soggetti ad un aumento della loro espressione, in proporzione al grado di fibrosi epatica⁵⁴. In seguito all'induzione con BaP, nei ratti ascitici sia l'espressione genica che quella proteica dell'AhR sono significativamente inferiori rispetto agli animali sani e non ascitici. Non si può quindi escludere che le differenze nell'espressione genica basale dell'AhR non siano rilevabili a causa della bassa espressione costitutiva. Qualunque sia la spiegazione, i risultati ottenuti dimostrano che il trattamento con BaP aumenta sia l'espressione genica che proteica dell'AhR ad un livello significativamente inferiore nei ratti ascitici, fornendo così una spiegazione plausibile per il molto più basso effetto induttore del BaP sui CYP1A in questo gruppo di animali. Tuttavia, non si può escludere la possibilità di una diminuzione, dovuta alla cirrosi, dell'espressione di Arnt, con cui AhR dimerizza^{55,56}, o di altri cofattori dell'AhR, che potrebbe concorrere alla diminuzione dell'inducibilità dei CYP1A in caso di grave disfunzione epatica.

È stata quindi valutata l'attività delle due isoforme di CYP1A nelle preparazioni microsomiali dei ratti in esame utilizzando le attività EROD e MROD, come già precedentemente descritto. Il valore Km dell'attività EROD negli animali di controllo risulta superiore a 1 mM (risultati non mostrati), vale a dire più di 5 volte superiore a quella misurata per i ratti indotti (0,20 mM), a riprova del fatto che anche per i ratti cirrotici gli enzimi che catalizzano la reazione sono diversi negli animali di controllo e indotti. Per questo motivo, l'attività EROD dei ratti di controllo non è stata presa in considerazione. In contrasto con l'attività EROD, l'attività MROD ha dimostrato di essere una reazione marker per il CYP1A2 sia in ratti di controllo che in quelli trattati con BaP⁷. I risultati delle analisi cinetiche sono concordi con quelli di qRT-PCR e *Western Blot*. L'attività EROD del CYP1A1 è totalmente conservata nei ratti indotti non ascitici, mentre è notevolmente ridotta (di circa il 60%) in quelli ascitici. Nei ratti di controllo l'attività MROD del CYP1A2 si riduce fino al 30% all'aumentare della gravità della disfunzione epatica, mentre nei ratti indotti l'aumento dell'attività è simile negli animali sani e non ascitici e si riduce significativamente (di oltre il 70%) in quelli ascitici.

In conclusione, la rigorosa stratificazione in gruppi degli animali sulla base del grado di disfunzione epatica, ha permesso di dimostrare che l'inducibilità dei CYP1A è conservata nello stadio compensato della cirrosi, mentre si riduce drasticamente quando la disfunzione epatica diventa grave. Questa osservazione potrebbe spiegare almeno in parte i risultati contrastanti ottenuti finora negli studi sull'uomo, poiché questi studi hanno esaminato popolazioni eterogenee di pazienti con diversi gradi d'insufficienza epatica⁵⁷. Inoltre, la valutazione dell'espressione genica e proteica sia dei CYP1A che dell'Ahr ha, almeno in parte, chiarito il meccanismo responsabile della diminuzione d'inducibilità associata alla cirrosi. Infatti, l'osservazione che l'espressione genica e proteica e l'attività enzimatica dei CYP1A sono proporzionalmente ridotte nei ratti ascitici indica che il processo d'induzione enzimatica è compromesso a livello trascrizionale. Anche se, in linea di principio, la diminuzione dell'espressione genica può essere il risultato tanto di una diminuzione della trascrizione dell'mRNA che di un aumento del *turnover* dell'mRNA, la diminuzione dell'espressione proteica dell'Ahr nei ratti ascitici di controllo e indotti è indicativa di una ridotta trascrizione dei geni dei CYP1A. Questa osservazione potrebbe anche spiegare la diminuzione del livello di

espressione genica basale del CYP1A2 associata alla cirrosi, precedentemente osservata anche nell'uomo⁵⁸.

Per verificare se i risultati ottenuti a proposito dell'induzione mediata dall'AhR possano a priori essere estesi ad altri tipi d'induzione è stato analizzato l'effetto della cirrosi sull'induzione dei CYP3A, che è mediata da un diverso recettore nucleare: il PXR. L'espressione costitutiva dei CYP3A1 e CYP3A2, misurata in base ai livelli dell'espressione genica e proteica, non diminuisce nei ratti cirrotici non ascitici. Al contrario, l'espressione basale del CYP3A2 è leggermente aumentata anche se in misura non significativa. Il lieve aumento di espressione ed attività enzimatica nei ratti cirrotici non ascitici è in accordo con i risultati precedentemente ottenuti da altri autori^{59,60}. Al contrario, negli studi precedenti è stata osservata una significativa diminuzione sia delle espressione genica e proteica, sia dell'attività enzimatica dei CYP3A nei ratti ascitici^{60,46}. Dato che in questi precedenti studi sono stati usati ceppi di ratti diversi ed è stato studiato un diverso modello di cirrosi, ottenuta mediante legatura del coledoco⁶¹, la causa della diversità dei risultati potrebbe essere imputabile a queste differenze metodologiche.

Per quanto riguarda il CYP3A1 è stato osservato un aumento dell'espressione genica e proteica e dell'attività enzimatica rispetto ai ratti di controllo in tutti e tre i gruppi di ratti trattati con DEX, a riprova del fatto che l'inducibilità di questa isoforma è sostanzialmente mantenuta anche negli animali con cirrosi ascitica. Analogamente a quanto osservato per i CYP1A, l'induzione del CYP3A2 è invece totalmente mantenuta nei ratti cirrotici non ascitici, mentre è praticamente abolita nei ratti con cirrosi ascitica.

Per valutare l'attività enzimatica delle isoforme di CYP3A nel ratto sono utilizzate la 4- e la 1'-idrossilazione del midazolam e la 6 β -idrossilazione del testosterone. È stata confermata la specificità in queste reazioni effettuando studi d'inibizione con il clotrimazolo, che è un inibitore potente e selettivo della sottofamiglia CYP3A³⁵. I risultati ottenuti dimostrano che i ratti Wistar hanno una sensibilità simile a quella precedentemente riportata per il ceppo Sprague-Dawley all'azione del clotrimazolo³⁵ e che le attività di idrossilazione del midazolam e del testosterone sono catalizzate selettivamente dai CYP3A1 e CYP3A2, in quanto risultano inibite a basse concentrazioni nM in tutti i gruppi di ratti utilizzati in questo studio.

Per quanto riguarda l'attività 6 β -testosterone-idrossilasica, si osserva che il trattamento con DEX produce un aumento della V_{max} del CYP3A1 indipendente dal grado di cirrosi sviluppata, mentre l'aumento della V_{max} del CYP3A2 in seguito all'induzione è significativo negli animali sani e non ascitici, ma non negli ascitici.

La V_{max} relativa alla formazione di 4OH-MDZ dei ratti sani e non ascitici è significativamente aumentata dal trattamento con DEX, mentre non vi sono differenze significative tra ratti ascitici di controllo e indotti. Nei ratti di controllo la V_{max} relativa alla formazione di 1'OH-MDZ ha un andamento simile a quello osservato per il 4OH-MDZ, mentre l'aumento di attività è significativo in tutti e tre i gruppi di ratti indotti. Dato che la K_m (misura inversa dell'affinità) per la 4-idrossilazione è minore con il CYP3A2, mentre la K_m per l'1'-idrossilazione è minore per il CYP3A1, una spiegazione per la differenza osservata tra le due attività è che il 4OH-MDZ sia prodotto prevalentemente dal CYP3A2, mentre l'1'OH-MDZ sia prodotto principalmente dal CYP3A1.

Dai dati ottenuti con le tre tecniche descritte si può concludere che vi sia un effetto differenziale sull'induzione mediata dal DEX delle due isoforme di CYP3A1 e CYP3A2. Non è possibile, in base alle attuali conoscenze, dare una spiegazione plausibile del diverso effetto della cirrosi sull'induzione prodotta dal DEX, il quale agisce sul recettore nucleare che regola la trascrizione di entrambe le isoforme di CYP3A. Una diversa risposta dei CYP3A1 e CYP3A2 all'induzione da DEX è stata precedentemente osservata in ratti Sprague-Dawley ed è stata attribuita a un diverso meccanismo di controllo della trascrizione di queste due isoforme⁶². Ulteriori studi sono necessari per individuare a quale fattore possa essere dovuto il diverso effetto della cirrosi sull'inducibilità dei CYP3A1 e CYP3A2 e per spiegare perché anche la grave insufficienza epatica non riduca l'espressione costitutiva delle due isoforme di CYP3A nei ratti Wistar.

In conclusione si può affermare che i risultati riguardanti l'induzione mediata da un tipo di recettore non possono a priori essere estesi ad altri tipi di induzione in quanto i meccanismi che mediano l'induzione enzimatica sono differenti. L'espressione costitutiva delle diverse sottofamiglie di CYP e la loro induzione è infatti regolata in maniera diversa a seconda del recettore nucleare coinvolto. I risultati del presente studio indicano che l'effetto della cirrosi

sia sull'espressione costitutiva che sull'inducibilità degli enzimi CYP3A, i cui livelli sono sotto controllo del PXR, è alquanto diversa dall'effetto osservato sui CYP1A, che sono controllati dall'Ahr. Pertanto, è possibile affermare che la disfunzione epatica influenza in modo differente non solo l'espressione costitutiva dei CYP, ma anche la loro inducibilità a seconda del tipo di recettore nucleare che controlla la trascrizione dei loro geni.

Bibliografia

1. Parkinson A, Ogilvie BW. Biotransformation of xenobiotics. In: Casarett and Doull's Toxicology. Curtis D. Klaassen, 2001:133.
2. Guengerich FP. Comparisons of catalytic selectivity of cytochrome P450 subfamily enzymes from different species. *Chem Biol Interact* 1997;106:161-82.
3. Omura T, Sato R. The Carbon Monoxide-Binding Pigment of Liver Microsomes. I. Evidence for its Hemoprotein Nature. *J Biol Chem* 1964;239:2370-8.
4. Guengerich FP. Comparisons of catalytic selectivity of cytochrome P450 subfamily enzymes from different species. *Chem Biol Interact* 1997;106:161-82.
5. Kimura S, Smith HH, Hankinson O, Nebert DW. Analysis of two benzo[a]pyrene-resistant mutants of the mouse hepatoma Hepa-1 P(1)450 gene via cDNA expression in yeast. *EMBO J* 1987;6:1929-33.
6. Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, Inui Y, Guengerich FP. 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* 1994;270:414-23.
7. Burke MD, Thompson S, Weaver RJ, Wolf CR, Mayers RT. Cytochrome P450 specificities of alkoxyresorufin O-dealkylation in human and rat liver. *Biochem Pharmacol* 1994;48:923-36.
8. Zuber R, Anzenbacherová E, Anzenbacher P. Cytochromes P450 and experimental models of drug metabolism. *J Cell Mol Med* 2002;6:189-98.
9. Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, et al. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* 1996;6:1-42.
10. Walsky RL, Obach RS. Validated assays for human cytochrome P450 activities. *Drug Metab Dispos* 2004;32:647-60.

11. Schuppan D, Afdhal NH. Liver cirrhosis. *Lancet* 2008;371:838-51.
12. Conn HO. A peek at the child-turcotte classification. *Hepatology* 1981;1:673-6.
13. Pugh RNH, Murray-Lyon IM, Dawson JL, Pietroni MC, Williams R. Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices. *Br J Surg* 1973;60:646-9.
14. Elbekai RH, Korashy HM, El-Kadi AO. The effect of liver cirrhosis on the regulation and expression of drug metabolizing enzymes. *Curr Drug Metab* 2004;5:157-67.
15. Kawasaki S, Imamura H, Bandai Y, Sanjo K, Idezuki Y. Direct evidence for the intact hepatocyte theory in patients with liver cirrhosis. *Gastroenterology* 1992;102:1351-5.
16. McLean AJ, Morgan DJ. Clinical pharmacokinetics in patients with liver disease. *Clin Pharmacokinet* 1991;21:42-69.
17. Kishida T, Muto S, Hayashi M, et al. Strain differences in hepatic cytochrome P450 1A and 3A expression between Sprague-Dawley and Wistar rats. *J Toxicol Sci* 2008;33:447-57.
18. Schmidt JV, Bradfield CA. Ah receptor signaling pathways. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1996;12:55-89.
19. Conney AH. Induction of microsomal enzymes by foreign chemicals and carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons: G. H. A. Clowes Memorial Lecture. *Cancer Res* 1982;42:4875-917.
20. Pitot HC, Goldsworthy T, Campbell HA, Poland A. Quantitative evaluation of the promotion by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin of hepatocarcinogenesis from diethylnitrosamine. *Cancer Res* 1980;40:3616-20.
21. Tomita S, Jiang HB, Ueno T, et al. T cell-specific disruption of arylhydrocarbon receptor nuclear translocator (Arnt) gene causes resistance to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced thymic involution. *J Immunol* 2003;171:4113-20.

22. Holsapple MP, Morris DL, Wood SC, Snyder NK. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-P-Dioxin-Induced Changes in Immunocompetence: Possible Mechanisms. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1991;31:73-100.
23. McIntosh BE, Hogenesch JB, Bradfield CA. Mammalian Per-Arnt-Sim proteins in environmental adaptation. *Annu Rev Physiol* 2010;72:625-45.
24. Fukunaga BN, Probst MR, Reisz-Porszasz S, Hankinson O. Identification of functional domains of the aryl hydrocarbon receptor. *J Biol Chem* 1995;270:29270-8.
25. Nebert DW, Puga A, Vasiliou V. Role of the Ah receptor and the dioxin-inducible [Ah] gene battery in toxicity, cancer, and signal transduction. *Ann N Y Acad Sci* 1993;685:624-40.
26. Arenas-Huertero F, Apátiga-Vega E, Miguel-Pérez G, Villeda-Cuevas D, Trillo-Tinoco J. Molecular Markers Associated with the Biological Response to Aromatic Hydrocarbons from Urban Air in Humans. In *Air Pollution - New Developments*, 2011.
27. Chawla A, Repa JJ, Evans RM, Mangelsdorf DJ. Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. *Science* 2001;294:1866-70.
28. Handschin C, Meyer UA. Induction of drug metabolism: the role of nuclear receptors. *Pharmacol Rev* 2003;55:649-73.
29. Kliewer SA, Goodwin B, Willson TM. The nuclear pregnane X receptor: a key regulator of xenobiotic metabolism. *Endocr Rev* 2002;23:687-702.
30. Schuetz EG. Induction of cytochromes P450. *Curr Drug Metab* 2001;2:139-47.
31. Sonoda J, Rosenfeld JM, Xu L, Evans RM, Xie W. A nuclear receptor-mediated xenobiotic response and its implication in drug metabolism and host protection. *Curr Drug Metab* 2003;4:59-72.
32. Hoyumpa AM, Jr, Schenker S. Major drug interactions: effect of liver disease, alcohol, and malnutrition. *Annu Rev Med* 1982;33:113-49.

33. Angeli P, Jiménez W, Veggian R, et al. Increased activity of guanosine 3'-5'-cyclic monophosphate phosphodiesterase in the renal tissue of cirrhotic rats with ascites. *Hepatology* 2000;31:304-10.

34. Konstandi M, Johnson E, Lang MA, Camus-Radon AM, Marselos M. Stress modulates the enzymatic inducibility by benzo[α]pyrene in the rat liver. *Pharmacological Research* 2000;42:205-11.

35. Turan VK, Mishin VM, Thomas PE. Clotrimazole is a selective and potent inhibitor of rat cytochrome P450 3A subfamily-related testosterone metabolism. *Drug Metab Dispos* 2001;29:837-42.

36. Ishak K, Baptista A, Bianchi L, et al. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol* 1995;22:696-9.

37. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985;150:76-85.

38. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001;29:e45.

39. Kishida T, Muto S, Hayashi M, et al. Strain differences in hepatic cytochrome P450 1A and 3A expression between Sprague-Dawley and Wistar rats. *J Toxicol Sci* 2008;33:447-57.

40. Lindros KO, Oinonen T, Johansson I, Ingelman-Sundberg M. Selective centrilobular expression of the aryl hydrocarbon receptor in rat liver. *J Pharmacol Exp Ther* 1997;280:506-11.

41. Franc MA, Pohjanvirta R, Tuomisto J, Okey AB. In vivo up-regulation of aryl hydrocarbon receptor expression by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in a dioxin-resistant rat model. *Biochem Pharmacol* 2001;62:1565-78.

42. Regimbeau JM, Fuks D, Kohneh-Shahri N, Terris B, Soubrane O. Restrictive model of compensated carbon tetrachloride-induced cirrhosis in rats. *World J Gastroenterol* 2008;14:6943-7.

43. Ennulat D, Walker D, Clemo F, et al. Effects of hepatic drug-metabolizing enzyme induction on clinical pathology parameters in animals and man. *Toxicol Pathol* 2010;38:810-28.
44. Jan YH, Mishin V, Busch CM, Thomas PE. Generation of specific antibodies and their use to characterize sex differences in four rat P450 3A enzymes following vehicle and pregnenolone 16alpha-carbonitrile treatment. *Arch Biochem Biophys* 2006;446:101-10.
45. Chovan JP, Ring SC, Yu E, Baldino JP. Cytochrome P450 probe substrate metabolism kinetics in Sprague Dawley rats. *Xenobiotica* 2007;37:459-73.
46. Xie Y, Wang G, Wang H, et al. Cytochrome P450 dysregulations in thioacetamide-induced liver cirrhosis in rats and the counteracting effects of hepatoprotective agents. *Drug Metab Dispos* 2012;40:796-802.
47. Vuppalanchi R, Liang T, Goswami CP, et al. Relationship between differential hepatic microRNA expression and decreased hepatic cytochrome P450 3A activity in cirrhosis. *PLoS One* 2013;8:e74471.
48. Eagling VA, Tjia JF, Back DJ. Differential selectivity of cytochrome P450 inhibitors against probe substrates in human and rat liver microsomes. *Br J Clin Pharmacol* 1998;45:107-14.
49. Kobayashi K, Urashima K, Shimada N, Chiba K. Substrate specificity for rat cytochrome P450 (CYP) isoforms: screening with cDNA-expressed systems of the rat. *Biochem Pharmacol* 2002;63:889-96.
50. George J, Murray M, Byth K, Farrell GC. Differential alterations of cytochrome P450 proteins in livers from patients with severe chronic liver disease. *Hepatology* 1995;21:120-8.
51. Farrell GC, Zaluzny L. Microsomal protein synthesis and induction of cytochrome P-450 in cirrhotic rat liver. *Aust J Exp Biol Med Sci* 1984;62 (Pt 3):291-301.
52. Marshall WJ, McLean AE. The effect of cirrhosis of the liver on microsomal detoxications and cytochrome P-450. *Br J Exp Pathol* 1969;50:578-83.

53. Singh D, Kashyap A, Pandey RV, Saini KS. Novel advances in cytochrome P450 research. *Drug Discov Today* 2011;16:793-9.
54. Wang XW, Heegaard NH, Orum H. MicroRNAs in liver disease. *Gastroenterology* 2012;142:1431-43.
55. Park BK, Kitteringham NR, Pirmohamed M, Tucker GT. Relevance of induction of human drug-metabolizing enzymes: pharmacological and toxicological implications. *Br J Clin Pharmacol* 1996;41:477-91.
56. Nebert DW, Dalton TP, Okey AB, Gonzalez FJ. Role of aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of the CYP1 enzymes in environmental toxicity and cancer. *J Biol Chem* 2004;279:23847-50.
57. Palatini P, De Martin S, Pegoraro P, Orlando R. Enzyme inhibition and induction in liver disease. *Curr Clin Pharmacol* 2008;3:56-69.
58. George J, Liddle C, Murray M, Byth K, Farrell GC. Pre-translational regulation of cytochrome P450 genes is responsible for disease-specific changes of individual P450 enzymes among patients with cirrhosis. *Biochem Pharmacol* 1995;49:873-81.
59. Wu ZQ, Piche D, Vallieres S, Huet PM, Gascon-Barre M. Unimpaired induction of drug-metabolizing enzymes in hepatocytes isolated from rats with micronodular cirrhosis. *Can J Physiol Pharmacol* 1991;69:426-36.
60. Bastien MC, Leblond F, Pichette V, Villeneuve JP. Differential alteration of cytochrome P450 isoenzymes in two experimental models of cirrhosis. *Can J Physiol Pharmacol* 2000;78:912-9.
61. Chen J, Murray M, Liddle C, Jiang XM, Farrell GC. Downregulation of male-specific cytochrome P450s 2C11 and 3A2 in bile duct-ligated male rats: importance to reduced hepatic content of cytochrome P450 in cholestasis. *Hepatology* 1995;22:580-7.
62. Choudhuri S, Zhang X J, Waskiewicz M J, Thomas P E. Differential regulation of cytochrome P450 3A1 and P450 3A2 in rat liver following dexamethasone treatment. *J Biochem Toxic* 1995;10:6 299-307.