

**CITOCROM P-450: EL SEU PAPER EN EL METABOLISME
DE DIVERSOS BARBITÚRICS ***

pels doctors

JOAN-RAMON LAPORTE ROSELLÓ

i

JUAN-CARLOS FONTECILLA CAMPS

Divisió de Farmacologia Clínica. Facultat de Medicina.
Universitat Autònoma de Barcelona.

* Premi August Pi i Sunyer, 1976.

INTRODUCCIÓ

Les accions dels fàrmacs, tant les beneficioses com les indesitjables, són modulades fonamentalment per dos tipus de factors. Els primers dependrien de la interacció entre el fàrmac i el receptor farmacològic, és a dir entre el fàrmac i el lloc —cèl·lula, macromolècula, sistema enzimàtic, etc.— on aquest actua. Són els condicionants *farmacodinàmics*. En canvi, els condicionants *farmacocinètics* són els que operen sobre tots els processos que determinen la concentració assolida pel fàrmac als voltants del receptor, és a dir en la biofase. Entre els condicionants farmacocinètics —absorció, distribució, metabolisme i excreció— la metabolització és el procés que en més casos determina la velocitat de l'excreció d'un fàrmac, i per tant la durada dels seus efectes.

Per causa de la liposolubilitat que els confereix llur estructura química, molts fàrmacs no poden ésser eliminats pel ronyó, puix que una vegada filtrats pel glomèrul, són reabsorbits en el túbul renal i tornen a la circulació general. Cal que l'organisme els transformi en substàncies més polars —els metabolitzi— per a disminuir així llur coeficient de partició lípid/aigua i per a impedir que travessin fàcilment la membrana biològica que separa el filtrat glomerular renal de la sang capil·lar. Els processos de metabolització a què pot ésser sotmès un fàrmac es realitzen en molts teixits i òrgans, però principalment en el fetge. És en aquesta víscera, concretament en el reticle endoplàsmic de les seves cèl·lules, on es realitzen la majoria de les reaccions de metabolització, que foren classificades per WILLIAMS en quatre tipus: oxidacions, reduccions, hidròlisis i síntesis ¹¹⁵.

La primera descripció del metabolisme d'un compost estrany a l'organisme per la «fracció microsomal» fou feta per MUELLER i MILLER ^{73, 74}. Aquests autors demostraren que la fracció microsomal d'un homogenitzat de fetge catalitzava tant el desdoblament reductiu d'un enllaç azoic, com la N-desmetilació oxidativa dels colorants aminoazoics. Aquestes reaccions necessitaven fosfat de nicotinamida-adenina dinucleòtid (NAD), nicotinamida-adenina dinucleòtid (NAD) i oxigen molecular. BRODIE i cols. ⁸ demostraren que un sistema enzimàtic semblant localitzat en els microsomes hepàtics era responsable del metabolisme de diversos fàrmacs.

La recombinació de les diverses fraccions cel·lulars dels homogeneïtzats de fetge revelà la necessitat tant de la fracció soluble com de la microsomal. Fou obtinguda una activitat màxima quan la fracció soluble era substituïda per un sistema generador de NADPH, format per NADP, glucosa-6-fosfat (G-6-P) i G-6-P-deshidrogenasa o pel mateix NADPH. Per a obtenir una activitat màxima calia la presència de Mg^{++} . La necessitat tant d'un agent reductor com d'oxigen molecular situa la reacció entre les oxidases de funció mixta externa de la classificació de MASON⁶⁸, o de les monooxigenases segons la terminologia de HAYAISHI⁶⁹, que significa que els enzims catalitzen el consum d'una molècula d'oxigen per cada molècula de substrat, apareixent un àtom d'oxigen en el producte i essent l'altre sotmès a una reducció equivalent. POSNER i cols.^{90, 91} han donat una prova directa d'aquesta suposició, puix que, mitjançant la utilització d' $^{18}O_2$ i d' $H_2^{18}O$ demostraren que l'oxigen utilitzat en la hidroxilació de l'acetanilida deriva d'oxigen molecular i no de l'aigua.

Hom coneix nombroses reaccions oxidatives que es produeixen als microsomes: desaminació, O-, N- i S-desalquilació, hidroxilació d'hidrocarburs aromàtics i no aromàtics, epoxidació, formació de derivats alquilol, N-hidroxilació, N- i S-oxidació i deshalogenació. En els microsomes hepàtics també es troben activitats d'azo- i de nitro-reductasa. L'enorme versatilitat del sistema microsomal de metabolització de fàrmacs sembla menys remarcable quan les reaccions són considerades simplement com diferents tipus de reaccions d'hidroxilació^{9, 30, 31}.

EL SISTEMA METABOLITZADOR DE FÀRMACS DEL RETICLE ENDOPLÀSMIC HEPÀTIC

Hom considera que el sistema microsomal de metabolització de fàrmacs és un mecanisme d'oxidasa de funció mixta en el qual el NADPH redueix un component dels microsomes que reacciona amb oxigen molecular per a formar un «oxigen actiu» intermedi. L'«oxigen actiu» és llavors tramès al fàrmac. GILLETTE³⁰ va formular la reacció global com segueix:

1. $NADPH + A + H^+ \rightarrow AH_2 + NADP^+$
2. $AH_2 + O_2 \rightarrow \text{«oxigen actiu»}$
3. $\text{«Oxigen actiu»} + \text{fàrmac} \rightarrow \text{fàrmac oxidat} + A + H_2O$



Els enzims claus en la reacció global són la NADPH-citocrom c reductasa, l'enzim flavínic que intervé en l'oxidació del NADPH, el citocrom P-450, que en la seva forma reduïda és generalment considerat A, i la

NADPH-citocrom P-450 reductasa, que intervé en la reducció del citocrom P-450 oxidat.

A la figura 1 representem el sistema de transferència d'electrons en el qual intervé el citocrom P-450, tal com el varen descriure OMURA i cols.^{82, 87}. Treballant en el laboratori d'Estabrook, aquests investigadors varen fraccionar mitocondries sonicades de còrtex suprarenal de bou en una fracció particulada que contenia citocrom P-450 lliure d'altres hemoproteïnes i una fracció soluble que retenia l'activitat del sistema de la NADPH-

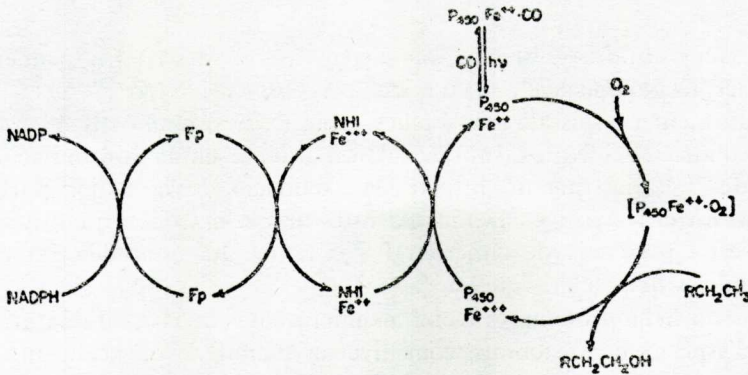


FIG. 1. — Sistema de transferència d'electrons emprat en el metabolisme microsomal dels fàrmacs proposat per OMURA i cols.^{82, 87}. Fp = flavoproteïna (en el fetge, citocrom c reductasa; en el còrtex suprarenal, adrenodoxina-reductasa); NHI = proteïna que conté ferro però sense estructura d'hem (en la suprarenal adrenodoxina).

citocrom P-450 reductasa. Aquesta fracció soluble contenia una proteïna amb ferro però sense estructura d'hem, i una flavoproteïna FAD (citocrom c-reductasa), essent ambdues necessàries per a la reconstitució de l'activitat de la NADPH-citocrom P-450 reductasa.

Gran part de les especulacions que fan referència als components del sistema microsomal de metabolització de fàrmacs són degudes al fet que els intents de solubilitzar el citocrom P-450 en forma activa han fracassat i calgué utilitzar preparats microsomals no purificats. Estudis més recents^{16, 60, 61, 62} han ajudat molt a la resolució d'aquest problema. La solubilització dels microsomes hepàtics de conill amb una barreja de glicerol, ditiotretiol i desoxicolat sòdic en una solució tampó de citrat potàssic va produir un extracte que va ésser resolt en una fracció que contenia citocrom P-450, una fracció que contenia una NADPH reductasa i una tercera fracció soluble en dissolvents orgànics i termostable. Les tres fraccions eren necessàries per a la producció d'una oxidació màxima dels fàrmacs (benz-

fetamina, aminopirina, etilmorfina, hexobarbital, norcodeïna, p-nitroanisol) o per a la ω -hidroxilació del laurat. Els criteris per a la solubilització del citocrom P-450 eren que es mantingués en el sobrenadant del preparat després de centrifugació a $105.000 \times g$ durant 2 hores. Aquestes fraccions poden donar l'oportunitat de purificar i identificar els components del sistema.

CITOCROM P-450

1. *Generalitats.* — El citocrom P-450 va ésser descrit per primera vegada per KLINGENBERG⁵¹, GARFINKEL²⁸ i OMURA i SATO^{83,85, 86}. Es troba abundantment no sols als microsomes hepàtics, sinó també als microsomes i mitocondries del còrtex suprarenal, on intervé en la hidroxilació dels esteroides^{29, 87}, bé que no intervé en l'oxidació de la major part dels fàrmacs. En el ronyó i en la mucosa intestinal se'n troben quantitats menors¹⁰⁸. La presència de citocrom P-450 també ha estat descrita en les mitocondries del *corpus luteum*¹¹⁶.

Aquesta hemoproteïna es troba als microsomes hepàtics d'una gran varietat d'espècies de vertebrats, com diversos mamífers, un ocell, una serp, una granota, un peix⁸⁷, en bacteris⁴⁷, en bacteroides^{2, 3, 4, 5} i en llevadures^{44, 45}. Seria erroni considerar que el citocrom P-450 és idèntic en tots els teixits o espècies; les especificitats de substrat dels sistemes enzimàtics en els quals intervé el citocrom P-450 en suprarenal i en fetge difereixen enormement, i hom pot observar diferències també en les especificitats de substrat dels sistemes metabolitzadors de fàrmacs dels microsomes hepàtics d'espècies diferents. És molt possible que aquestes diferències siguin degudes a diferències en la manera com el citocrom P-450 està associat a la membrana microsomal o a diferències quantitatives o qualitatives en d'altres components del sistema enzimàtic, però també és possible que el citocrom P-450 pugui existir en diverses formes.

Les observacions següents constitueixen proves que el citocrom P-450 participa en el metabolisme dels fàrmacs:

1) La llum inverteix l'efecte inhibitori del monòxid de carboni sobre el metabolisme de la codeïna, la monometilaminopirina i l'acetanilida; l'espectre actiu de la inversió de la inhibició del metabolisme per la llum correspon a l'espectre del complex format pel citocrom P-450 i el CO, amb un pic a una longitud d'ona de 450 nm ¹⁸.

2) El cianur no es combina amb el citocrom P-450⁸⁵ ni inhibeix el metabolisme dels fàrmacs^{17, 32, 54}.

3) El monòxid de carboni es combina amb el citocrom P-450 i inhibeix el metabolisme dels fàrmacs^{13, 18, 88}.

4) Les substàncies que destrueixen l'activitat metabolitzadora de fàrmacs dels microsomes, com el desoxicolat, la steapsina i el verí de serp^{32, 91}, converteixen el citocrom P-450 en la forma inactiva de l'hemoproteïna, el citocrom P-420^{85, 86}. A més, els detergents com l'isooctilfenoxipolietoxietanol i el Triton N-101, que poden ésser emprats per a solubilitzar parcialment els microsomes, produeixen una disminució de la velocitat de la metabolització dels fàrmacs en una proporció directa a la conversió del citocrom P-450 en citocrom P-420^{31, 105}.

5) Els agents que produeixen un augment o una disminució en els nivells de citocrom P-450 en els microsomes produeixen amb freqüència un augment o una disminució paral·lels en les velocitats a les quals els mateixos microsomes metabolitzen els fàrmacs^{65, 88, 95, 106}.

6) Els fàrmacs es fixen al citocrom P-450 i donen lloc a espectres diferencials característics; en general existeix una similitud de la cinètica d'aquesta fixació amb la cinètica del metabolisme d'aquests mateixos fàrmacs^{42, 43, 96, 106} (vegeu més endavant).

7) El fetge i el còrtex suprarenal oxiden els esteroides^{23, 52, 53}; els microsomes d'ambdós òrgans són rics en citocrom P-450.

Característiques espectrals. — El citocrom P-450 és tradicionalment mesurat per l'espectre diferencial observat quan està en forma reduïda, generalment amb ditionita, i combinat amb monòxid de carboni. El NADH i el NADPH redueixen el citocrom P-450 només en absència d'oxigen molecular, essent el pigment molt autooxidable. L'espectre del citocrom P-450 reduït en presència de CO és poc habitual per a un citocrom, i no dóna cap informació sobre la naturalesa del pigment⁹⁹. El fet que el pigment que fixa el CO sigui en realitat un citocrom va ésser demostrat per l'espectre del seu derivat, el citocrom P-420, i per tècniques que varen permetre el registre de l'espectre absolut del citocrom P-450 contingut en les partícules microsomals.

Excepte pel que fa referència a traces de catalases, els únics citocroms que hom creu presents en els microsomes hepàtics són el citocrom P-450 i el citocrom b₅. El citocrom b₅ pot ésser selectivament separat mitjançant la digestió dels microsomes en un medi anaerobi amb steapsina (lipasa pancreàtica no purificada) al 0,14 % en condicions adequades (solució tampó de fosfat 0,1M, pH=7,5, 37 °C, 1 hora), quedant el pigment fixador del CO unit a les partícules no digerides i en part en forma de P-420. Quan aquestes partícules són tractades en un medi anaerobi amb verí de

serp o amb desoxicolat sòdic al 0,5 %, tot el pigment fixador de CO és solubilitzat i convertit en citocrom P-420. El processament posterior de l'extracte obtingut pot donar citocrom P-420 purificat, amb un espectre d'absorció característic d'un citocrom de tipus b; és a dir amb bandes α , β , i de Soret que se situen, respectivament, a 539, 530 i 427 nm^{84, 85, 86, 99}. La banda de Soret de la forma oxidada se situa a 414 nm. Després de la combinació amb el CO el pic de Soret del citocrom P-420 reduït es desplaça a 422 nm i resulta considerablement intensificat. Aquests espectres són molt similars als del citocrom b_1 bacterià²⁷ però el citocrom bacterià difereix del citocrom P-420 en no fixar el CO.

La determinació de l'espectre absolut del citocrom P-450 es complica per la presència de citocrom b_5 i de citocrom P-420. El problema ha estat en gran part resolt per l'extracció del citocrom b_5 dels microsomes i per l'estabilització del citocrom P-450 en glicerol. Al laboratori de SATO^{78, 79, 100} l'espectre absolut del citocrom P-450 va ésser observat en partícules microsomals que havien estat prèviament alliberades del citocrom b_5 com a resultat d'un tractament anaerobi amb Nargase, una proteïnasa de *Bacillus subtilis*, i en els que la petita quantitat de citocrom P-420 que s'havia format en presència de glicerol va ésser quasi completament extreta amb H₂O₂. MACLENNAN i cols.⁶³ varen obtenir un espectre mitjançant la utilització de membranes microsomals que havien estat reduïdes de mida com a resultat d'un tractament amb alcohol *tert*-amílic, però les partícules contenien un citocrom semblant al b_5 i un enzim flavínic, a més del citocrom P-450. Al laboratori de Mason es tractaren microsomes hepàtics amb el detergent no iònic Lubrol WX, per a produir subpartícules que donessin un espectre absolut del citocrom P-450 sense interferència aparent amb el citocrom b_5 i amb molt poca interferència per causa del citocrom P-420⁷¹.

KINOSHITA i HORIE⁵⁰ varen proposar un mètode més intel·ligent per a la determinació de l'espectre absolut en microsomes que no havien estat tractats per a eliminar el citocrom b_5 . Aquest mètode es basa en el coneixement que el citocrom b_5 és l'únic citocrom microsomal diferent del citocrom P-450, i en què l'administració d'inductors com el fenobarbital dona lloc a un augment molt important de la concentració del citocrom P-450 en els microsomes, sense afectar de manera apreciable el nivell de citocrom b_5 . Es varen diluir suspensions de microsomes de conills no tractats i de conills tractats amb fenobarbital, de manera que cadascuna d'elles contingés la mateixa quantitat de citocrom b_5 .

Pel que fa referència al contingut d'hemoproteïna, l'única diferència aparent entre aquestes dues preparacions era llur contingut en citocrom P-450. Si es col·locaven els microsomes dels animals no tractats a la cubeta de referència, l'espectre diferencial obtingut amb ambdós preparats era

molt semblant a l'espectre absolut pel citocrom P-450 obtingut per d'altres mètodes. Aquesta tècnica ha estat extensament utilitzada en el laboratori d'ESTABROOK pel registre dels espectres absoluts de pigments fixadors de CO d'animals induïts amb fenobarbital o amb 3-metilcolantrè⁴⁰.⁴¹ Quan l'hemoproteïna és col·locada a ambdues cubetes, i a una concentració més elevada a la cubeta de la mostra, tal com es fa quan s'empra el mètode de KINOSHITA i HORIE, l'espectre resultant té les característiques qualitatives de l'espectre absolut de l'hemoproteïna, però té una magnitud reduïda en la seva totalitat en una quantia exactament igual a la contribució restada de l'espectre invertit produït per l'hemoproteïna a la cubeta de referència. A no ser que sigui corregit, l'espectre resultant no és per tant una representació quantitativa de l'espectre absolut aparent. A més, els espectres qualitius de l'espectre absolut aparent només poden tenir sentit si els microsomes d'animals no tractats i tractats amb fenobarbital contenen un citocrom P-450 espectralment idèntic.

El fet que el citocrom P-450 dels conills tractats amb fenobarbital és espectralment el mateix que el trobat en els microsomes dels animals no tractats va ésser demostrat quan l'espectre absolut aparent obtingut per HILDEBRANDT i ESTABROOK⁴¹ mitjançant el mètode de Kinoshita i Horie va ésser comparat amb l'espectre absolut publicat per SATO i cols.¹⁰⁰. Aquest últim espectre va ésser obtingut per una tècnica espectrofotomètrica directa mitjançant la utilització de microsomes alliberats de citocrom b_5 . La diferència quantitativa observada entre ambdós espectres és molt semblant a la que pot ésser calculada a partir de consideracions teòriques. Quan els citocroms P-450 no són idèntics en diferents preparats de microsomes, tal com passa quan es comparen les hemoproteïnes d'animals no tractats amb les d'animals tractats amb 3-metilcolantrè, l'espectre «absolut» obtingut pel mètode de Kinoshita i Horie no pot ésser corregit qualitativament ni quantitativa.

Fixació a fàrmacs. — NARASHIMHULU i cols.⁷⁵ varen observar canvis espectrals característics quan afegien 17-hidroxiprogesterona al sistema d'hidroxilases d'esteroides depenent del citocrom P-450 present en el còrtex suprarenal. Aquest fet va provocar que REMMER i cols.⁹⁶ i IMAI i SATO⁴² publiquessin, gairebé de manera simultània, treballs que demostren que els fàrmacs i d'altres substàncies estranyes a l'organisme es combinen amb el citocrom P-450 hepàtic per a produir espectres diferencials de dos tipus generals, tipus I i tipus II. Els compostos que donen espectres diferencials de tipus I o II amb els microsomes hepàtics han arribat a ésser coneguts com a compostos de tipus I o de tipus II. Els compostos de tipus I, exemple dels quals és l'hexobarbital, donen un espectre diferencial amb una λ_{\max} situada entre 385 i 390 nm i una λ_{\min}

en un marge igualment ampli de 418-427 nm; la λ_{\max} i la λ_{\min} dels compostos de tipus II (exemplificats per l'anilina) són de 425-435 nm i de 390-405 nm respectivament¹⁰². Així, amb uns valors de λ_{\max} i de λ_{\min} oposats, els espectres de tipus I i de tipus II són aproximadament imatges especulars l'un de l'altre.

La raó de les diferències espectrals característiques observades quan hom afegeix fàrmacs de tipus I o de tipus II als microsomes pot ésser aclarida quan hom registra els espectres absoluts del citocrom P-450 abans i després de l'addició d'hexobarbital (tipus I) o d'anilina (tipus II). Mitjançant la utilització de la tècnica de Kinoshita i Horie (vegeu anteriorment) amb microsomes oxidats d'animals no pre-tractats (cubeta de referència) i d'animals tractats amb fenobarbital (cubeta de la mostra), REMMER i cols.⁹⁷ varen registrar els espectres absoluts del citocrom P-450 amb hexobarbital, i del citocrom P-450 amb anilina. L'hexobarbital produïa un desplaçament de l'espectre absolut en la direcció de les longituds d'ona menors, desplaçant-se la λ_{\max} de 420 nm a 415 nm. L'addició d'anilina produïa un desplaçament de l'espectre absolut en la direcció de les longituds d'ona superiors, desplaçant-se la λ_{\max} de 420 nm a 426 nm. Quan hom representava la diferència dels espectres absoluts observats amb fàrmacs i sense, hom obtenia una corba gairebé idèntica a l'espectre diferencial observat experimentalment quan s'empraven hexobarbital o anilina.

Amb l'excepció d'un fàrmac, els compostos de tipus I i II produeixen llurs espectres característics de fixació de manera reproduïble independentment de l'origen dels microsomes. L'excepció és el fenobarbital, que dona un espectre de fixació de tipus I amb microsomes de rata^{96, 102, 104}, però un espectre de tipus II amb microsomes de conill^{42, 43}. Suposant que els punts de fixació de tipus I i de tipus II estiguessin localitzats en una sola forma de citocrom P-450, aquest fet suggeriria una diferència qualitativa en els citocroms P-450 d'ambdues espècies; suposant l'altra possibilitat, és a dir l'existència de dues formes del citocrom P-450, una amb un punt de fixació de tipus I i l'altra amb un punt de fixació de tipus II, la diferència en la manera com el fenobarbital es fixa als microsomes d'ambdues espècies suggeriria que les propietats d'ambdós citocroms diferirien notablement en els microsomes de rata i de conill. Cal també tenir en compte que a concentracions baixes el fenobarbital produïa un espectre de tipus I amb els microsomes de conill⁶⁹.

A la rata hom ha observat diferències de sexe i d'edat en les propietats de fixació del citocrom P-450. Ja fa temps que hom sap que les rates mascles metabolitzen alguns fàrmacs amb major rapidesa que les femelles, fenomen no observat en d'altres espècies d'animals de laboratori utilitzades amb freqüència. Posteriorment hom va demostrar que aquesta dife-

rència sexual entre les rates mascles i les femelles es devia a diferències quantitatives en els espectres de fixació produïts pels fàrmacs de tipus I ¹⁰¹. No es varen observar diferències entre la capacitat dels microsomes de mascles adults i els de femelles adultes per a oxidar l'anilina o per a combinar-se amb l'anilina per a formar l'espectre de tipus II. No obstant, l'oxidació de l'aminopirina, un fàrmac de tipus I, i la fixació de l'aminopirina i de l'hexobarbital (tipus I) pels microsomes de rates mascles varen ésser molt superiors a les observades amb microsomes de rates femelles. En les rates immadures no s'observen diferències sexuals en el metabolisme dels fàrmacs, fet que suggereix l'existència d'un canvi qualitatiu del citocrom P-450 a mesura que els mascles es desenvolupen.

Se sap que els microsomes perden part de llur capacitat per a metabolitzar fàrmacs quan són emmagatzemats al congelador. Probablement això es deu a la pèrdua del punt de fixació de tipus I. L'emmagatzament dels microsomes a -5°C durant set dies produeix una pèrdua gairebé completa de la capacitat de fixació de tipus I, però afecta poc o nul·lament la fixació de tipus II ¹⁰³.

Nombrosos compostos estudiats per SCHENKMAN i cols. ¹⁰² pel que fa referència a llurs característiques de fixació donen espectres de tipus II amb λ_{max} i λ_{min} ben clarament fora dels límits habituals. Aquests compostos varen ésser classificats com compostos de «tipus II modificat». Representants d'aquest grup són el cortisol, la corticosterona, l'acetanilida, l'etilisocianur, el cianur i la rotenona. SASAME i GILLETTE ⁹⁸ han suggerit que aquests compostos produeixen llurs espectes atípics perquè es combinarien a la vegada amb ambdós punts de fixació. Si l'espectre de tipus II modificat és simplement un espectre de tipus II «típic» amb uns marges més amplis de λ_{max} i de λ_{min} , i aquest marge més ampli de situació dels màxims i dels mínims és degut a la capacitat dels compostos de tipus II modificat per a combinar-se amb ambdós punts de fixació I i II, el marge menor de λ_{max} i de λ_{min} observat en els espectres obtinguts amb compostos típics de tipus II podria reflectir simplement una menor tendència d'aquests compostos per a combinar-se amb ambdós punts de fixació. Cal per tant considerar la possibilitat que pocs compostos, si és que n'hi ha algun, es combinin exclusivament bé amb el punt de fixació I o amb el II, i que qualsevol compost produeixi espectres compostos que en graus variables serien només predominantment de tipus I o de tipus II. La situació dels màxims i dels mínims en espectres de fixació dels compostos de tipus I i de tipus II és tal, que tendeixen a cancel·lar-se mútuament. No obstant, les situacions no són perfectament coincidents, fet que podria explicar les variacions en λ_{max} i en λ_{min} a l'espectre compost observat quan es produeixen simultàniament una fixació de tipus I i una de tipus II. Un compost capaç de fixar-se amb la mateixa afinitat al punt de fixació I

que al punt de fixació II no presentaria essencialment cap espectre diferencial de fixació. L'extinció molar del compost de tipus I seria reduïda per un grau anàleg de fixació de la mateixa substància al punt de fixació II, i l'extinció molar del compost de tipus II seria afectada d'una manera similar pel component de fixació de tipus I.

Bé que sembla poc qüestionable el fet que els canvis espectrals observats quan els fàrmacs són afegits a preparats microsomals siguin deguts a interaccions dels fàrmacs amb el citocrom P-450, és convenient de fer una pausa i revisar les proves que abonen aquesta idea. IMAI i SATO⁴³ compten les proves següents:

1) La magnitud del canvi espectral és proporcional al contingut de citocrom P-450 dels diferents preparats microsomals.

2) L'etil-isocianur es combina amb el citocrom P-450 en microsomes mantinguts en condicions aeròbies per a produir un espectre diferencial amb un pic de 434 nm⁷⁷. L'anilina, compost que dóna lloc a un espectre de tipus II amb els microsomes, interfereix de manera competitiva la fixació de l'etil-isocianur al citocrom P-450.

3) L'anilina dóna un espectre de fixació màxim amb els microsomes a 427 nm. El màxim observat quan hom afegeix anilina a un citocrom P-420 parcialment purificat es produeix a 417 nm, i té una extinció molar molt inferior a la del pic a 427 nm observat amb els microsomes. Tots els tractaments que produeixen una conversió del citocrom P-450 en citocrom P-420 donen lloc a una disminució de l'espectre de fixació de l'anilina i a un desplaçament de la λ_{\max} des de 427 nm a 417 nm. La intensitat d'aquests canvis en l'espectre diferencial de l'anilina era paral·lela al grau de formació del citocrom P-420 parcialment format a partir del citocrom P-450. ULLRICH¹¹¹ també va demostrar una pèrdua de la fixació del ciclohexà (tipus I), correlacionada amb la intensitat de la transformació de citocrom P-450 en P-420.

4) El citocrom b₅ purificat, l'altra hemoproteïna dels microsomes, no produeix interaccions espectrals amb els compostos que produeixen canvis espectrals en els microsomes.

Si encara són necessàries més proves que demostrin que els espectres de fixació són resultants d'interaccions amb el citocrom P-450, es poden trobar en l'observació de LU i cols.^{61, 62}, que demostraren que el citocrom P-450 solubilitzat i parcialment purificat es combina amb compostos de tipus I i de tipus II per a donar espectres característics de fixació.

Per als observadors dels espectres de fixació va tenir molt més interès la relació aparent entre la cinètica de la fixació del fàrmac i la cinètica del

metabolisme del fàrmac. La representació de dobles recíprocs de Lineweaver i Burk (vegeu Apèndix) de la diferència d'absorbància del canvi espectral *vs* la concentració del fàrmac, pot ésser utilitzada per a derivar la constant espectral de dissociació (K_s) de manera anàloga a com hom obté la constant de Michaelis-Menten (K_m) per a l'oxidació del mateix compost mitjançant la representació del recíproc de la velocitat de la reacció *vs* el recíproc de la concentració del substrat. En nombrosos casos la K_s i la K_m per a un compost determinat es varen trobar semblants, i això va fer pensar que la fixació del fàrmac seria un pas obligatori en el mecanisme de la seva hidroxilació.

La taula 1 resumeix els resultats d'estudis de diversos laboratoris en els quals hom ha fet comparacions entre la K_s i la K_m de compostos que reaccionen amb el citocrom P-450. Cal fer notar, però, que aquesta relació en-

TAULA I. — Comparació de la constant de dissociació espectral (K_s) i la constant de Michaelis-Menten (K_m) de compostos que reaccionen amb P-450 microsomal.

Compost	Tipus de fixació	Reacció mesurada	Espècie animal ^a	K_s ($M \times 10^4$)	K_m ($M \times 10^4$)	Cita
Aminopirina	I	N-desmetilació	R	3,3	3,6	b
Anilina	II	Hidroxilació	R	8,0	7,0	b
			R	3,6	0,4	c
			R	3,3	0,4	d
			Cob	26	17-20	e
Etilmorfina	I	N-desmetilació	C	2,5	3,2	f
			Cob	12,0	12,8	f
			r	9,0	11,0	f
Hexobarbital	I	Hidroxilació	R	0,8	1,0	b

a. C = conill; Cob = cobai; R = rata; r = ratolí.

b. SCHENKMAN i cols., 1967.

c. REMMER i cols., 1966.

d. GUARINO i cols., 1969.

e. IMAI i SATO, 1967.

f. DAVIES i cols., 1969.

tre K_s i K_m no és molt convincent. No solament en algun cas la K_s no és igual a la K_m , sinó que a més els valors absoluts de K_s i de K_m varien molt d'una espècie a l'altra i d'un laboratori a l'altre per a la mateixa espècie. Fins i tot en el mateix laboratori, quan l'anilina va ésser estudiada, K_s va ésser igual a K_m una vegada⁹⁶, però va diferir en una altra ocasió¹⁰².

Si hom considera les dades expressades a la taula 1, queda clar que les condicions varien enormement d'un laboratori a l'altre. Això podria ésser degut a diferències en l'edat o en la soca dels animals utilitzats, o a variacions en les condicions ambientals.

INDUCCIÓ ENZIMÀTICA

L'acceleració del metabolisme dels fàrmacs per la cèl·lula hepàtica va ésser descoberta en estudis sobre la causa de la tolerància als barbitúrics i de la forma com els hidrocarburs policíclics protegien contra les accions d'alguns carcinògens⁹³.

Hom disposa en l'actualitat de moltes proves que indiquen que l'estimulació de l'activitat dels enzims microsomals és conseqüència de la síntesi de noves proteïnes. Els estimuladors enzimàtics no tenen efectes *in vitro*; els animals han d'ésser pretractats, i ha de passar un període de temps que correspon al necessari per a la síntesi de quantitats conegudes de proteïnes¹¹. El fenobarbital, que és estimulador de moltes activitats enzimàtiques, produeix un increment detectable en la quantitat de proteïna microsomal per gram de fetge, però el 3-metilcolantrè, que no estimula tants sistemes enzimàtics, no produeix aquest augment de la quantitat de proteïnes²⁶. Les fotografies de microscopia electrònica demostren^{35, 93} que després del pre-tractament amb fenobarbital hi ha un augment de la quantitat de reticle endoplasmàtic llis a l'hepatòcit (cal recordar que els enzims microsomals són situats en aquesta estructura cel·lular). Hom ha observat també que les propietats cinètiques (afinitat pel substrat, etc.) dels diversos enzims metabolitzadors de fàrmacs després de la inducció amb fenobarbital no són distingibles de les que corresponen als enzims dels animals no pretractats⁷⁶. L'etionina, aminoàcid amb propietats d'antimetabòlit, bloqueja la resposta estimuladora a l'administració de fenobarbital, i la metionina, que inverteix el blocatge de la síntesi proteica produït per l'etionina, també inhibeix els efectes de l'etionina sobre la inducció enzimàtica¹⁴. La puromicina i l'actinomicina bloquegen la síntesi proteica per un mecanisme més directe que el de l'etionina: la puromicina bloqueja a nivell del ribosoma (traducció), i l'actinomicina a nivell de la ARN-polimerasa dependent de l'ADN (transcripció). Ambdues substàncies bloquegen la inducció de la benzpirè-hidroxilasa en el fetge de la rata²⁹.

Els estudis realitzats han demostrat clarament que l'estimulació produïda pel fenobarbital és específica pels components essencials del sistema microsomal d'oxidació, és a dir la NADPH-citocrom c reductasa, la NADPH-citocrom P-450 reductasa i el citocrom P-450⁵⁸. MARVER⁶⁷ ha

demostrat l'existència d'un paral·lisme notable en l'evolució en el temps entre l'estimulació de l'activitat desmetilant en el fetge de rata, obtinguda amb injeccions repetides de fenobarbital, i l'augment de les quantitats d'aquests tres components de la cadena de transport d'electrons, obtingut de la mateixa manera. Aquest autor també observa un lleuger augment del total de proteïna microsomal en el fetge (generalment més elevat en d'altres experiments), però cap canvi d'aquest tipus en d'altres sistemes enzimàtics.

L'augment del citocrom P-450 observat després del tractament amb fenobarbital és precedit d'un augment brusc de la sintetasa de l'àcid delta-aminolevulínic (ALA), que és l'enzim inicial i limitador de la velocitat de tota la cadena de la biosíntesi de l'hem⁹⁴. La síntesi de l'hem és regulada per un mecanisme de *feedback* de l'hem lliure sobre la formació de l'ALA-sintetasa; així, una disminució dels nivells de l'hem desreprimeix la síntesi de l'enzim, i es restableixen els nivells d'hem. Si la inducció del citocrom P-450 es produïx per aquest mecanisme, seria d'esperar que l'hem lliure bloquejés tots els efectes produïts pel fenobarbital sobre l'activitat enzimàtica microsomal. En el treball citat anteriorment, MARVER demostra que això és cert. La injecció intraperitoneal de preparats solubles d'hem impedeix que el fenobarbital administrat poc després produeixi un augment de les proteïnes microsomals hepàtiques, dels fosfolípids hepàtics (indicatius de la quantitat de reticle endoplàsmic), de la NADPH-citocrom c reductasa, del citocrom P-450, de la capacitat per a desmetilar l'aminopirina, i de la capacitat per a oxidar l'hexobarbital, i finalment de la disminució del temps de la dormició produïda per l'hexobarbital.

En la bibliografia sobre inducció enzimàtica hom observa molta confusió en la interpretació dels fenòmens demostrats pel fet que l'estimulació d'una activitat enzimàtica necessiti que augmenti la síntesi de proteïnes. És a dir, hi ha confusió sobre la interpretació dels resultats obtinguts en els estudis anteriorment esmentats. El nivell inicial d'activitat microsomal no estimulada ha d'ésser considerat com un estat d'equilibri, en el qual la síntesi dels enzims és igual a llur degradació. L'estimulació és un canvi en l'estat d'equilibri, que podria ésser produït bé per un augment de la síntesi, bé per una disminució de la degradació, o per ambdós fenòmens. Alguns casos d'«inducció enzimàtica» (per exemple l'estimulació de l'activitat de la triptòfan-pirrolasa pel triptòfan) poden ésser atribuïts a l'estabilització d'un enzim pel seu substrat

Actualment hom coneix més de 300 fàrmacs, insecticides, carcinògens i d'altres substàncies químiques que estimulen l'activitat dels enzims metabolitzadors de fàrmacs dels microsomes hepàtics^{12, 65}. Entre els exemples hi ha hipnòtics i sedants¹⁴, fenotiazines^{22, 107}, anticonvulsivants⁵⁵.

⁷², antidepressius tricíclics ^{48, 81}, diürètics ¹⁰⁹, esteroides anabolitzants ^{7, 80}, delta-9-tetra-hidrocannabinol, principi actiu de la marihuana ¹⁰ i molts d'altres tipus de fàrmacs. A més, molts productes químics presents en el nostre ambient «civilitzat» poden estimular l'activitat dels enzims metabolitzadors de diferents espècies animals i de l'home, i poden alterar notablement la intensitat i la durada de l'acció farmacològica. Entre els més importants citem els hidrocarburs aromàtics policíclics del fum de tabac ⁸⁹, l'aire pollucionat de les ciutats i alguns aliments preparats ^{6, 12, 19, 114}, hidrocarburs halogenats utilitzats com a insecticides ^{15, 21 36, 37} (en aquest sentit FOUTS ²⁵ proposa, després de provar-ne bastants, utilitzar com a insecticida dels estabularis dels animals d'experimentació el piperonil-butòxid, que no té activitat inductora enzimàtica sobre cap de les espècies animals utilitzades amb més freqüència); herbicides derivats de la urea ⁴⁹, diversos colorants afegits als aliments ^{56, 92}, i la cafeïna i les flavones afegides als pinsos per a animals ^{70, 113}. L'encenall de cedre i d'altres jaços utilitzats en estabularis d'animals també són potents estimuladors del metabolisme dels fàrmacs, motiu pel qual cal tenir compte en llur elecció ^{24, 112}. L'oli utilitzat per a microscopia d'immersió en molts laboratoris també és un potent inductor enzimàtic¹. D'altra banda, l'etanol, que és metabolitzat en la seva major part per enzims solubles i en proporció més reduïda pels enzims insolubles del reticle endoplàsmic, també ha demostrat una intensa capacitat inductora enzimàtica ^{48, 64}. L'eucaliptol sembla produir el mateix efecte que l'etanol ⁴⁶.

OBJECTIUS D'AQUEST TREBALL

El citocrom P-450, últim component de la cadena de transport d'electrons que participa en l'oxidació dels fàrmacs i que s'uneix a ells, és tradicionalment mesurat amb el mètode d'OMURA i SATO ^{85, 86}, que suposa la fixació del pigment a monòxid de carboni prèvia reducció amb ditinita. El monòxid de carboni té una elevada afinitat pel citocrom P-450, i per tant és de suposar que desplaça els substrats endògens (esteroides o d'altres substàncies) que puguin estar fixats al citocrom P-450. El desplaçament produït pel CO no pressuposa que també sigui produït pels fàrmacs que han d'ésser metabolitzats pel citocrom P-450. És possible que alguns substrats endògens tinguin una afinitat pel citocrom P-450 menor que la del CO, però superior a la dels fàrmacs eventualment administrats a l'animal d'experimentació. Aquesta possibilitat, no descartada per cap autor i citada per alguns —per exemple TEMPLE ¹¹⁰ i LIPSCOMB i GUNSALUS ⁵⁷— suposaria que la determinació del contingut de citocrom P-450 en fracció microsomal hepàtica pel mètode

d'Omura i Sato mesuraria citocrom P-450 total, però no necessàriament disponible pels processos de metabolització. Si la fixació dels fàrmacs al citocrom P-450 és —com sembla— una etapa prèvia en el procés de llur metabolització, la mesura dels canvis espectrals observats quan un fàrmac es fixi al citocrom P-450 seria més acurada des d'un punt de vista fisiològic, puix que està en relació amb la quantitat de citocrom apta per fixar-se a un substrat exogen amb una afinitat determinada, eventualment inferior a la de possibles substrats endògens.

MATERIAL I MÈTODES

Hem utilitzat ratolins de la soca CD-1 procedents del nostre estabulari. Abans de totes les experiències els animals han estat sotmesos a un dejuni de 12 hores, i se'ls ha deixat aigua *ad libitum*. Els ratolins han rebut sis tipus de tractament: (a) sèrum fisiològic (1 ml/40 g) 12 hores abans del sacrifici; (b) una injecció de fenobarbital (FB) (40 mg/kg per via intraperitoneal), 12 hores abans del sacrifici; (c) 2 injeccions de FB, 24 i 12 hores abans del sacrifici; (d) 3 injeccions de FB, 36, 24 i 12 hores abans del sacrifici; (e) 4 injeccions de 48, 36, 24 i 12 hores abans del sacrifici, i (f) 5 injeccions de FB, 60, 48, 36, 24 i 12 hores abans del sacrifici.

1. Obtenció de la "fracció microsomal"

Preparació de la fracció sobrenedant de 10.000 × g de fetge de ratolí. — Els ratolins, prèviament mantinguts en dejuni durant 12 hores, són sacrificats mitjançant un cop al cap seguit de l'exsanguinació. Hom extreu els fetges i els talla a trossets ben petits. Totes les operacions a partir d'aquesta són realitzades sobre gel. Hom prepara un homogeneïtzat al 12,5 % (pes/volum) [1 gram de fetge + 7 volums de ClK isotònic (1,15 %) tamponat a pH 7,4 amb solució tampó de fosfat Na⁺/K⁺] mitjançant l'homogeneïtzació del teixit hepàtic tallat a trossets en un homogeneïtzador de Potter-Elvehjem durant 1 minut. Hom centrifuga l'homogeneïtzat a 10.000 × g durant 10 minuts a 5 °C per extreure els nuclis i mitocondries. La fracció sobrenedant d'aquesta centrifugació a 10.000 × g conté els microsomes i proteïnes solubles. Un volum de 1,0 ml de la fracció sobrenedant de la centrifugació a 10.000 × g equival a 125 mg de fetge.

Preparació dels microsomes a partir de la fracció sobrenedant de la centrifugació a 10.000 × g. — Hom pipeteja mostres de 13,0 ml de la fracció sobrenedant a petits tubs de centrifuga Spinco (Beckman LS-65). Cal

assegurar-se que els tubs són plens i que els taps són ben tancats. Hom centrifuga a 40.000 r.p.m. en un rotor SW-40Ti durant 1 hora. Després hom descarta el líquid sobrenedant. Cal eliminar les traces d'hemoglobina, motiu pel qual cal resuspendre el *pellet* en C1K al 1,15 % a menys de 4 °C i recentrifugar a 100.000 × g durant 30 minuts. Després d'aquestes operacions els microsomes presents en un tub de 13,0 ml —equivalent a 1625 mg de pes de fetge humit— han d'ésser resuspendos en 19,5 ml de solució tampó fosfat 0,05 M de pH 7,6 amb EDTA a concentració 10⁻³M. El *pellet* pot ésser conservat d'un dia per l'altre a -15 °C cobert amb 1 ml de solució de tampó fosfat pH 7,4 però, com veurem després, aquesta maniobra produeix una disminució de l'activitat espectral del citocrom P-450, motiu pel qual hem fet sempre les lectures espectrofotomètriques el mateix dia de l'obtenció de la «fracció microsomal».

2. Determinació de les proteïnes

La concentració de proteïna de la suspensió obtinguda és del voltant de 2 mg per ml, bé que calgui determinar-la en cada cas, per a expressar finalment la «concentració» de citocrom P-450 en unitats/mg de proteïna. Hem determinat la concentració de proteïnes en el sobrenadant de la centrifugació a 10.000 × g, mitjançant el mètode de Lowry i cols.⁵⁹ modificat³⁸. Aquesta tècnica té un marge de linealitat espectrofotomètrica (a 650 nm) entre 15 i 110 µg de proteïna, motiu pel qual és preferible a l'original de Lowry i cols., bé que també calgui dissoldre la mostra de proteïna (0,1 ml) amb 0,9 ml d'aigua.

3. Lectures espectrofotomètriques

Hem realitzat les lectures amb un espectrofotòmetre Beckman Acta III. Hom col·loca 3 ml de la suspensió de microsomes en cadascuna de les dues cubetes (mostra i referència). Hem fet primer un *scanning* d'ambdues cubetes des de 500 nm fins 370 nm per a obtenir una línia de base. Després hem afegit pentobarbital (que dona un espectre de fixació de tipus I) (vegeu figura 2), a concentracions creixents a la cubeta de la mostra, i hem registrat l'espectre diferencial en cada cas. Hem registrat l'espectre diferencial després d'afegir 1, 2, 3, 4, 5, 10, 12, 15 i 20 µl d'una solució 0,3M de pentobarbital amb xeringues Hamilton de cromatografia de gasos. Aquestes quantitats donarien concentracions en cubeta compreses entre 1 × 10⁻⁴M i 2 × 10⁻³M de pentobarbital. En previsió de possibles variacions en les lectures, degudes a diferències en el temps passat des de l'addició de la mostra fins la lectura, hem examinat la influència del moment de la lectura sobre els resultats obtinguts, i hem fixat un interval de 3

minuts i 30 segons per a començar el *scanning* (vegeu Resultats). A més, a causa del fet que les solucions de barbitúrics presenten hidròlisi —concretament una solució 0,3 M de pentobarbital té un pH=9,9—, hem observat la influència de les variacions del pH sobre l'espectre diferencial, mitjançant el seu registre després de l'addició de 1, 2, 3, 4, 5, 10, 12, 15

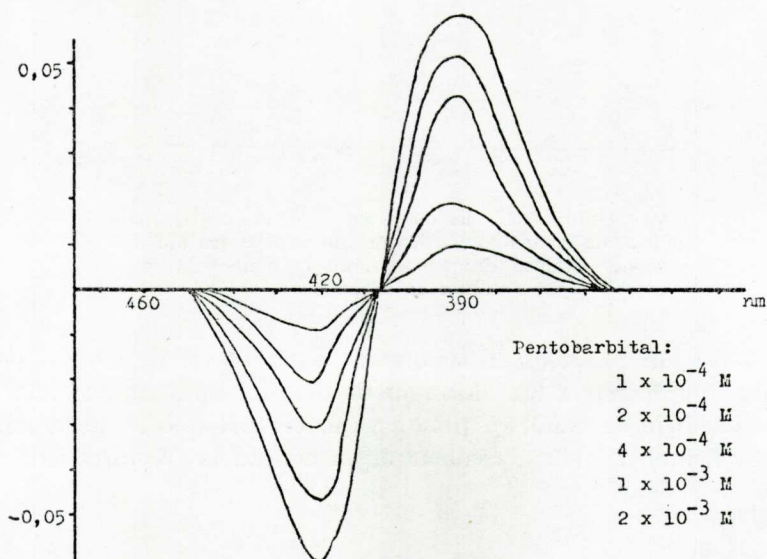


FIG. 2. — Espectre diferencial de fixació del pentobarbital al citocrom P-450. Aquest espectre té un màxim a 387 nm, un mínim a 420 nm i la isobèstica a 407 nm.

i 20 μ l d'una solució de NaOH de pH=9,9. Puix que l'addició de NaOH donava lloc a lectures —atribuïbles sense cap dubte exclusivament a les variacions de pH— (vegeu Resultats), hem afegit sempre a la cubeta de referència un volum d'aquesta solució de NaOH equivalent al volum de la solució de pentobarbital afegida a la cubeta de la mostra.

RESULTATS

Influència del temps en la lectura espectrofotomètrica. — Tal com indiquem en la figura 3, la lectura espectrofotomètrica tarda uns minuts a establir-se. Per això hem mesurat sempre les lectures 3 minuts i 30 segons després de l'addició del pentobarbital a la cubeta de la mostra,

i hem començat sempre els registres continus des de 500 nm fins 350 nm, 3 minuts després de l'addició del pentobarbital.

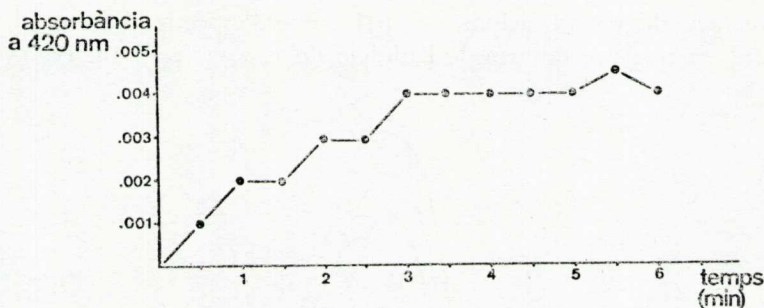


FIG. 3. — Influència del temps en la lectura espectrofotomètrica de la densitat òptica màxima a $\lambda = 420$ nm després de l'addició de pentobarbital (3×10^{-4} M) a la cubeta de la mostra

Influència del pH sobre les lectures a $\lambda = 420$ nm i a $\lambda = 390$ nm. — En la figura 4 representem les variacions de densitat òptica observades després de l'addició de NaOH a pH=9,9 (mateix pH que el de la solució 0,3 M de pentobarbital) a la cubeta de la mostra. Les lectures han estat

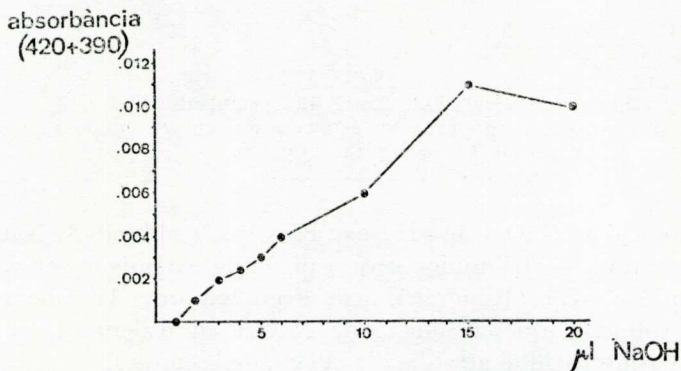


FIG. 4. — Variacions del valor absolut de l'absorbància a 420 nm més el valor absolut de l'absorbància a 390 nm produïdes per l'addició de NaOH pH = 9,9 a la cubeta de la mostra.

fetes a 420 nm i a 390 nm, i hem sumat ambdues lectures per cadascuna de les concentracions de NaOH. En conseqüència, quan hem fet espectres diferencials de fixació del pentobarbital al citocrom P-450, hem afegit sempre a la cubeta de referència un volum de l'esmentada solució

de NaOH igual al volum de solució 0,3 M de pentobarbital afegit a la cubeta de la mostra.

Relació entre quantitat de citocrom P-450 i espectre diferencial obtingut per l'addició de pentobarbital a la cubeta de la mostra. — Per a estudiar aquesta relació hem utilitzat una mostra de microsomes obtinguts de 5 ratolins que havien rebut 2 injeccions de fenobarbital 24 i 12 hores abans de llur sacrifici. Aquesta mostra ha estat examinada diluïda a 1/16, 1/8, 1/4, 1/2 i sense diluir. A la figura 5 representem la relació

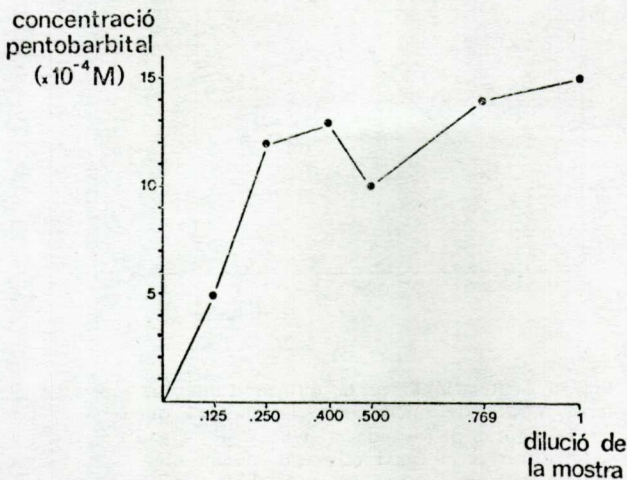


FIG. 5. — Relació entre la dilució d'una mateixa mostra de microsomes (diluïda a 1/8; 1/4; 1/2,5; 1/2; 1/1,3 i 1) i la concentració de substrat (pentobarbital) en cubeta que produeix canvis espectrals màxims a 420 nm i a 390 nm.

entre la quantitat de substrat afegit a les mostres en diferents dilucions i la concentració de pentobarbital en cubeta que dóna lloc a canvis espectrals màxims a 420 nm i a 390 nm. La relació entre aquests dos paràmetres no presenta linealitat. En canvi, la relació entre la dilució d'aquesta mateixa mostra de microsomes, i el canvi spectral màxim obtingut (a $\lambda=420 \text{ nm} + \lambda=390 \text{ nm}$), independentment de la concentració de pentobarbital en la cubeta de la mostra, presenta una linealitat estadísticament significativa ($p < 0,0001$; $r = 0,9982$). És a dir que existeix una relació entre el contingut de citocrom P-450 i el canvi spectral màxim obtenible amb un substrat que doni un aspecte de fixació de tipus I, però no existeix relació lineal aparent entre el contingut de

citocrom P-450 i la concentració de substrat necessària per a obtenir el canvi espectral màxim (vegeu figura 6).

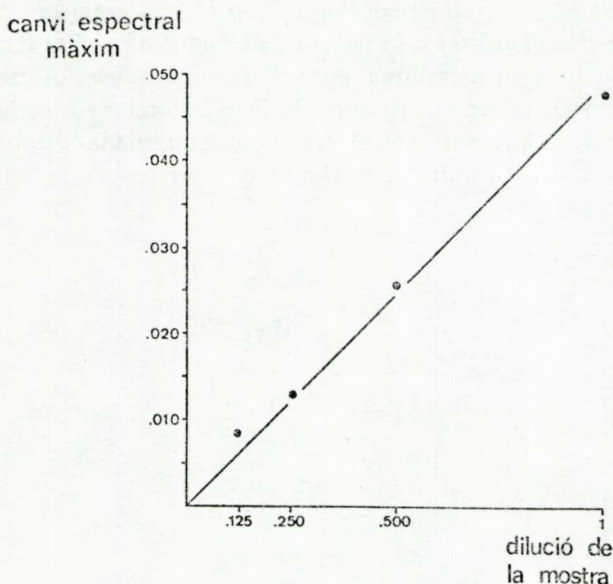
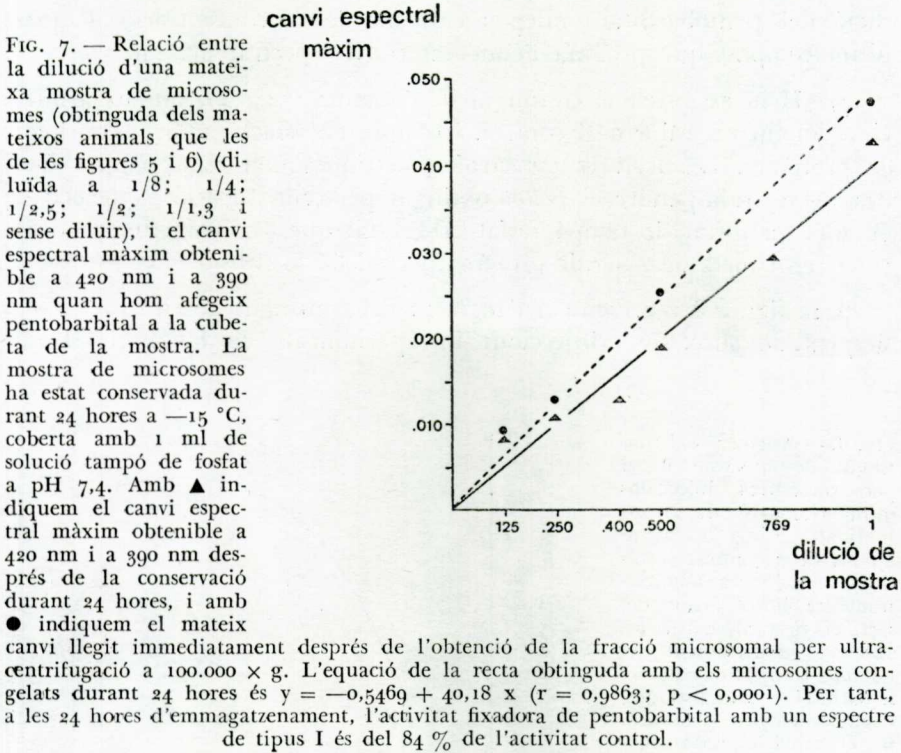


FIG. 6. — Relació entre la diluïció d'una mateixa mostra de microsomes (la mateixa que en la figura 5) (diluïda a 1/8; 1/4; 1/2 i sense diluir) i el canvi espectral màxim obtenible a 420 nm i a 390 nm quan hom afegeix pentobarbital. L'equació de la recta de regressió obtinguda és $y = 0,0375 + 47,9 x$. El coeficient de regressió és $r = 0,9982$ ($p < 0,0001$).

Influència de l'emmagatzament sobre la fixació del citocrom P-450 al pentobarbital. — La conservació del *pellet* obtingut per la ultracentrifugació a $100.000 \times g$ del sobrenedant de la centrifugació a $10.000 \times g$, a -15°C durant 24 hores, ha donat lloc a una disminució del canvi espectral màxim obtenible mitjançant l'addició de pentobarbital. Dels microsomes obtinguts dels mateixos ratolins que els emprats en l'experiència anterior (figura 6), n'hem guardat la meitat, immediatament després de la ultracentrifugació a $100.000 \times g$, a -15°C durant 24 hores, coberts amb 1 ml de solució tampó de fosfat a pH 7,4. La descongelació, resuspensió en solució tampó de fosfat 0,05 M de pH 7,6 amb EDTA 10^{-3} M, i la realització immediata d'un espectre diferencial per addició de pentobarbital a la cubeta de la mostra ha demostrat una disminució de la fixació de tipus I del pentobarbital. Aquest fet pot ésser observat

en la figura 7, en la que representem els canvis espectrals màxims a 420 nm i a 390 nm obtenibles mitjançant l'addició de pentobarbital a la cubeta de la mostra en relació amb la dilució de la mostra de fracció microsomal. Observeu que, bé que es conserva la relació lineal entre



quantitat de citocrom P-450 i canvis espectrals màxims obtenibles, el pendent de la recta és menor, fet que indicaria una disminució de la capacitat de fixació de tipus I.

Influència de l'administració de fenobarbital sobre el nivell de citocrom P-450. — Basats en els resultats anteriors, per a la determinació del citocrom P-450 en base als canvis espectrals observats després de l'addició de pentobarbital a la cubeta de la mostra, hem seguit les següents orientacions, a més de les esmentades en l'apartat «Material i mètodes».

1) Hem fet els registres continus des de 500 nm fins 350 nm 3 minuts després de l'addició del pentobarbital i l'agitació suau d'ambdues cubetes.

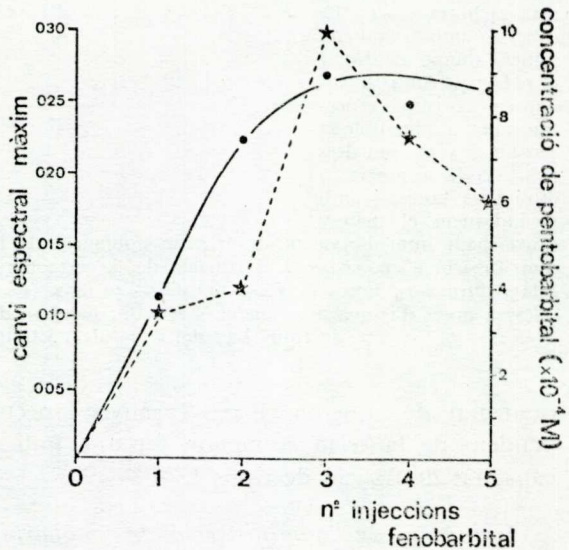
2) Hem afegit a la cubeta de referència un volum de solució de NaOH pH=9,9 igual al volum de la solució 0,3 M de pentobarbital afegida a la cubeta de la mostra.

3) Hem calculat el contingut de citocrom P-450 a partir dels canvis espectrals màxims obtenibles a 420 nm i a 390 nm després de l'addició del pentobarbital, independentment de la concentració d'aquest últim compost que produïa l'esmentat canvi spectral màxim.

4) Hem expressat el contingut de citocrom P-450 en unitats arbitràries, donant un valor 0 al control, i sempre en relació amb el contingut de proteïnes. Les lectures espectrofotomètriques han estat sempre fetes després de resuspendre el *pellet* obtingut per centrifugació a $100.000 \times g$ en una quantitat de tampó fosfat-EDTA tal que assolíssim una concentració en cubeta de 2 mg de proteïna per ml de suspensió.

A la figura 8 representem l'augment del contingut de citocrom P-450 després de successives injeccions intraperitoneals de fenobarbital (40

FIG. 8. — Augment del contingut de citocrom P-450 per successives injeccions intraperitoneals de fenobarbital (40 mg/kg) a intervals de 12 hores. (L'última injecció era administrada 12 hores abans del sacrifici dels animals). En absisses representem el nombre d'injeccions de fenobarbital administrades, i en ordenades (esquerra, ●) el canvi spectral màxim a 420 nm i a 390 nm obtenible mitjançant l'addició de pentobarbital a la cubeta de la mostra. Noteu que no hem observat un augment fins un replà de la concentració de pentobarbital en cubeta que produeix el canvi spectral màxim (ordenades, dreta, ★), ni tampoc cap relació aparent entre grau d'inducció i concentració de pentobarbital.



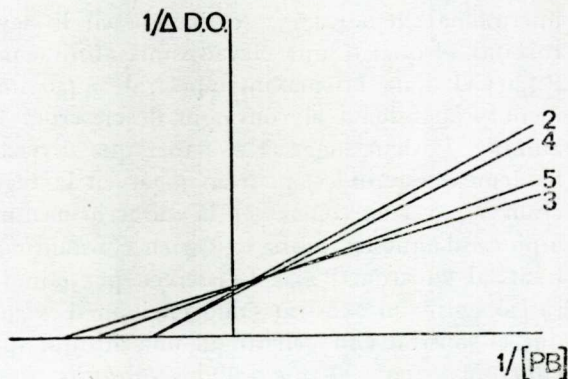
mg/kg) en 6 grups de 5 ratolins cadascun. Observeu que a partir de la 3.^a injecció hom pot observar ja una inducció màxima, i que a partir d'aquesta administració es conserva un replà d'inducció a condició que hom segueixi administrant el fenobarbital.

Canvis de la velocitat màxima (V_{max}) i de la K_s del sistema. — A la taula II indiquem la suma de les lectures espectrofotomètriques a 420 nm i a 390 nm obtingudes per l'addició de quantitats creixents de pentobarbital a la cubeta que conté mostres de microsomes de ratolins pretractats amb un nombre creixent d'injeccions de fenobarbital (40 mg/kg per via i.p.), administrades a intervals de 12 hores. La figura 9 és una representació del doble recíproc de la concentració de pentobarbital en

TAULA II. — Lectures espectrofotomètriques obtingudes per l'addició de quantitats creixents de pentobarbital (PB) a la cubeta que conté mostres de microsomes de ratolins pretractats amb un nombre creixent d'injeccions de fenobarbital (FB) (40 mg/kg, i.p.). (Absorbància $\times 10^{-3}$).

Volum de PB 0,3 M afegit	[PB]	CONTROL	PRETRACTATS AMB FENOBARBITAL (n.º injec.)				
			1	2	3	4	5
1 μ l	$1 \times 10^{-4}M$	1,0	5,0	6,0	10,5	7,5	9,5
2 μ l	$2 \times 10^{-4}M$	1,5	6,5	17,0	17,0	13,5	14,5
3 μ l	$3 \times 10^{-4}M$	1,5	6,0	15,0	20,5	19,0	19,5
4 μ l	$4 \times 10^{-4}M$	2,0	6,5	17,0	22,0	22,0	22,0
5 μ l	$5 \times 10^{-4}M$	2,5	7,0	18,0	23,0	24,0	23,5
6 μ l	$6 \times 10^{-4}M$	3,0	7,0	18,0	—	—	—
10 μ l	$1 \times 10^{-3}M$	3,0	7,5	18,0	25,5	24,5	25,0
15 μ l	$1,5 \times 10^{-3}M$	—	—	—	24,0	23,5	25,0

FIG. 9. — Representació segons el mètode de Lineweaver i Burk de la inversa de la concentració de pentobarbital en cubeta vs la inversa de la lectura espectrofotomètrica diferencial obtinguda amb cadascuna de les concentracions. 2: ratolins que han rebut 2 injeccions de fenobarbital (FB) 24 i 12 hores abans de llur sacrifici ($r = 0,9235$; $p < 0,001$); 3: ratolins que han rebut 3 injeccions, 36 24 i 12 hores abans de llur sacrifici ($r = 0,9839$; $p < 0,001$); 4: ratolins que han rebut 4 injeccions, 48, 36, 24 i 12 hores abans de llur sacrifici ($r = 0,9797$; $p < 0,001$), i 5: ratolins que han rebut 5 injeccions, 60, 48, 36, 24 i 12 hores abans de llur sacrifici ($r = 0,9903$; $p < 0,001$). La dosi de fenobarbital fou de 40 mg/kg administrats per via intraperitoneal. Vegeu que existeix una variació



mínima del valor de V_{max} i una variació significativa del valor de K_s .

cubeta *vs* la suma de les dues lectures espectrofotomètriques en els microsomes dels ratolins pretractats amb 2, 3, 4 i 5 injeccions de fenobarbital. A la taula III donem els valors obtinguts de K_s i de la V_{max} fictícia per als ratolins pretractats amb 2, 3, 4 i 5 injeccions de fenobarbital. Cal

TAULA III. — Valors de V_{max} fictícia i de K_s pel pentobarbital en els ratolins pretractats amb 2, 3, 4 i 5 injeccions de fenobarbital (FB).

n.º injeccions FB (40 mg/kg, i.p.)	« V_{max} »	K_s ($\times 10^{-4}$ M)
2	33,8	4,2
3	31,0	1,9
4	38,8	4,0
5	32,8	2,4

fer notar ací que, bé que hom observa una gran dispersió en els valors de K_s , els valors de la V_{max} fictícia són bastant homogenis, quan era d'esperar que trobaríem resultats inversos en aquest sentit, puix que suposàvem que la K_s es mantindria constant.

DISCUSSIÓ

La determinació tradicional del citocrom P-450 en mostres de fracció microsomal hepàtica^{85, 86} és basada en la seva fixació del monòxid de carboni, el qual té una elevadíssima afinitat per ell. El complex citocrom P-450-CO dona un màxim espectral a 450 nm, d'una intensitat directament proporcional al contingut de citocrom P-450. No obstant, diversos autors^{57, 110} han suggerit el paper que diversos substrats endògens (probablement esteroides) podrien jugar en la regulació dels nivells del citocrom P-450, i en concret en la inducció enzimàtica. En tot cas, segons la hipòtesi d'aquests autors, existirien constantment certs substrats endògens fixats al citocrom P-450. Existeixen per tant tres possibilitats en la interacció entre un substrat endogen i un d'exogen pel citocrom P-450: (1) que el substrat endogen tingui una afinitat superior a la de l'exogen pel citocrom P-450; (2) que ambdós substrats tinguin afinitats similars, i (3) que el substrat exogen tingui una afinitat superior a la de l'endogen. En tot cas, i sobretot si es verifiquen les dues primeres possibilitats, la determinació del contingut total de citocrom P-450 no dona una idea de la capacitat per a metabolitzar un substrat exogen, puix que part dels *loci*

de fixació del citocrom estarien ocupats pel substrat endogen. El CO desplaçaria aquests substrats amb facilitat, però un fàrmac —concretament un fàrmac del qual es vulgui estudiar la metabolització— només desplaçarà els possibles substrats endògens si té una afinitat pel citocrom P-450 superior a la dels esmentats substrats. Aquesta és la base de la nostra tècnica de determinació: no es tractaria de mesurar la intensitat de l'espectre diferencial (a 450 nm) entre microsomes sols (cubeta de referència) i microsomes gasats amb CO (cubeta de la mostra), sinó l'espectre diferencial (a 420 nm i a 390 nm) d'un fàrmac afegit als microsomes de la cubeta de la mostra. És important fer notar que el citocrom b_5 , únic citocrom a més del P-450 que es troba a la fracció microsomal, no dona espectres diferencials de fixació amb fàrmacs, ja siguin de tipus I o de tipus II. Per tant, l'espectre que hom pugui obtenir amb un fàrmac de tipus I com el pentobarbital només pot ésser conseqüència de la fixació d'aquest fàrmac al citocrom P-450, i eventualment de la competició d'aquest fàrmac amb un altre substrat pel punt de fixació del citocrom.

Un aspecte interessant de la tècnica ací desenvolupada és que hom obté la millor correlació amb el contingut de citocrom P-450 quan mesura el canvi espectral màxim obtenible (figura 6), però no la concentració de pentobarbital que cal afegir a la cubeta per a obtenir aquest canvi espectral màxim. De fet els mateixos OMURA i SATO⁸⁵ correlacionen el contingut de citocrom P-450 amb el canvi espectral obtingut. És a dir, existeix una relació directa entre lectura i quantitat de complex fàrmac-citocrom P-450 format, que en realitat és el que interessa mesurar si hom vol conèixer la capacitat de metabolització d'un fàrmac del qual es llegeix la formació d'un seu complex amb el citocrom P-450.

Això no obstant, el fet que no existeixi una relació lineal aparent —ni simple, ni semilogarítmica, ni en representació de dobles recíprocs— entre quantitat de citocrom P-450 i concentració de pentobarbital que cal assolir a la cubeta, fa desconfiar de la possibilitat de definir un paral·lisme clar entre cinètica de la metabolització (K_m de Michaelis-Menten) i constants de fixació espectral (K_s , comparable a la K_m de Michaelis-Menten). Malgrat el valor limitat de la representació de dobles recíprocs, els resultats de les taules II i III i de la figura 9 són inesperats en el sentit que la inducció enzimàtica, que augmenta la velocitat màxima del sistema de metabolització^{65, 88, 95, 106}, produeix en aquest cas una variació aparent de la K_s sense variacions en la V_{max} . Existirien diferents explicacions d'aquest fenomen. En primer lloc, és possible que el citocrom P-450 format *de novo* com a resultat de la inducció tingui una diferent especificitat de substrat que el normalment trobat en els animals sense pretractar. Aquesta possibilitat podria tenir dues explicacions: (1) que el

citocrom P-450 format de nou estigui associat d'una manera diferent a la membrana microsomal; (2) que se sintetitzi una forma diferent de citocrom P-450, amb una diferent especificitat de substrat, que es manifestaria per una K_s diferent. Una segona hipòtesi, obtinguda a partir del fet que la representació de la figura 9 és típica d'un antagonisme competitiu, seria la que postula l'existència d'una competició entre el pentobarbital i un altre substrat pel punt de fixació I del citocrom P-450. Aquest substrat podria molt bé ésser el fenobarbital, puix que també es fixa al citocrom P-450, i té un temps de vida mitjana molt prolongat. Un aspecte interessant dels resultats obtinguts és que la variació de la K_s no guarda cap relació amb el nombre d'injeccions de fenobarbital administrades. Aquest fet abonaria més la segona hipòtesi. Si el fenobarbital donés lloc a la síntesi d'un citocrom P-450 amb una diferent especificitat de substrats, la K_s variaria d'acord amb el nombre d'injeccions de fenobarbital administrades, perquè, bé que hom arriba a obtenir un replà d'inducció, el nou nivell més elevat de citocrom P-450 ho seria a expenses del nou citocrom. Per tant hauria d'augmentar progressivament la proporció del nou citocrom —amb una especificitat de substrat diferent— i en conseqüència hauria de variar progressivament la K_s . En canvi, la distribució erràtica dels valors de K_s respecte al nombre d'injeccions de fenobarbital administrades seria explicable en relació amb la presència de fenobarbital, que interferiria sobre la fixació del pentobarbital.

APÈNDIX

Prenent l'equació de Michaelis-Menten

$$v = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

(on v és la velocitat de la reacció per una concentració determinada de substrat $[S]$, V_{\max} la velocitat màxima del sistema i K_m la constant de Michaelis-Menten, és a dir la concentració de substrat que dona lloc a una velocitat de la reacció meitat de la velocitat màxima del sistema, i indicativa de l'afinitat del substrat per l'enzim), i invertint-la, tenim

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m + [S]}{V_{\max} \cdot [S]}$$

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\max} \cdot [S]} + \frac{[S]}{V_{\max} [S]}$$

$$\frac{1}{v} = \frac{i}{V_{\max}} + \frac{K_m}{V_{\max}} \times \frac{1}{[S]}$$

Aquesta equació correspon a la d'una recta ($y = a + bx$), on y és $1/v$; x és $1/[S]$; el valor d' a és $1/V_{\max}$ i el valor de b és K_m/V_{\max} . Per tant, si hom obté l'equació de la recta de regressió que correspon a una representació de doble recíproc, pot calcular:

$$V_{\max} = \frac{1}{a}$$

$$i \quad K_m = V_{\max} \times b$$

BIBLIOGRAFIA

1. ALVARES, A. P., BICKERS, D. R. i KAPPAS, A.: Induction of drug-metabolizing enzymes and aryl-hydrocarbon hydroxylase by microscope immersion oil. *Life Sci.*, 14: 853-860, 1974.
2. APPLEBY, C. A.: A soluble haemoprotein P-450 from nitrogen-fixing *Rhizobium* bacteroids. *Biochim. Biophys. Acta*, 147: 399-402, 1967.
3. APPLEBY, C. A.: Properties of soluble hemoprotein P-450 purified from *Rhizobium japonicum* bacteroids. A Structure and Function of Cytochromes. Dirigit per K. Okunuki, M. D. Kamen i I. Sekuzu (pp. 666-679). University Park Press, Baltimore, 1968.
4. APPLEBY, C. A.: Electron transport systems of *Rhizobium japonicum*. I. Haemoprotein P-450, other CO-reactive pigments, cytochromes and oxidases in bacteroids from N_2 -fixing root nodules. *Biochim. Biophys. Acta*, 172: 71-87, 1969.
5. APPLEBY, C. A.: Electron transport systems of *Rhizobium japonicum*. II. *Rhizobium* haemoglobin, cytochromes and oxidases in free-living (cultured) cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 172: 88-105, 1969.
6. ARCOS, J. C., CONNEY, A. H. i BUU-HOI, N. P.: Induction of microsomal enzyme synthesis by polycyclic aromatic hydrocarbons of different molecular sizes. *J. biol. Chem.*, 236: 1291-1296, 1961.
7. BOOTH, J. i GILLETTE, J. R.: The effect of anabolic steroids on drug metabolism by microsomal enzymes in rat liver. *J. Pharmac. exp. Ther.*, 137: 374-379, 1962.
8. BRODIE, B. B., AXELROD, J., COOPER, J. R.; GAUDETTE, L., LA DU, B. N., MITOMA, C. i UDENFRIEND, S.: Detoxication of drugs and other foreign compounds by liver microsomes. *Science*, 121: 603-604, 1955.
9. BRODIE, B. B., GILLETTE, J. R. i LA DU, B. N.: Enzymatic metabolism of drugs and other foreign compounds. *Ann. Rev. Biochem.*, 27: 427-454, 1958.
10. COHEN, G. M., PETERSON, B. W., MANNERING, G. J.: Interactions of Δ^9 -tetrahydrocannabinol with the hepatic microsomal drug metabolizing system. *Life Sci.*, 10: 1207-1215, 1971.

11. CONNEY, A. H.: A (Discussió): Species differences and individual variations in drug metabolism; dins BURNS, J. J.: *A Proceedings of the First International Pharmacological Meeting. Vol. 6: Metabolic Factors Controlling Duration of Drug Action*. Dirigit per B. B. Brodie i E. G. Erdős (p. 288). Pergamon Press, Londres, 1962.
12. CONNEY, A. H.: Pharmacological implications of microsomal enzyme induction. *Pharmacol. Rev.*, 19: 317-366, 1967.
13. CONNEY, A. H., BROWN, R. R., MILLER, J. A. i MILLER, E. C.: The metabolism of methylated aminoazo dyes. VI. Intracellular distribution and properties of the demethylase system. *Cancer Res.*, 17: 628-633, 1957.
14. CONNEY, A. H., DAVISON, C., GASTEL, R. i BURNS, J. J.: Adaptative increases in drug-metabolizing enzymes induced by phenobarbital and other drugs. *J. Pharmacol. exp. Ther.*, 130: 1-8, 1960.
15. CONNEY, A. H., WELCH, R. M., KUNTZAMAN, R. i BURNS, J. J.: Effects of pesticides on drug and steroid metabolism. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 8: 2-10, 1967.
16. COON, M. J. i LU A. Y. H.: Fatty acid ω -oxidation in a soluble microsomal enzyme system containing P-450. *A Microsomes and Drug Oxidations*. Dirigit per J. R. Gillette, A. H. Conney, G. J. Cosmides, R. W. Estabrook, J. R. Fouts i G. J. Mannering (pp. 151-166). Academic Press, New York, 1969.
17. COOPER, J. R. i BRODIE, B. B.: The enzymatic metabolism of hexobarbital (Evipal). *J. Pharmacol. exp. Ther.*, 114: 409-417, 1955.
18. COOPER, D. Y., LEVIN, S.; NARASHIMHULU, S., ROSENTHAL, O. i ESTABROOK, R. W.: Photochemical action spectrum of the terminal oxidase of mixed function oxidase systems. *Science*, 147: 400-402, 1965.
19. CRESS, C. R. i STROTHER, A.: Effects on drug metabolism of carbaryl and 1-naphthol in the mouse. *Life Sci.*, 14: 861-872, 1964.
20. DAVIES, D. S., GIGON, P. L. i GILLETTE, J. R.: Species and sex differences in electron transport systems in liver microsomes and their relationship to ethylmorphine demethylation. *Life Sci.*, 8: 85-91, 1969.
21. DENYS, A., GILBERT, E. i LEVY, J.: Caractères de l'induction enzymatique provoquée chez la souris per le chlordane. III. Influence de l'électroshock chez des souris induites par le chlordane. *Thérapie*, 28: 1233-1250, 1973.
22. DUBE, D. K., DUTTA, H. N., PAL, B. i GHOSH, J. J.: Effect of chlorpromazine on induction of different hepatic enzymes. *Biochem. Pharmacol.*, 21: 2249-2251, 1972.
23. ESTABROOK, R. W., COOPER, D. Y. i ROSENTHAL, O.: The light reversible carbon monoxide inhibition of the steroid C₂₁-hydroxylase system of the adrenal cortex. *Biochem. Z.*, 338: 741-755, 1963.
24. FERGUSON, H. C.: Effect of red cedar chip bedding on hexobarbital and pentobarbital sleep time. *J. Pharm. Sci.*, 55: 1142-1143, 1966.
25. FOUTS, J. R.: Factors influencing the metabolism of drugs in liver microsomes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 104: 875-880, 1963.
26. FOUTS, J. R. i ROGERS, L. A.: Morphological changes in the liver accompanying stimulation of microsomal drug metabolizing enzyme activity by phenobarbital, chlordane, benzpyrene or methylcholanthrene in rats. *J. Pharmacol. exp. Ther.*, 147: 112-119, 1965.
27. FUJITA, P., ITAGAKI, E. i SATO, R.: Purification and properties of cytochrome b₁ from *Escherichia coli*. *J. biol. Chem.*, 53: 282-290, 1963.
28. GARFINKEL, D.: Studies on pig liver microsomes. I. Enzymic and pigment composition of different microsomal fractions. *Arch. Biochem. Biophys.*, 77: 493-509, 1958.
29. GELBOIN, H. V. i BLACKBURN, N. R.: The stimulatory effect of 3-methylcholanthrene on benzpyrene hydroxylase activity in several rat tissues: inhibition by Actinomycin D and puromycin. *Cancer Res.*, 24: 356-362, 1964.
30. GILLETTE, J. R.: Metabolism of drugs and other foreign compounds by enzymatic mechanisms. *Prog. Drug. Res.*, 6: 13-73, 1963.

31. GILLETTE, J. R.: Biochemistry of drug oxidation and reduction by enzymes in hepatic endoplasmic reticulum. *Adv. Pharmacol.*, 4: 219-261, 1966.
32. GILLETE, J. R., BRODIE, B. B. i LA DU, B. N.: The oxidation of drugs by liver microsomes: on the role of TPNH and oxygen. *J. Pharmacol. exp. Ther.*, 119: 532-549, 1957.
33. GOLDSTEIN, A., ARONOW, L. i KALMAN, S. M.: *Principles of drug action: the basis of pharmacology*. 2.^a edició. John Wiley & Sons, New York, 1974.
34. GUARINO, A. M., GRAM, T. E., GIGON, P. L., GREENE, F. E. i GILLETTE, J. R.: Changes in Michaelis and spectral constants for aniline in hepatic microsomes from phenobarbital-treated rats. *Mol. Pharmacol.*, 5: 131-136, 1969.
35. GUARINO, A. M., REAGAN, R. L. i GRAM, T. E.: Submicrosomal distribution of hepatic drug-metabolizing components in the Gunn rat. *Pharmacology*, 10: 257-271, 1973.
36. HART, L. G. i FOUTS, J. R.: Further studies on the stimulation of the hepatic microsomal drug-metabolizing enzymes by DDT and its analogs. *Arch. exp. Pathol. Pharmacol.*, 249: 486-500, 1965.
37. HART, L. G., SHULTICE, R. W. i FOUTS, J. R.: Stimulatory effects of chlordane on hepatic microsomal drug metabolism in the rat. *Toxicol. appl. Pharmacol.*, 5: 371-386, 1963.
38. HARTREE, E. F.: Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Analyt. Biochem.*, 48: 422-427, 1972.
39. HAYAISHI, O.: Oxigenases. *A International Congress of Biochemistry 6th, New York. Proceedings of the Plenary Sessions and the Program, vol. 33* (pp. 31-43). Washington, D.C., 1964.
40. HILDEBRANDT, A., REMMER, H. i ESTABROOK, R. W.: Cytochrome P-450 of liver microsomes — one pigment or many. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 30: 607-619, 1968.
41. HILDEBRANT, A. i ESTABROOK, R. W.: Spectrophotometric studies of cytochrome P-450 of liver microsomes after induction with phenobarbital and 3-methylcholanthrene. *A Microsomes and Drug Oxidations*. Dirigit per J. R. Gillete, A. H. Conney, G. J. Cosmides, R. W. Estabrook, J. R. Fouts i G. J. Manering (pp. 331-347). Academic Press, New York, 1969.
42. IMAI, Y. i SATO, R.: Substrate interaction with hydroxylase system in liver microsomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 22: 620-626, 1966.
43. IMAI, Y. i SATO, R.: Studies on the substrate interactions with P-450 in drug hydroxylation by liver microsomes. *J. Biochem.*, 62: 239-249, 1967.
44. ISHIDATE, K., KAWAGUCHI, K. i TAGAWA, K.: Change in P-450 content accompanying aerobic formation of mitochondria in yeast. *J. Biochem.*, 65: 385-392, 1969.
45. ISHIDATE, K., KAWAGUCHI, K., TAGAWA, K. i HAGIHARA, B.: Hemoproteins in anerobically ground yeast cells. *J. Biochem.*, 65: 375-383, 1969.
46. JORI, A. i BRIATTICO, G.: Effect of eucalyptol on microsomal enzyme activity of foetal and newborn rats. *Biochem. Pharmacol.*, 22: 543-544, 1973.
47. KATAGIRI, M., GANGULI, B. N. i GUNSALUS, I. C.: A soluble cytochrom P-450 functional in methylene hydroxylation. *J. biol Chem.*, 243: 3543-3546, 1968.
48. KHANNA, J. M., KALANT, H. i LIN, G.: Significance *in vivo* of the increase in microsomal ethanol-oxidizing system after chronic administration of ethanol, phenobarbital and chlorcyclizine. *Biochem. Pharmacol.*, 21: 2215-2226, 1972.
49. KINOSHITA, F. K., FRAWLEY, J. N. i DUBOIS, K. P.: Quantitative measurement of induction of hepatic microsomal enzymes by various dietary levels of DDT and toxaphene in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 9: 505-513, 1966.
50. KINOSHITA, T. i HORIE, S.: Studies on P-450. III. On the absorption spectrum of P-450 in rabbit liver microsomes. *J. Biochem.*, 61: 26-34, 1967.
51. KLINGENBERG, M.: Pigments of rat liver microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.*, 75: 376-386, 1958.
52. KUNTZMAN, R., JACOBSON, M., SCHNEIDMAN, K. i CONNEY, A. H.: Similarities between oxidative drug-metabolizing enzymes and steroid hydroxylases in liver microsomes. *J. Pharmacol. exp. Ther.*, 146: 280-285, 1964.

53. KUNTZMAN, R., LAWRENCE, D. i CONNEY, A. H.: Michaelis constants for the hydroxylation of steroid hormones and drugs by rat liver microsomes. *Mol. Pharmacol.*, 1: 163-167, 1965.
54. LA DU, B. N., GAUDETTE, L., TROUSOF, N. i BRODIE, B. B.: Enzymatic dealkylation of aminopyrine (Pyramidon) and other alkylamines. *J. biol. Chem.*, 214: 741-752, 1955.
55. LATHAM, A. N., MILLBANK, L., RICHENS, A. i ROWE, D. J. F.: Liver enzyme induction by anticonvulsant drugs and its relationship to disturbed calcium and folic acid metabolism. *J. clin. Pharmacol.*, 3: 337-342, 1973.
56. LEVIN, W. i CONNEY, A. H.: Stimulatory effect of polycyclic hydrocarbon and aromatic azo derivatives on the metabolism of 7,12-dimethylbenz(a)-anthracene. *Cancer Res.*, 27: 1931-1938, 1967.
57. LIPSCOMB, J. D. i GUNSALUS, I. C.: Structural aspects of the active site of cytochrome P-450_{cam}. *Drug Metab. Dispos.*, 1: 1-5, 1973.
58. LONG, R. F.: Induction of drug-metabolizing enzymes and cytochrome P-450. *Biochem. J.*, 115: 26P, 1969.
59. LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. i RANDALL, R. J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. biol. Chem.*, 193: 265-275, 1951.
60. LU, A. Y. H. i COON, M. J.: Role of hemoprotein P-450 in fatty acid ω -hydroxylation in a soluble enzyme system from liver microsomes. *J. biol. Chem.*, 243: 1331-1332, 1968.
61. LU, A. Y. H., JUNK, K. W. i COON, M. J.: Resolution of the cytochrome P-450-containing ω -hydroxylation system of liver microsomes into three components. *J. biol. Chem.*, 244: 3714-3721, 1969.
62. LU, A. Y. H., STROBEL, H. W. i CONN, M. J.: Hydroxylation of benzphetamine and other drugs by a solubilized form of cytochrome P-450 from liver microsomes: lipid requirement for drug demethylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 36: 545-551, 1969.
63. MACLENNAN, D. H., TZAGOLOFF, A. i MC-CONNELL, D. G.: The preparation of microsomal electron-transfer complexes. *Biochim. Biophys. Acta*, 131: 59-80, 1967.
64. MALLOW, S. i BAESL, T. J.: Effect of ethanol on rates of elimination and metabolism of zoxazolamine, hexobarbital, and warfarin sodium in the rat. *Biochem. Pharmacol.*, 21: 1667-1678, 1972.
65. MANNERING, G. J.: Significance of stimulation and inhibition of drug metabolism in pharmacological testing. A *Selected Pharmacological Testing Methods*. Dirigit per A. Bruger (pp. 51-119). Marcel Dekker, New York, 1968.
66. MANNERING, G. J.: Microsomal enzyme systems which catalyze drug metabolism. A *Fundamentals of Drug Metabolism and Drug Disposition*. Dirigit per B. N. La Du, H. G. Mandel i E. L. Way (pp. 206-252). Williams & Wilkins, Baltimore, 1971.
67. MARVER, H. S.: The role of heme in the synthesis and repression of microsomal protein. A *Microsomes and Drug Oxidations*. Dirigit per J. R. Gillete, A. H. Conney, G. J. Cosmides, R. W. Estabrook, J. R. Fouts i G. J. Mannerling (pp. 495-518). Academic Press, New York, 1969.
68. MASON, H. S.: Mechanism of oxygen metabolism. *Science*, 125: 1185-1188, 1957.
69. MITANI, F. i HORIE, S.: Studies on P-450. V. On the substrate-induced spectral change of P-450 solubilized from bovine adrenocortical mitochondria. *J. Biochem.*, 65: 265-280, 1969.
70. MITOMA, C., SORICH, T. J. i NEUBAUER, S. E.: The effect of caffeine on drug metabolism. *Life Sci.*, 7: 145-151, 1968.
71. MIYAKE, Y., GAYLOR, J. L. i MASON, H. S.: Properties of a submicrosomal particle containing P-450 and flavoprotein. *J. Biol. Chem.*, 243: 5788-5797, 1968.
72. MORSELLI, P. L., RIZZO, M. i GARATTINI, S.: Interaction between phenobarbital and diphenylhydantoin in animals and in epileptic patients. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 179: 88-107, 1971.
73. MUELLER, G. C. i MILLER, J. A.: The reductive cleavage of 4-dimethylaminoazobenzene by rat liver: the intracellular distribution of enzyme systems and its

- requirement for triphosphopyridine nucleotide. *J. biol. Chem.*, 180: 1125-1136, 1949.
74. MUELLER, G. C. i MILLER, J. A.: The metabolism of methylated aminoazo dyes. II. Oxidative demethylation by rat liver homogenates. *J. biol. Chem.*, 202: 579-587, 1953.
75. NARASHIMHULU, S., COOPER, D. Y. i ROSENTHAL, O.: Spectrophotometric properties of a triton-clarified steroid 21-hydroxylase system of adrenocortical microsomes. *Life Sci.*, 4: 2102-2107, 1965.
76. NETTER, K. J. i SEIDEL, G.: An adaptatively stimulated O-demethylating system in rat liver microsomes and its kinetic properties. *J. Pharmac. exp. Ther.*, 146: 61-65, 1964.
77. NISHIBAYASHI, H., OMURA, T. i SATO, R.: The binding of ethylisocyanide by hepatic microsomal hemoprotein. *Biochim. Biophys. Acta*, 112: 651-654, 1966.
78. NISHIBAYASHI, H., OMURA, T., SATO, R. i ESTABROOK, R. W.: Comments on the absorption spectra of hemoprotein P-450. *A Structure and Function of Cytochromes*. Dirigit per K. Okunuki, M. D. Kamen i I. Sekuzu (pp.658-665). University Park Press, Baltimore, 1968.
79. NISHIBAYASHI, H. i SATO, R.: Preparation of hepatic microsomal particles containing P-450 as sole heme constituent an absolute spectra of P-450. *J. Biochem.*, 63: 766-779, 1968.
80. NOVICK, W. J., STOHLER, C. M. i SWAGZDIS, J.: The influence of steroids on drug metabolism in the mouse. *J. Pharmac. exp. Ther.*, 151: 139-142, 1966.
81. O'MALLEY, K., BROWNING, M., STEVENSON, I. i TURNBULL, M. J.: Stimulation of drug metabolism in man by tricyclic antidepressants. *Eur. J. clin. Pharmacol.*, 6: 102-106, 1973.
82. OMURA, T., SANDERS, E., ESTABROOK, R. W., COOPER, D. Y. i ROSENTHAL, O.: Isolation from adrenal cortex of a non-heme iron protein and a flavoprotein functional as a reduced triphosphopyridine nucleotide-cytochrom P-450 reductase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 117: 660-673, 1966.
83. OMURA, T. i SATO, R.: A new cytochrom in liver microsomes. *J. biol. Chem.*, 237: 1375-1376, 1962.
84. OMURA, T. i SATO, R.: Fractional solubilization of adenoproteins and partial purification of carbon monoxide-binding cytochrome from liver microsomes. *Biochim. Biophys. Acta*, 71: 224-226, 1963.
85. OMURA, T. i SATO, R.: The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *J. biol. Chem.*, 239: 2370-2378, 1964.
86. OMURA, T. i SATO, R.: The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. II. Solubilization, purification, and properties. *J. biol. Chem.*, 239: 2379-2385, 1964.
87. OMURA, T., SATO, R., COOPER, D. Y. ROSENTHAL, O. i ESTABROOK, R. W.: Function of cytochrome P-450 of microsomes. *Fed. Proc.*, 24: 1181-1189, 1965.
88. ORRENIUS, S. i ERNSTER, L.: Phenobarbital-induced synthesis of the oxidative demethylating enzymes of rat liver microsomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 16: 60-65, 1964.
89. PANTUCK, E. J., HSIAO, K.-C., MAGGIO, A., NAKAMURA, K. KUNTZMAN, R. i CONNEY, A. H.: Effect of cigarette smoking on phenacetin metabolism. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 15: 9-17, 1973.
90. POSNER, H. S., MITOMA, C., ROTHBERG, S. i UDENFRIEND, S.: Enzymic hydroxylation of aromatic compounds. III. Studies on the mechanism of microsomal hydroxylation. *Arch. Biochem. Biophys.*, 94: 280-290, 1961.
91. POSNER, H. S., MITOMA, C. i UDENFRIEND, S.: Enzymic hydroxylation of aromatic compounds. II. Further studies on the properties of microsomal hydroxylating system. *Arch. Biochem. Biophys.*, 94: 269-279, 1961.
92. RADOMSKI, J. L.: The absorption, fate and excretion of citrus Red No. 2 (2,5-dimethoxyphenyl-azo-2-naphthol) and external D and C No. 14 (1-xylylazo-2-naphthol). *J. Pharmac. exp. Ther.*, 134: 100-109, 1961.

95. REMMER, H. i MERKER, H. J.: Effect of drugs on the formation of smooth
J. clin. Pharmacol., 5: 116-136, 1972.
94. REMMER, H.: The induction of the microsomal oxidase (Cyt. P-450). *Proc. Eur. Soc. Study of Drug Toxicity*, 13: 10-20, 1972.
95. REMMER, H., MERKER, H. J.: Effect of drugs on the formation of smooth endoplasmic reticulum and drug metabolizing enzymes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 123: 79-97, 1965.
96. REMMER, H., SCHENKMAN, J., ESTABROOK, R. W., SASAME, H., GILLETTE, J. R., NARASHIMHULU, S., COOPER, D. Y. i ROSENTHAL, O.: Drug interaction with hepatic microsomal cytochrome. *Mol. Pharmacol.*, 2: 187-190, 1966.
97. REMMER, H., SCHENKMAN, J. B. i GREIM, H.: Spectral investigations on cytochrome P-450. *A Microsomes and Drug Oxidations*. Dirigit per J. R. Gillette, A. H. Conney, G. J. Cosmides, R. W. Estabrook, J. R. Fouts i G. J. Mannering (pp. 371-386). Academic Press, New York, 1969.
98. SASAME, H. A. i GILLETTE, J. R.: Studies on the relationship between the effects of various substances on absorption spectrum of cytochrome P-450 and the reduction of p-nitrobenzoate by mouse liver microsomes. *Mol. Pharmacol.*, 5: 123-130, 1969.
99. SATO, R., OMURA, T. i NISHIBAYASHI, H.: Carbon monoxide-binding hemoprotein and NADPH-specific flavoprotein in liver microsomes and their roles in microsomal electron transfer. *A Oxidases and Related Redox Systems*. Dirigit per T. E. King, H. S. Mason, y M. Morrison (pp. 861-878). John Wiley & Sons, Inc., New York, 1965.
100. SATO, R., NISHIBAYASHI, H. i ITO, A.: Characterization of two hemoproteins of liver microsomes. *A Microsomes and Drug Oxidations*. Dirigit per J. R. Gillette, A. H. Conney, G. J. Cosmides, R. W. Estabrook, J. R. Fouts i G. J. Mannering (pp. 111-132). Academic Press, New York, 1969.
101. SCHENKMAN, J. B., FREY, I., REMMER, H. i ESTABROOK, R. W.: Sex differences in drug metabolism by rat liver microsomes. *Mol. Pharmacol.*, 3: 516-525, 1967.
102. SCHENKMAN, J. B.; REMMER, H. i ESTABROOK, R. W.: Spectral studies of drug interaction with hepatic microsomal cytochrome. *Mol. Pharmacol.*, 3: 113-123, 1967.
103. SHOEMAN, D. W., CHAPLIN, M. D. i MANNERING, G. J.: Induction of drug metabolism. III. Further evidence for the formation of a new P-450 hemoprotein after treatment of rats with 3-methylcholanthrene. *Mol. Pharmacol.*, 5: 412-419, 1969.
104. SHOEMAN, D. W., WHITE, J. G. i MANNERING, G. J.: Cytochrome P-420: tubular aggregates from hepatic microsomes. *Science*, 165: 1371-1372, 1969.
105. SILVERMAN, D. A. i TALALAY, P.: Studies on the enzymic hydroxylation of 3,4-benzpyrene. *Mol. Pharmacol.*, 3: 90-101, 1967.
106. SLADEK, N. E. i MANNERING, G. J.: Induction of drug metabolism. I. Differences in the mechanisms by which polycyclic hydrocarbons and phenobarbital produce their inductive effects on microsomal N-demethylating systems. *Mol. Pharmacol.*, 5: 174-185, 1969.
107. STEVENSON, I. H., O'MALLEY, K., TURNBULL, M. J. i BALLINGER, B. R.: The effect of chlirpromazine on drug metabolism. *J. Pharm. Pharmacol.*, 24: 577-578, 1972.
108. TAKESUE, Y., OMURA, T. i SATO, R.: Resultats no publicats citats per SATO i cols., 1965.
109. TAYLOR, S. A., RAWLINS, M. D. i SMITH, S. E.: Spironolactone — a weak enzyme inducer in man. *J. Pharm. Pharmacol.*, 24: 578-579, 1972.
110. TEMPLE, D. J.: Binding of nitrogen containing compounds to microsomal cytochromes. *Xenobiotica* (Preprints of the Proceedings of the Symposium on the Biological Oxidation of Nitrogen in Organic Molecules). (Pp. 195-208.) Taylor & Francis Ltd., London, 1972.
111. ULRICH, V.: On the hydroxylation of cyclohexane in rat liver microsomes. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 350: 357-365, 1969.

112. VESELL, E. S., Induction of drug-metabolizing enzymes in liver microsomes of mice and rats by softwood bedding. *Science*, 157: 1057-1058, 1967.
113. WATTENBERG, L. W., PAGE, M. A. i LEONG, J. L.: Induction of increased benzopyrene hydroxylase activity by flavones and related compounds. *Cancer Res.*, 28: 934-937, 1968.
114. WELCH, R. M., HARRISON, Y., GOMMI, B. W., POPPERS, P. J., FINSTER, M. i CONNEY, A. H.: Stimulatory effect of cigarette smoking on the hydroxylation of 3,4-benzopyrene and the N-demethylation of 3-methyl-4-monomethylaminoazobenzene by enzymes in human placenta. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 10: 100-109, 1969.
115. WILLIAMS, R. T.: *Detoxication Mechanisms. The Metabolism of Drugs and Allied Organic Compounds.* John Wiley & Sons, New York, 1947.
116. YOHRO, T. i HORIE, S.: Subcellular distribution of P-450 in bovine *corpus luteum*. *J. Biochem.*, 61: 515-517, 1967.