



**Állatorvostudományi Egyetem**  
**Élettani és Biokémiai Tanszék**  
**Biokémiai Osztály**

**A máj, a bendő- és a vékonybél-nyálkahártya  
xenobiotikum-biotranszformációs folyamatainak  
összehasonlító vizsgálata szarvasmarhában**

**Készítette:** Balogh Dániel

**Témavezetők:** Oláhné Dr. Orbán Kata  
tanszéki állatorvos

Dr. Mátis Gábor  
egyetemi docens

Budapest, 2019

# Tartalomjegyzék

|   |    |
|---|----|
| Rövidítések jegyzéke .....  | 3  |
| Bevezetés.....  | 4  |
| Irodalmi áttekintés .....   | 5  |
| A szervezet méregtelenítő folyamatai .....  | 5  |
| A CYP enzimrendszer működése .....  | 5  |
| CYP enzimek vizsgálata kérődzőkben.....   | 7  |
| Humán és állati eredetű CYP enzimek összehasonlítása .....                            | 9  |
| Célkitűzés .....  | 13 |
| Anyag és módszer .....  | 14 |
| Kísérleti állatok.....  | 14 |
| Mintavétel.....   | 15 |
| A minták laboratóriumi feldolgozása.....  | 15 |
| A minták homogenizálása .....   | 15 |
| Az összfehérje-koncentráció meghatározása .....                                       | 16 |
| A hemoglobin-koncentráció meghatározása.....  | 17 |
| A CYP enzimek aktivitásának mérése .....  | 17 |
| Statisztika .....   | 18 |
| Eredmények.....   | 20 |
| CYP1A2 és CYP2C9 aktivitásának vizsgálata szarvasmarha májban.....                    | 20 |
| CYP1A2 és CYP2C9 aktivitásának vizsgálata szarvasmarha bendő-nyálkahártyában ..       | 20 |
| CYP1A2 és CYP2C9 aktivitásának vizsgálata szarvasmarha duodenum-nyálkahártyában ..... | 21 |
| Megbeszélés .....   | 22 |
| Összefoglalás .....   | 25 |
| Summary .....   | 27 |
| Irodalomjegyzék .....   | 28 |
| Köszönetnyilvánítás .....   | 35 |

## Rövidítések jegyzéke

AhR= aryl hydrocarbon receptor, aromás szénhidrogén receptor

ANOVA= analysis of variance, varianciaanalízis

BCA= bichoninic acid, bicinkoninsav

BSA= Bovine serum albumin

CCM = corn-cob mix

CGF = corn gluten feed

CYP= citokróm P450

EROD= etoxirezorufin-O-dealkiláz

FAD= flavin-adenin-dinukleotid

FMO= flavin-containing monooxygenase, flavin-monooxygenáz

mRNS= messenger ribonukleinsav

NADP<sup>+</sup>= nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát

rpm= revolution per minute, percenkénti fordulatszám

SEM= standard error of mean, standard hiba

TMR= total mixed ration

U= unit, egység

2,3,7,8- TCDD= 2,3,7,8-tetraklorodibenzo-p-dioxin

## Bevezetés

A szájon át felvett xenobiotikumok nagy része (azaz gyógyszerek, peszticidek, karcinogének, élelmiszer-szennyező anyagok, beleértve a növényi vagy az állati eredetű toxinokat is) enzimreakciókon megy keresztül, melyeknek egyik központi jelentőséggel bíró eleme a citokróm P450 (CYP) enzimrendszer. Számos állatfaj esetében, nem csak a májban, hanem a vékonybél nyálkahártyájában is igazolták a CYP enzimek jelenlétét. Kérődzőkben eddig bendőfalból mRNS szinten mutattak ki egyes CYP alcsaládokat, míg más kérődző eredetű extrahepatikus szövetek CYP aktivitásával kapcsolatban szakirodalom egyáltalán nem áll rendelkezésünkre (Zhao et al., 2017). A kérődzők bendőjében a szájon át felvett toxikus anyagokból a mikrobiális fermentáció révén számos metabolit képződhet, amelyek anyagcseréjében feltételezhetően fontos szerepe lehet a bendőfalban fellelhető CYP enzimeknek, mint elsődleges metabolikus barrieréknek. Ebből következik, hogy a bendőfalban, valamint a májban és a vékonybélben zajló xenobiotikum-biotranszformáció összehasonlító elemzése is kiemelten kulcsfontosságú az esetleges takarmány-gyógyszer vagy gyógyszer-gyógyszer interakciók feltárásához, így a maradékanyagoktól mentes, biztonságos élelmiszer előállításához, azonban e témakörben igen kevés irodalmi adat áll rendelkezésre (**1. ábra**).



1. ábra: A kérődzők extrahepatikus méregtelenítő folyamatairól kevés irodalmi adat áll rendelkezésünkre. (forrás:

<http://hubertus.hu/hu>)

## Irodalmi áttekintés

### *A szervezet méregtelenítő folyamatai*

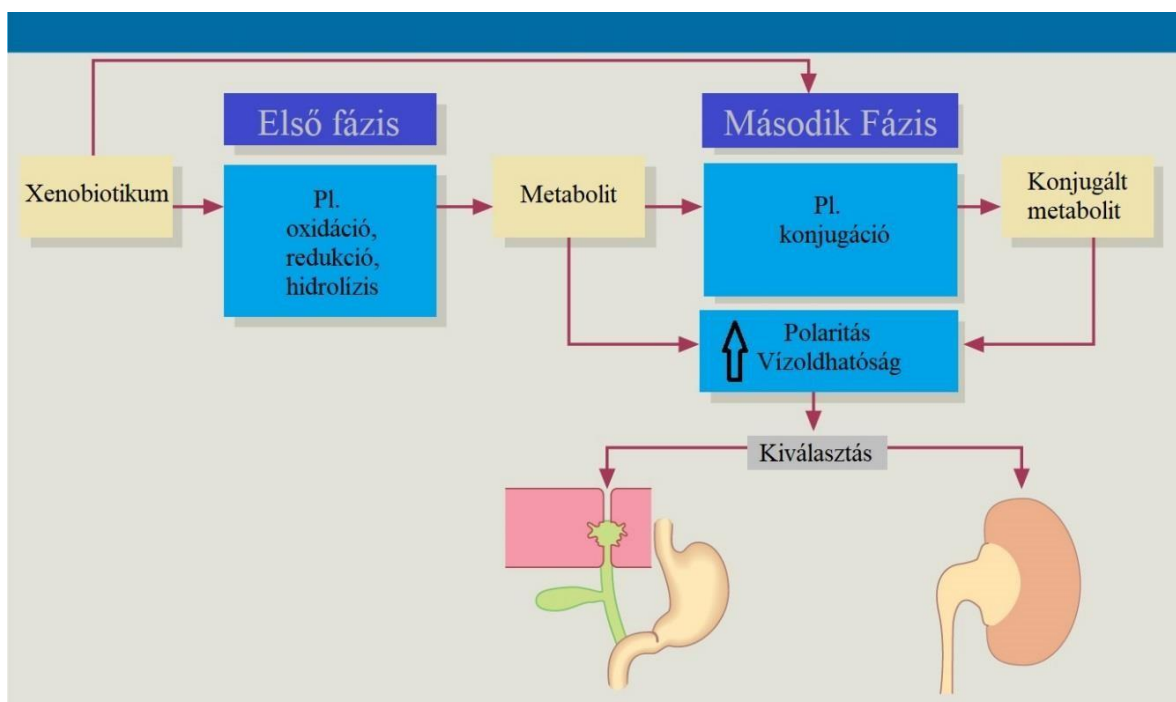
Xenobiotikumoknak nevezzük az olyan testidegen anyagokat, amelyek nem szolgálnak energiaforrásként vagy a szervezet számára értékes molekulák prekursoraiként. Az állatok szervezete főként a különféle környezetszennyező vegyszerekből, növényvédőszerből és gyógyszerekből származó xenobiotikumok felvételének van kitéve, azonban e csoportba sorolhatjuk a növények és a gombák másodlagos anyagcseretermékeit is. A szervezet ezek semlegesítésére kifinomult méregtelenítő enzimrendszerekkel rendelkezik, melyek aktivitásának köszönhetően a felvett xenobiotikumokat könnyebben eliminálható hidrofíl vegyületekké alakítja át. A xenobiotikumok biotranszformációja a testidegen, főleg lipofíl anyagok átalakításának folyamatát foglalja magában. Ezek a vegyületek könnyen felszívódnak a gyomor-bélrendszerből, a sokrétű enzimatis reakciók során hidrofíl anyagokká alakulnak, így könnyen kiválasztódnak a vizelettel vagy az epével (Kulcsár et al., 2016).

A CYP kétségkívül a xenobiotikumok biotranszformációjának egyik legjelentősebb enzimrendszere azáltal, hogy a szerkezetileg változatos testidegen anyagok átalakításának első fázisát katalizálják, és az így keletkezett metabolit konjugáció után ürülni tud a szervezetből (Ioannides, 1996). Bár a CYP működésének eredetileg deaktiváló hatást tulajdonítottak, amely lehetővé teszi a lipofíl vegyületek kiválasztását, ma már nyilvánvaló, hogy képes akár az ártalmatlan anyagokat reaktív vegyületekké is alakítani (Sivapathasundaram et al, 2001). Számos kutatás bizonyította, hogy ezen enzimek indukálása és gátlása endogén és exogén faktorok által egyaránt lehetséges. (Fink-Gremmels and Van Miert, 1996; Kliever et al., 1999).

### *A CYP enzimrendszer működése*

A biotranszformáció két fő lépésből álló folyamatának első fázisában nagyrészt oxidáció, ritkábban redukció vagy hidrolízis játszódik le. A többségében enzimatis úton zajló első fázis legfontosabb enzimjei a monooxygenázok (ide tartoznak a CYP enzimek is), azonban kisebb mértékben az epoxid-hidroláz, észteráz, alkohol- és aldehid-dehidrogenáz, valamint flavin-monooxidáz enzimek is szerepet játszanak e reakciókban (Kulcsár et al., 2016; Parkinson and Ogilvie, 2008). A CYP enzimek katalizálják a xenobiotikumok hidroxilezését, epoxidációját, valamint N-, S- és O-demetilezését, lehetővé téve a biotranszformáció második fázisának megvalósulását (Schneider and Clark, 2013). Az előbbiekből a leggyakoribb reakciótípus a hidroxilezés, mely során a CYP enzimek

molekuláris oxigént építenek be a lipofil molekulákba. Az ehhez szükséges elektront a NADPH+H<sup>+</sup> koenzim szolgáltatja, a redukción a FAD- és FMN-tartalmú NADPH+H<sup>+</sup> citokróm P450-reduktáz katalizálja (Kulcsár et al., 2016)



2. ábra: A xenobiotikum-biotranszformáció sematikus ábrázolása. A CYP enzimek az első fázisban töltenek be jelentős szerepet. Aktivitásuknak köszönhetően az apoláros xenobiotikum metabolit képes lesz konjugálódni, majd hidrofil anyagként az epével vagy a vizelettel ürülni.

Forrás: <https://link.springer.com>

A biotranszformáció második fő fázisában az első fázisban keletkezett intermediér anyagok konjugálódnak, ezáltal vízoldható formában képesek ürülni a szervezetből (2. ábra). A konjugáció glükuronidáció, metiláció, acetiláció, aminosavas és glutationos konjugáció, és foszforiláció révén is bekövetkezhet (Parkinson and Ogilvie, 2008).

A CYP-ek hem-tartalmú monooxygenázok, amelyek részt vesznek a xenobiotikumok biotranszformációjának első fázisában. Ezek az enzimek a májban, a bélben, a vesében, az agyban, a mellékvesékben és más szervekben is expresszálódnak, sejtszinten az endoplazmatikus retikulum membránjához kötötten (ún. mikroszóma frakcióban) található meg (Trepanier, 2006; Kurucz et al., 2018).

Az CYP szupercsalád tagjainak elnevezése túlnyomórészt az alábbi módon történik: a CYP enzimeket kódoló géneket és magukat az enzimeket CYP mozaikszóval jelöljük, amelyet a géncsaládot jelző szám követ, a szubsztrát-specifititás alapján elkülönített alcsaládot pedig nagybetűvel jelöljük, majd a név végén tüntetjük fel az egyedi gén számát (Nelson et. al., 1993; Kulcsár et al., 2016). Jelenleg 14 családot különböztetünk meg, de

ezekből a testidegen anyagok CYP enzimek által mediált metabolizmusának kb. 95%-áért általánosan csupán öt CYP enzim (CYP1A2, 2C9, 2C19, 2D6 és 3A4) felelős, a fennmaradó izoenzimek vesznek részt az endogén szteroidszintézisben és a zsírsav-oxidációban (Williams et al., 2004).

A szájon át felvett xenobiotikumok biotranszformációja már a bélcsatorna proximális szakaszaiban, például a duodenumban megkezdődik. A májban, mint a legjelentősebb méregtelenítő szervben, és a duodenum kefeszegély sejtjeiben megtalálható CYP enzimek együttesen végzik a méregtelenítő folyamatok döntő hányadát (Kurucz et al., 2018).

### ***CYP enzimek vizsgálata kérődzőkben***

Az emlősök májában található CYP enzimek, amelyek részt vesznek a xenobiotikumok biotranszformációjában, a CYP1, CYP2, CYP3, és CYP4 családok közé tartoznak (Lewis, 2001). Ahogyan azt több tanulmány is kiemelte, a CYP enzimaktivitások fajspecifikus különbségei kapcsolatban állhatnak a különböző állatfajok mérgező anyagok és karcinogének iránti eltérő érzékenységgel (Boobis et al. 1990; Lewis et al. 1998). Az egyes CYP enzimek katalitikus szelektivitásának összehasonlítását már számos rágcsáló és majomfaj, valamint kutya és ember esetében is publikálták, valamint a sertés májában található főbb CYP enzimek is jellemzésre kerültek (Weaver et al. 1994; Guengerich 1997; Shimada et al. 1997 Anzenbacher et al., 1998).

A háziasított, élelmiszertermelő állatok CYP enzimjeinek expressziójáról kevés információ áll rendelkezésünkre. Abban a néhány tanulmányban, amelyben a háziállatok ezen enzimjeivel foglalkoztak, csak részben határozták meg az egyes állatfajok szöveteinek különböző CYP izoenzimekre vonatkozó összetételét, nem folytak szisztematikus kutatások az háziállatok CYP enzimrendszerének feltérképezésére. A háziállatok hepatikus CYP profiljának megismerése elősegítené a fajok közötti lehetséges méregtelenítő folyamatokban állatfajok között fellelhető különbségek megértését, és az így kapott adatok elősegíthetik egyes állatgyógyászati készítmények engedélyének több állatfajra történő kiterjesztését is. Továbbá, a CYP enzimek működésének vizsgálata segítheti a fogyasztóhoz eljutó ehető szövetekben és tejben segítené a gyógyszerek és más kontamináló maradékanyagok jelenlétével kapcsolatos kockázat becslését, amelynek hiánya jelenleg komoly aggodalomra adhat okot (Sivapathasundaram et al., 2001).

Ballent (2016) és munkatársai juhban és szarvasmarhában vizsgálták a monepantel antihelmintikum májban zajló biotranszformációjának folyamatát. A kísérletet Angus fajtával keresztezett Hereford tinókon és Merinói juhval keresztezett Corriedale kosokon

végezték. Kutatásuk során az anthelmintikum lebontásában szerepet játszó CYP és flavin-monooxygenáz (FMO) rendszer szerepének vizsgálatán túl, *in vitro* kísérlet keretében kitértek a monepantel és fő, aktív metabolitjának (monepantel-szulfon) bendőfolyadékbeli stabilitására, továbbá a bendőfolyadék és a bendőtartalom szilárd fázisa közötti relatív eloszlásának tanulmányozására is. A kísérlet e része a monepantel-szulfon önálló hatóanyagként való használatának lehetőségére irányult. Eredményeik szerint juh és szarvasmarha esetében is a szulfon-monepantel volt a legnagyobb mennyiségben képződött metabolit, miután inkubálták a mikroszóma frakcióba mért monepantelt. Fajok közötti különbségeket észleltek a monepantel S-oxidációjában: magasabb monepantel-szulfon termelési arányt figyeltek meg a juh májmikroszómaiban a szarvasmarhákhoz képest. A FMO és CYP enzimrendszerekről egyaránt bebizonyosodott, hogy részt vesznek a monepantel-szulfon termelődésében juhok májszövetében. Szarvasmarhában a monepantel lebontásában nem játszik központi szerepet az FMO enzimrendszer, szinte teljes mértékében a CYP enzimek alakítják át monepantel-szulfonná. A monepantel és fő metabolitja is metabolikusan stabilak voltak juh és szarvasmarha bendőfolyadékban vizsgálva, továbbá mindkét faj bendőtartalmának szilárd fázisában is fellelhetők voltak (Ballent et al., 2016).

Olasz kutatók vizsgálták húshasznú szarvasmarhák 8 és 18-24 hónapos egyedeinek duodenum nyálkahártyájában a xenobiotikumok biotranszformációjának első és második fázisait. A CYP2C és CYP3A4 enzimek, valamint a konjugációs lépésekben részt vevő enzimek aktivitása is némileg magasabb volt az idősebb korosztályban (Virkel et al., 2009). Kawalek és el Said kísérlete, mely a májban zajló a xenobiotikum-biotranszformáció első és második fázisában szerepet játszó enzimek aktivitásának vizsgálatára irányult, hasonló eredményekkel zárult. Az amerikai kutatók tejpótló tápszeren felnevelt 35 napos és hagyományos étrenden tartott 85 napos borjak enzimaktivitását hasonlították össze. Eredményeik szerint a fiatalabb, tejpótló tápszeren felnevelt, még nem kérődző borjak szignifikánsan alacsonyabb xenobiotikum metabolizációs képességgel rendelkeztek (Kawalek and el Said 1994). Mindezek alapján valószínűsíthető, hogy a takarmány jellege és az életkor is képes az enterális biotranszformációs rendszert jelentősen befolyásolni. Továbbá, az állatgyógyászati készítmények, a peszticidek, a környezetszennyező anyagok, a mikotoxinok, a növényi metabolitok vagy az egyes növényi összetevők mind képesek a bél méregtelenítő folyamatokért felelős enzimrendszerét (Sergent et al., 2008; Le Marchand et al., 1997).



### ***Humán és állati eredetű CYP enzimek összehasonlítása***

A xenobiotikum-biotranszformáció minél teljesebb körű feltérképezésének fontossága az élelmiszerlánc-biztonság mellett, a humán gyógyászat számára is kiemelkedő. Az újonnan felfedezett vegyületeket és hatóanyagokat preklinikai fázisban állati modelleken tesztelik, annak érdekében, hogy az új gyógyszerjelöltek metabolikus tulajdonságait emberekre is kivetítsék. Kísérleti állatként rágcsálók mellett, sertést, kutyát és különböző majomfajokat alkalmaznak (**3. ábra**).

A CYP1A alcsalád tagjai (CYP1A1 és CYP1A2) a fent említett fajok között kifejezett azonosságot mutatnak, sőt mindegyik faj esetében 80% feletti az emberi analógia (Mugford and Caddaris, 1998). Mindkét enzim tanulmányozása széleskörűen zajlik a policiklikus szénhidrogének és az aril-aminok környezeti karcinogének metabolizmusában betöltött szerepük miatt (Dipple 1983; Sugimura and Sato, 1983). A CYP1A1 minden állatfaj májában nagyon kis mértékben fejeződik ki, azonban extrahepatikus szövetekben expressziója fajonként változó. Általánosságban kijelenthető, hogy a CYP1A a vizsgált állatfajokban indukálható, de egyes induktorok – mint például az omeprazol – hatására a génexpresszió szabályozásában különböző fajok között jelentős eltérések észlelhetők (Martignoni et al., 2006). A CYP1A2 emberben részt vesz számos endogén szubsztrát, például a melatonin és az ösztrogének metabolizációjában, a prokarcinogének, mint a heterociklikus aminok, aril-aminok és az aflatoxin B1 aktivációjában. Számos klinikailag használt gyógyszert, beleértve a propanololt, a teofillint, a klozapint és az olanzapint is a CYP1A2 metabolizálja. A számos étel, ital és gyógyszer összetevő koffein metabolizmusát szinte teljes egészében a CYP1A2 végzi (Djordjevic et al., 2007).

A CYP1B1 többek között a szív, az agy, a placenta, a tüdő, a máj, a vese és a prosztata fiziológiás szöveteiben expresszálódik, de aktivitása sokkal nagyobb daganatsejtekben, mint az azt körülvevő normál szövetekben (Sutter et al., 1994; McFayden et al., 1999; Murray et al., 1997). Ennek fényében a CYP1B1 indukció fontos tényező a hormon-mediált daganatos betegségek kockázatainak meghatározásában. Ezen felül a CYP1B1 részt vesz néhány olyan klinikailag releváns daganatellenes szer metabolizmusában, amelyet gyógykezelésként használnak a hormonmediált daganatos megbetegedések ellen. A CYP1B1 emberben működése során ösztrogének metabolizmusát is katalizálja, ennek következtében aktív 4-hidroxieltett derivátumok keletkezhetnek, melyek mellrákot okozhatnak (Martignoni et al., 2007). Patkányban a CYP1B1 enzimek a májban és tüdőben mRNS szinten biztosan expresszálódnak (Harrigan et al., 2006). Egérben a CYP1B1 aktivitása számos szövetben

kimutatható - beleértve a herét, a vesét, a vázizmokat, a tüdőt, a lépet, az agyat és a szívet-, de a májban nem (Kaminsky and Zhang, 2003; Choudhary et al., 2003).

A CYP2A emberben és rágcsálóban hepatikus és extrahepatikus szövetekben is expresszálódik. Ebbe az alcsaládba tartozó enzimek fajoként eltérő szubsztrát-specifitással rendelkeznek, például rágcsálóknak részt vesznek a szteroid-hidroxilációban, míg emberben ez nem valósul meg (Guengerich, 1997; Honkakoski and Negishi, 1997). Kutya esetében katalizálja a kumarin 7-hidroxilációját, emberi szervezetben hatására az aflatoxin B1 karcinogén metabolitokká alakul (He et al., 2006).

A CYP2B-t valamennyi faj májában már kimutatták. Nem volt megtalálható azonban az emberi vékonybélben, viszont patkány és egér bélcsatornájában nagymértékben expresszálódott (Czerwinski et al., 1994). Emberben a forgalmazott gyógyszerek negyedének metabolizációjában részt vesz, beleértve a ketamint, a ciklofoszfamidot és a propofolt is (Sridar et al., 2002; Court et al., 2001). A patkányok duodenum nyálkahártyájának CYP2B1 aktivitása hasonlóan magas, mint a májukban. A CYP2B izoformái megtalálhatók a különböző fajok gyógyszer felszívódással, eloszlással, metabolizmussal és eliminációval kapcsolatos tanulmányaiban. Ebbe az alcsaládba tartozó enzimek eltérő szubsztrát-specifitásokkal rendelkeznek. Érdekes, hogy a CYP2B nemi dimorfizmusát leírták emberben, patkányban és egérben, de majom és kutya esetében ez nem került megállapításra (Martignoni, 2006).

A CYP2C a legnagyobb és legbonyolultabb alcsalád az ember, a patkány és az egér esetében is. A CYP2C aktivitása rágcsáló és nem rágcsáló fajok májában megbízhatóan kimutatható. Expressziója az extrahepatikus szövetekben viszont jelentősen függ az adott izoenzim típusától és az állat ivarától felnőtt patkányok esetében. Az emberi és állati izoenzim szubsztrát-specifitása nagyban különbözik (Martignoni, 2006). Emberben a CYP2C8 főleg a májban expresszálódik, de mRNS szinten kimutatták a vesében, a mellékvesében, az agyban, a méhben, a tejmirigyekben, a petefészekben és a duodenumban is (Klose et al., 1999). A CYP2C8 részt vesz a retinol és a retinsav, az arachidonsav, benzo(a)pirén, valamint a daganatellenes gyógyszerként alkalmazott paklitaxel metabolizmusában is (Rahman et al., 1994). A CYP2C9 mRNS szinten kimutatható a májban, a vesében, a herében, a mellékvesében, a prosztatában, a petefészekben és a duodenumban (Klose et al., 1999). Ez az izoenzim számos klinikailag fontos gyógyszert metabolizál, ideértve a diabétesz kezelésére használt tolbutamidot, a görcsoldó fentoint, az antikonvulzáns varfarin S-enantiomerét és számos gyulladáscsökkentő szert, például az ibuprofent, a diklofenakot, a piroxicamot, a tenoxicamot, a mefenamimsavat, a

vérnyomáscsökkentő losartant, az antidiabetikus glipizidet, és a diuretikumként használt torazemidet is (Goldstein and De Morais, 1994; McCrea et al., 1999; Kidd et al., 1999). A CYP2C emberben indukálható rifampicinnel, dexametazonnal és fenobarbitállal is, de ezek pontos mechanizmusát eddig nem sikerült tisztázni (Martignoni, 2006).

A legtöbb állatfajban xenobiotikum metabolizmust tekintve a CYP3A alcsalád rendelkezik a legnagyobb jelentőséggel. Különböző fajokban más-más CYP3A izoenzim expresszálódik, melyek szubsztrát-specifikussága is különböző, így kérdésessé teszi a xenobiotikumok metabolizmusának az állatokról emberre történő extrapolációját. A CYP3A rágcsáló és nem rágcsáló kísérleti állatokban is indukálható rifampicinnel, pregnenolonnal és dexametazonnal. E hatások fajfüggő génexpresszió szabályozását eredményezik (Martignoni, 2006).

| Család | Alcsalád | Ember                | Egér   | Patkány                                    | Kutya      | Majom   |
|--------|----------|----------------------|--|--|------------|---|
| CYP1   | A        | 1A1, 1A2             | 1A1, 1A2   | 1A1, 1A2                                   | 1A1, 1A2   | 1A1, 1A2  |
|        | B        | 1B1                  | 1B1  | 1B1  | 1B1        | 1B1   |
| CYP2   | A        | 2A6, 2A7, 2A13       | 2A4, 2A5, 2A12, 2A22                                 | 2A1, 2A2, 2A3                              | 2A13, 2A25 | 2A23, 2A24  |
|        | B        | 2B6, 2B7             | 2B9, 2B10  | 2B1, 2B2, 2B3                              | 2B11       | 2B17  |
|        | C        | 2C8, 2C9, 2C18, 2C19 | 2C29, 2C37, 2C38, 2C39, 2C40, 2C44, 2C50, 2C54, 2C55 | 2C6, 2C7*, 2C11*, 2C12*, 2C13*, 2C22, 2C23 | 2C21, 2C41 | 2C20, 2C43  |
|        | D        | 2D6, 2D7, 2D8        | 2D9, 2D10, 2D11, 2D12, 2D13, 2D22, 2D26, 2D34, 2D40  | 2D1, 2D2, 2D3, 2D4, 2D5, 2D18              | 2D15       | 2D17 <sup>†</sup> , 2D19 <sup>†</sup> , 2D29 <sup>†</sup> , 2D30 <sup>†</sup> |
|        | E        | 2E1                  | 2E1  | 2E1  | 2E1        | 2E1   |
| CYP3   | A        | 3A4, 3A5, 3A7, 3A43  | 3A11, 3A13, 3A16, 3A25, 3A41, 3A44                   | 3A1/3A23, 3A2*, 3A9*, 3A18*, 3A62          | 3A12, 3A26 | 3A8   |

\*Nemi különbség

<sup>†</sup> Fajta specifikus

3. ábra: A fő xenobiotikum metabolizáló CYP enzimeszaládok emberben, patkányban, egérben, kutyában és majomfélékben.

Forrás: Martignoni et al., 2014

Az elmúlt 25 évben számos részletes kísérlet irányult a legfontosabb xenobiotikum metabolizáló enzimek, azaz a CYP enzimszisztéma jellemzésére (Mugford and Kedderis, 1998). Számos tanulmány felvázolta e szupercsalád molekuláris biológiáját, sor került az enzimek alcsaládba sorolására, amelyek mindegyike (különösen az 1-4. családba tartozó tagok) más-más xenobiotikumokat képes kötni, ráadásul a kutatók azonosították az egyes izoenzimek szubsztrát-specifitásának sajátosságait is (Mugford and Kedderis, 1998; Sivapathasundaram et al., 2003). A közelmúltban néhány olyan tanulmány került publikálásra, melyekben haszonállatok máját használták modellként a szubsztrátok metabolizmusának specifikus enzimatiszisztémájának vizsgálatára (Dacasto et al., 2005; Machala et al., 1996; Nebbia et al., 2003; Sivapathasundaram et al., 2001; Sztotáková et al., 2004). Ismert, hogy számos nem farmakogenetikus tényező, mint az életkor, a nem, a faj, az

állat egészségi állapota vagy a környezeti szennyező anyagoknak való kitettség, befolyásolhatja a máj CYP expresszióját emberben, valamint laboratóriumi és háziállatok esetében is (Guengerich, 2002; Nebbia et al., 2001).

Sajnálatos módon a laboratóriumi állatfajok gyakran nem szolgálnak optimális modellként a kedvtelésből tartott és gazdasági haszonállatok számára, mivel állatorvosi szempontból releváns különbségek is lehetnek a xenobiotikumok biotranszformációjában résztvevő enzimek aktivitásában, így az extrapoláció nem mindig lehetséges (Nebbia et al., 2000). Megoldást a célállatfajokon végzett *in vivo* kísérletek jelenthetik, ám az állatkísérleteket mind etikai, mind gazdasági okokból korlátozni kell. *In vitro* rendszerek kifejlesztése és jóváhagyása, mint például sejtszuspenziók, precíziósan vágott szövetszeletek, primer sejttenyészetek vagy a transzgenikus sejtvonalak használata, valószínűleg ígéretes megközelítést kínálnának a vizsgálatokhoz háziállatok esetében is (Coldham et al., 1998; Sauer et al., 1999; Kuilman et al., 2000; Horbach et al., 1997).

A humán egészségügyben elérkezett az idő, amikor a CYP enzimrendszer jelentősége túlível az akadémiai laboratóriumokon és nemcsak a klinikai farmakológusok, hanem az egészségügyi szakemberek és a gyógyszergyártással foglalkozó piaci szereplők is előtérbe helyezik vizsgálatukat (Greener, 2000). A következő években a CYP enzimrendszer széleskörű genetikai szűrése várható, így segítve azon betegek azonosítását, akik gyógyszertoxicitást vagy nemkívánatos gyógyszer-interakciókat mutathatnak. Ez a szűrés lehetővé teheti számunkra a terápiás hatékonyság optimalizálását (Wolf and Smith, 1999), ami a humán egészségügy mellett az állatgyógyászatban is jó irány lehet.

## Célkitűzés

A xenobiotikumok biotranszformációjában kulcsszerepű citokróm P450 (CYP) enzimek működéséről kérődzőkben eddig viszonylag kevés irodalmi adat állt rendelkezésünkre, különös tekintettel az extrahepatikus szövetekben fellelhető izoenzimek aktivitásának vizsgálatára vonatkozóan. Bendőfalban korábban már mRNS szinten kimutattak CYP enzimeket, de aktivitásukat eddig még nem sikerült igazolni.

Munkánk során célul tűztük ki, hogy vizsgálatokat végzünk a szarvasmarha májában és bélcsatornájában található CYP enzimek aktivitására vonatkozóan, valamint, hogy összehasonlítjuk az egyes izoenzimek aktivitását a különböző általunk tanulmányozott szövetekben. A bendőfalban, valamint a májban és a vékonybélben zajló xenobiotikum-biotranszformáció összehasonlító elemzése – alaptudományi jelentősége mellett – kulcsfontosságú információkat hordozhat az esetleges takarmány-gyógyszer vagy gyógyszer-gyógyszer interakciók feltárásához, így a maradékanyagoktól mentes, biztonságos élelmiszer előállításához.

Jelen munkánk során két különböző CYP izoenzim, a CYP1A2 és CYP2C9, aktivitását kívántuk vizsgálni hústermelésre tartott szarvasmarhák májában, valamint bendő- és vékonybél-nyálkahártyájukban. E célból mintát vettünk vágóhídon levágott szarvasmarhák fent említett szöveteiből, majd a minták feldolgozását követően luminometriás módszerrel mértük a CYP1A2 és CYP2C9 enzimek aktivitását.

## Anyag és módszer

### *Kísérleti állatok*

A mintáink alapjául szolgáló Angus szarvasmarha 22 – ebből 16 üsző és 6 bika – egyede közül a legfiatalabb 14, míg a legidősebb 17 hónapos volt. A Hubertus Agráripári Bt. által tenyésztett állatok a feldolgozás után a cég saját prémium hústermékeiként, Terra Pannonia márkajelzéssel kerültek értékesítésre. Ezeket az állatokat levágásuk előtt intenzív tartástechnológiai és takarmányozási körülmények között tartják. A borjakat fél éves korban levásztják a legelőn tartott tehenekről és két ciklusban (starter és befejező TMR [total mixed ration]) megkezdődik az intenzív takarmányozásuk, mely a fejadagokat tekintve az 1. táblázatban leírtaknak megfelelően alakul.

| Csoport                      | Takarmányok           | Fejadag (kg) | Csoport                      | Takarmányok           | Fejadag (kg) |
|------------------------------|-----------------------|--------------|------------------------------|-----------------------|--------------|
| <b>Befejező<br/>hízóbika</b> | Fűszénázs             | 2,50         | <b>Befejező<br/>hízóüsző</b> | Fűszénázs             | 2,00         |
|                              | Rozs szenázs          | 8,50         |                              | Rozs szenázs          | 7,50         |
|                              | CCM <sup>1</sup>      | 4,00         |                              | CCM <sup>1</sup>      | 4,00         |
|                              | Árpa                  | 2,50         |                              | Árpa                  | 2,00         |
|                              | Répaszelet            | 3,00         |                              | Répaszelet            | 3,00         |
|                              | CORNGOLD <sup>2</sup> | 1,50         |                              | CORNGOLD <sup>2</sup> | 1,00         |
|                              | melasz                | 1,50         |                              | melasz                | 1,00         |
|                              | premix                | 0,20         |                              | premix                | 0,20         |
| <b>Starter<br/>hízóbika</b>  | Fűszénázs             | 3,00         | <b>Starter<br/>hízóüsző</b>  | Fűszénázs             | 2,00         |
|                              | Rozs szenázs          | 7,50         |                              | Rozs szenázs          | 8,50         |
|                              | CCM <sup>1</sup>      | 3,00         |                              | CCM <sup>1</sup>      | 2,50         |
|                              | Árpa                  | 2,00         |                              | Árpa                  | 2,00         |
|                              | Répaszelet            | 3,00         |                              | Répaszelet            | 3,00         |
|                              | CORNGOLD <sup>2</sup> | 1,80         |                              | CORNGOLD <sup>2</sup> | 1,00         |
|                              | melasz                | 1,00         |                              | melasz                | 1,00         |
|                              | premix                | 0,20         |                              | premix                | 0,20         |

1. táblázat: Az állatok fejadagjai. A starter fejadagokat a választást követő fél évben kapják, majd a hizlalás végső szakaszában a befejező TMR-t (total mixed ration-t) fogyasztják.

<sup>1</sup>CCM = corn-cob mix, kukoricaszem-csutka keverék; <sup>2</sup>CORNGOLD vagy CGF = corn gluten feed, keményítőipari melléktermék.

A fent említett takarmányozási paraméterek mellett a starter TMR-t fogyasztó hízóbikák átlagos napi súlygyarapodása 1,5 kg, míg a befejező hízóbikák esetében ez 0,81 kg volt. A starter keverékkel etetett üszők 1,2 kg-ot, a befejező fázisban 0,7 kg-ot gyarapodtak naponta.

## ***Mintavétel***

A kísérletünkhöz szükséges mintavétel a Hubertus Agráripari Bt. által tenyésztett Angus húshasznú szarvasmarhákból történt a Mikofami Kft. zalaszentiváni vágóhídján (**4. ábra**). A mintákat a duodenumból, a bendő *dorsalis sacculus*ából és a máj *lobus caudatus processus caudatus*ából vettük olló, tárgylemez és anatómiai csipesz segítségével. A duodenum- és bendőmintákat a bélfeldolgozó egységben gyűjtöttük. A bélfal felnyitása előtt a béltartalmat a kivágandó szakaszból nyomással eltávolítottuk, majd fiziológias sóoldatban történő mosás után egy tárgylemez segítségével lekapartuk a bélnyálkahártyát. Bendő esetében a felnyitást és a fiziológias sóoldatban történő mosást követően a bendőnyálkahártya kis darabjait vágtuk ki. A májmintát a konvektor (szállítópálya) által szállított szervből vettük. Minden mintát előre beszámozott Eppendorf csövekbe helyeztünk, majd szárazjégen tartottuk az Élettani és Biokémiai Tanszékre történő érkezésünkig. A mintákat feldolgozásig mélyfagyasztoóban,  $-80^{\circ}\text{C}$  hőmérsékleten tároltuk.



4. ábra: A mintákat a zalaszentiváni vágóhídon gyűjtöttük.

(Forrás: saját felvétel)

## ***A minták laboratóriumi feldolgozása***

### **A minták homogenizálása**

A kísérlethez felhasznált valamennyi vegyszert a Sigma-Aldrich-től (Darmstadt, Németország) szereztük be, kivéve, ahol a gyártó külön feltüntetésre került.

A  $-80^{\circ}\text{C}$ -on tárolt mintákat jégen felengedjük, ezután EDTA és szacharóz tartalmú, enyhén lúgos ( $\text{pH}=7,4$ ), glicerinnel és proteáz inhibitorral (Halt Proteas Inhibitor Cocktail, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) kiegészített 5 ml 50Mm koncentrációjú foszfátpufferben, Potter-Elvehjem-féle homogenizátor segítségével homogenizáltuk. A CYP enzimek hőérzékenysége miatt a homogenizálás, illetve a teljes feldolgozási folyamat során jégen dolgoztunk. A homogenizátumot 600 g-vel, 1 percig,  $4^{\circ}\text{C}$ -on centrifugáltuk. Az így keletkezett felülúszókból 1,9 ml-t Eppendorf csövekbe pipettáztunk, majd ezt szintén centrifugáltuk 9000 g erővel, 30 percig,  $4^{\circ}\text{C}$ -on. A felülúszót 1,5 ml-es Eppendorf csövekbe (10 db/minta, 100  $\mu\text{l}$ /Eppendorf cső) mértük szét. A fent leírt eljárást nevezzük többlépcsős differenciáló centrifugálásnak, így módon izoláltuk a posztmitokondriális felülúszót (ún. S9 frakciót).

### **Az összfehérje-koncentráció meghatározása**

Az enzimaktivitások mérésének standardizálása végett meghatároztuk a posztmitokondriális felülúszók összfehérje-koncentrációját BCA (bicinchoninic acid = bicinkoninsav) módszerrel.

A fehérjemérést a Pierce<sup>TM</sup> BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Waltham, USA) segítségével a gyártó utasításai szerint végeztük. A módszer első lépése a fehérjék és  $\text{Cu}^{2+}$  ionok közötti kölcsönhatás, melynek során a  $\text{Cu}^{2+}$  ionok redukálódnak. Az így keletkezett  $\text{Cu}^{+}$  ionok a reagensben található bicinkoninsavval lila színű komplexet képeznek, ezáltal az oldat abszorbanciája spektrofotométerrel mérhető lesz.

A mérés alapjául szolgáló öttagú standard sort BSA (bovine serum albumin) felhasználásával készítettük el. Ezután a reagens elkészítése következett. A kétkomponensű reagens egyike („A”) nátrium-karbonátból, nátrium-bikarbonátból, bicinkoninsavból, nátrium-tartarátból és nátrium-hidroxidból állt, míg a másik komponens („B”) 4%-os réz-szulfát oldatot tartalmazott. A felhasználásra kész „A” és „B” reagenseket 50:1 arányban elegyítettük. Ezt követően bemértük a standard sort és a mintákat a microplate-re (25  $\mu\text{l}$ /lyuk mennyiségben), majd a reagensből 200  $\mu\text{l}$ -t pipettáztunk a lyukakba, és a lemezt fél percig ráztuk. Ezután alufóliába csomagolva 30 percen keresztül inkubáltuk termosztátban,  $37^{\circ}\text{C}$  hőmérsékleten. Az abszorbancia értékek mérését Multiskan GO 3.2 leolvasó segítségével végeztük 562 nm hullámhosszon.



## **A hemoglobin-koncentráció meghatározása**

A májminták hemoglobintartalmának meghatározását ammóniareagens segítségével 96 lyukú lemezen végeztük. Az ammóniaoldat hatására keletkezett oxihemoglobin vörös színének abszorbanciája spektrofotométerrel mérhető. A méréshez lyukanként 20  $\mu$ l hemoglobinnal készített standard oldatot vagy hígított mintát mértünk a microplate-re. A reagens elkészítéséhez 2 ml 25%-os ammóniaoldatot desztillált vízzel 500 ml-re hígítottuk, majd ebből többcsatornás pipettával minden lyukhoz 180  $\mu$ l-t adtunk. Bemérés után a lemezt fél percig ráztuk, majd alufóliába csomagolva 5 percen keresztül inkubáltuk szobahőmérsékleten. A mérést Multiskan GO 3.2 leolvasó készülékkel 540 nm hullámhosszon végeztük.

## **A CYP enzimek aktivitásának mérése**

Kutatásunk során kettő, a xenobiotikum-biotranszformációban jelentős szereppel bíró CYP enzim aktivitását határoztuk meg. A CYP1A2 és a CYP2C9 enzimeket vizsgáltuk a májban, valamint bendő- és a duodenum nyálkahártyában egyaránt. Az enzimek mérése luminometriás CYP Glo kitek segítségével történt. A májminták esetében a hemoglobin-koncentrációval csökkentett összfehérje-koncentrációra, míg a bélminták esetében az összfehérje-koncentrációra standardizáltuk az eredményeket. A módszer elvi alapja, hogy luciferinhez kötött szubsztrátot adunk a mintákhoz, amelyből a szubsztrát lehasításával a CYP enzimek szabad luciferint hoznak létre, melyet luminométer segítségével tudunk detektálni.

Az mérésekhez felhasznált oldatok és pufferek összetétele:

- Foszfátpuffer törzsoldat:
  - 13,94 g  $K_2HPO_4$
  - 2,72 g  $KH_2PO_4$
  - desztillált vízzel kiegészíteni 90 ml-re
  - pH beállítása 7-re
- Foszfát puffer:
  - 4 ml foszfát puffer törzsoldat
  - 6 ml desztillált víz
- 2X NADPH Regeneration System
  - „A” oldat:
    - 55,06 mg  $NADP^+$  1 ml desztillált vízben

- 51,51 mg glükóz-6-foszfát 1 ml desztillált vízben
  - 18.85 mg MgCl<sub>2</sub> 1 ml desztillált vízben
  - a fent említett 3 oldatot összeöntöttük, kevertük
- „B” oldat:
    - 40 U/ml glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz 5 mM nátrium-citrát pufferben (pH=5,5)
    - 20 U glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz 0,5 ml nátrium-citrát pufferben

A CYP1A2 mérését P450-Glo™ Assay Kit-tel (Promega, Madison, USA), speciális fehér lemezekon végeztük. A mikroszómákat felolvasztást követően jégen tároltuk, majd 400 mM koncentrációjú foszfát-pufferben hígítottuk. A standardokhoz szükséges kontroll oldatot – melyek összefehérje-koncentrációja megegyezett az adott szövetmintához tartozó S9 frakció koncentrációjával – desztillált vízben oldott BSA biztosította. A CYP1A2 enzim méréséhez használt szubsztrát 15 µl Luciferin-1A2-t és 688 µl foszfát-puffert tartalmazott. A luciferin standard sor elkészítéséhez egy törzsoldatot készítettünk, ez 5 mg Beetle Luciferin kálium só és 7,85 ml desztillált vizet tartalmazott, majd ezen oldat felhasználásával készítettük el a különböző koncentrációjú standard oldatokat. Első lépésként a lemezre lyukanként 12,5 µl Luciferin standard mellé 6,25 µl kontrollt vagy 12,5 µl desztillált víz mellé 6,25 µl posztmitokondriális felülúszót mértünk be. Ezután 6,25 µl szubsztrátot adtunk minden lyukhoz és 10 percen keresztül szobahőmérsékleten inkubáltuk, majd 25 µl NADPH Regeneration System hozzáadását követően szintén 10 perces inkubáció következett. Ezután minden lyukhoz 50 µl, Reconstitution Buffer-rel és D-ciszteinnel kiegészített Reconstituted Luciferin Detection Reagent-et adtunk. Az inkubációs idő leteltével a luminometriás méréseket Victor X2 Multilabel Plate Reader készülékkel végeztük.

A CYP2C9 enzim mérését P450-Glo™ CYP2C9 Assay Kit szintén a gyártó utasításai szerint végeztük, a CYP1A2 enzim esetében ismertett protokollhoz hasonlóan.

### ***Statisztika***

A kapott mérési eredmények kiértékelését az R 2.14.0 statisztikai szoftver segítségével végeztük. Az átlagok közti különbségek elemzéséhez ANOVA tesztet, a

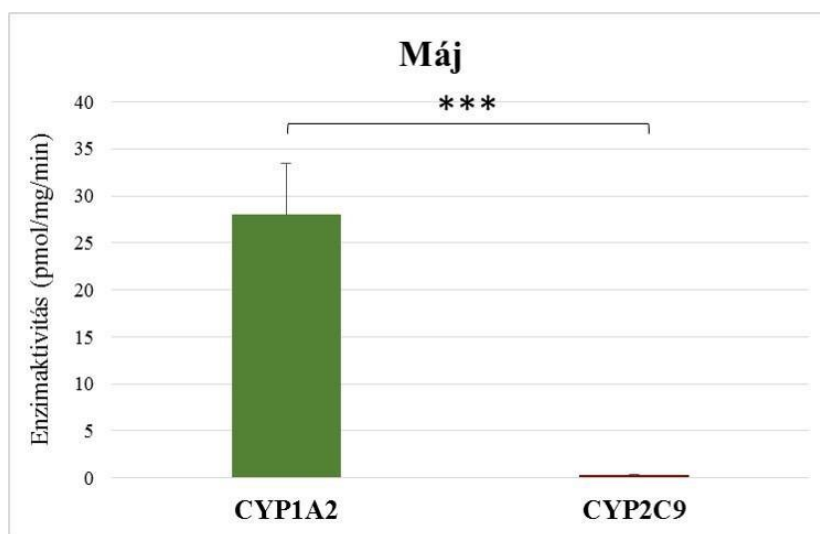
különböző csoportok összehasonlításához Dunett post-hoc tesztet használtunk. Szignifikáns különbséget állapítottunk meg, amennyiben  $P < 0,05$ . Minden eredményt átlag  $\pm$  standard hiba alakban fejeztünk ki.

## Eredmények

A CYP1A2 és CYP2C9 enzimek aktivitásának mérését luminometriás CYP Glo kitek segítségével végeztük. Kutatócsoportunk sikeresen adaptálta a mérési metodikát a kérődző eredetű minták CYP aktivitásának meghatározására. Az alábbiakban részletesen ismertetésre kerülő eredmények a hepaticus, valamint a bendőben és a duodenumban mért CYP enzimek aktivitását mutatják. Minden máj eredetű minta feldolgozását elvégeztük, a bendő és a duodenum szövetekből 5-5 minta került teljes feldolgozásra. A bendőmintákban mért CYP enzimaktivitás relevánsnak mondható, a duodenumból vett minták CYP-enzimaktivitása a kimutathatósági szint felett van, de mértéke, főleg a CYP2C9 izoenzim esetében elhanyagolható.

### ***CYP1A2 és CYP2C9 aktivitásának vizsgálata szarvasmarha májban***

A máj CYP1A2 és CYP2C9 aktivitása szarvasmarhában jól mérhetőnek bizonyult az alkalmazott mérési módszer segítségével. A kapott eredmények alapján a hepaticus CYP1A2 aktivitása szignifikánsan ( $P < 0,001$ ), közel 100-szor nagyobb, mint a CYP2C9 aktivitása (5. ábra).

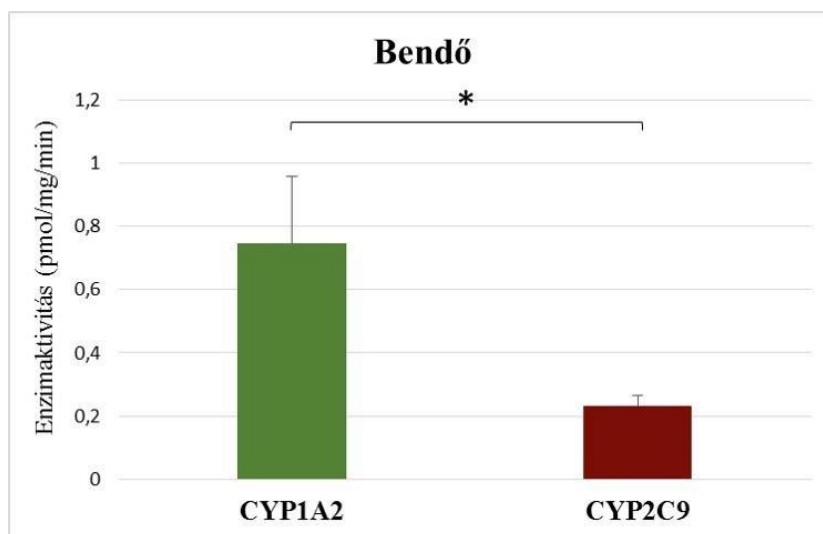


5. ábra: A szarvasmarha májmintákban mért CYP1A2 és CYP2C9 enzimaktivitások.  
\*\*\* $P < 0,001$ , átlag  $\pm$  SEM

### ***CYP1A2 és CYP2C9 aktivitásának vizsgálata szarvasmarha bendőnyálkahártyában***

A bendőfalban CYP1A2 aktivitása a májhoz képest szignifikánsan ( $P < 0,001$ ) alacsonyabb volt, de jól mérhetőnek bizonyult. A bendőben mért CYP2C9 aktivitása – a

májhoz hasonlóan – szignifikánsan ( $P < 0,05$ ) alacsonyabb a CYP1A2 izoenzimhez képest (6. ábra).

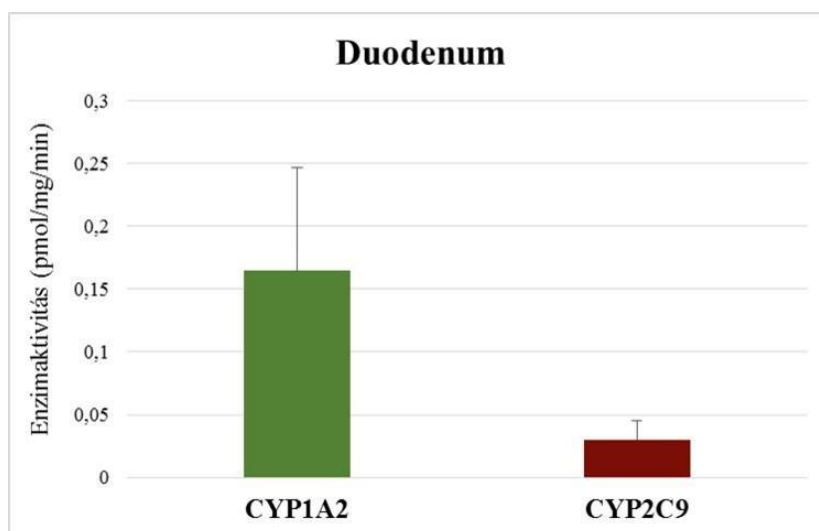


6. ábra: A bendőben mért CYP1A2 és CYP2C9 enzimaktivitások összehasonlító vizsgálata.

\* $P < 0,05$ , átlag  $\pm$  SEM

### ***CYP1A2 és CYP2C9 aktivitásának vizsgálata szarvasmarha duodenum-nyálkahártyában***

A duodenum-nyálkahártyából kimutatott CYP1A2 enzimaktivitása bár numerikusan nagyobb volt, mint CYP2C9 esetében, de a rendkívül alacsony értékek miatt jelentkező nagy szórás miatt ez a különbség nem bizonyult szignifikánsnak (7. ábra). Annak ellenére, hogy duodenumból is kimutathatók voltak a vizsgált enzimek, aktivitásuk mértéke – főleg a CYP2C9 esetében – elhanyagolható.



7. ábra: A duodenumban mért CYP1A2 és CYP2C9 enzimaktivitások összehasonlító vizsgálata.

Átlag  $\pm$  SEM

## Megbeszélés

Az élelmiszertermelő haszonállatok még csekély mértékben ismert máj- és bélbeli biotranszformációs tevékenységének vizsgálata a téma alapkutatási és összehasonlító biokémiai jelentősége mellett gyakorlati szempontból is kimagaslóan fontos adatokkal szolgálhat. Ezen állatfajok (pl. szarvasmarha, sertés, baromfi) CYP enzimrendszere expressziójának és szabályozásának tanulmányozása még kevésbé kiforrott, összehasonlítva az emberen és a laboratóriumi állatokon végzett hasonló kutatásokkal. Ezek az állatfajok gyakran ki vannak téve a gyógyszerek, a peszticidek és az egyéb szennyező anyagok káros hatásainak, amelyek nem csak önmagára az állatra, de közvetve – az ehető szövetekben felhalmozódott maradékanyagok révén – az emberre is veszélyesek lehetnek. Egyes tanulmányok szerint a CYP enzimek expressziójának vizsgálata élelmiszertermelő fajokban kifejezetten nagy jelentőséggel bír, mivel ily módon amellet, hogy lehetőségünk adódna egyes farmakotoxikológiai adatokat egyik fajról a másikra extrapolálni, értékelni tudnánk a tiltott gyógyszerekkel (pl.  $\beta$ -agonista, anabolikus szteroidok) kezelt állati eredetű élelmiszerek fogyasztói kockázatát vagy a szennyezőanyagoknak való kitettségüket (Dacasto et al., 2005).

Jelen munkánk során CYP1A2 és CYP2C9 izoenzimek aktivitását vizsgáltuk szarvasmarha májában, valamint bendő- és duodenum-nyálkahártyájában. Kutatócsoportunk további összehasonlító vizsgálatokat is végezett dámszarvas eredetű mintákból, ugyanezen szövetekben a fent említett izoenzimek vizsgálatára vonatkozóan (még nem publikált, jelen dolgozat tárgyát nem képező eredmények). Már 2005-ben Grasso és munkatársai CYP2C9-mRNS-t mutattak ki szarvasmarhák májában és veséjében, mely összhangban van Pegolo és munkatársainak kísérletével, amely során 2010-ben szarvasmarhák máj mikroszómájában CYP2C9-like aktivitást mutattak ki (Grasso et al, 2005; Pegolo et al., 2010). Eredményeink szerint a szarvasmarha hepatikus CYP1A2 izoenzim aktivitása szignifikánsan, közel 100-szor nagyobbak bizonyult a CYP2C9 izoenzimnél tapasztalt eredményhez képest. A szarvasmarha- és a dámszarvasminták eredményeit összehasonlítva a hepatikus CYP1A2 enzim aktivitása szignifikánsan, több mint kétszer nagyobbak bizonyult szarvasmarhában, mint dámszarvasban. A CYP1A2 izoenzim főként a májban expresszálódik – melyet a jelen kutatás eredményei is alátámasztanak –, részt vesz a koffein és a heterociklusos aminok metabolizációjában, emellett katalizálja az uroporfirinogén és a  $17\beta$ -ösztadiol metabolizmusát is (Ioannides, 2006; Brosen, 1995). A CYP1A alcsalád mRNS szintű indukciója a szarvasmarhák különböző szöveteiben főként a xenobiotikumok citoszolban

található aromás szénhidrogén receptorokhoz (AhR) való kötődése révén jön létre. Az AhR ligandok szerkezetükben hasonlóak lehetnek a herbicidként ismert 2,3,7,8-tetraklorodibenzo-r-dioxinhoz (2,3,7,8-TCDD), amely a CYP1A alcsalád egyik közismert induktora (Darwish et al., 2010).

A bendőfal CYP1A2 aktivitása a májhoz képest szignifikánsan alacsonyabb, de jól mérhető volt szarvasmarhában, míg az összehasonlító vizsgálatok során dámszarvasban a jelentősen kisebbnek bizonyult szarvasmarhához képest. A szarvasmarha bendőmintákból mért CYP2C9 aktivitása – a májhoz hasonlóan – alacsonyabbnak volt mérhető CYP1A2 izoenzimhez képest. Ezzel munkacsoportunk a nemzetközi szakirodalmat tekintve is, először mutatta ki valamely CYP enzim aktivitását szarvasmarha bendőfalban, azaz igazolta a bendőnyálkahártya aktív szerepét a xenobiotikumok biotranszformációs folyamataiban.

A duodenum-nyálkahártyából kimutatott CYP1A2 enzimaktivitása ugyancsak nagyobb volt, mint CYP2C9 esetében. Annak ellenére, hogy duodenumból is mérhetőek voltak a vizsgált enzimek, aktivitásuk mértéke – főleg a CYP2C9 esetében – elhanyagolható, míg dämadvad esetében a CYP1A2 aktivitás mértéke a kimutathatóság határa alatt maradt. Virkel és munkatársai fluorometriás módszerrel, SDS-akrilamid gél elektroforézissel és Western Blot módszerrel is vizsgálták a szarvasmarha eredetű duodenalis nyálkahártyában egyes xenobiotikumok biotranszformációjában résztvevő enzimeket, azonban nem tudták kimutatni e bélszakaszban a CYP1A alcsalád aktivitását. Ezen alcsalád tagjai szerkezetileg stabil, gerincesekben konstitutívan expresszáldó enzimek. E tanulmányon kívül korábbi *in vitro* kutatások is igazolják, hogy szarvasmarha máj mikroszómákban talált fehérjék keresztreakálnak nyúl, illetve patkány CYP1A enzimek ellen termelt antitestekkel, továbbá azt is, hogy a 7-etoxi- vagy 7-metoxirezorufin O-dealkilációjának mértéke szoros összefüggést mutat a CYP1A alcsalád expressziójával (Virkel et al., 2009; Sivapathasundaram et al., 2001; Nebbia et al., 2003). A 7-etoxirezorufin O-deetilációja szignifikánsan magasabb mértékűnek bizonyult szarvasmarhamintákban, mint más élelmiszer-termelő állatok és patkány esetében (Nebbia et al., 2003; Ioannides, 2006). Virkel és munkatársainak tanulmányában a mérhető CYP1A-mediált etoxirezorufin-O- dealkiláz (EROD) aktivitás hiánya összhangban volt a duodenum nyálkahártyájában található CYP1A immunreakáló fehérje hiányával. Birkner és munkatársai által végzett tanulmány szerint nagyon alacsony EROD aktivitás mérhető szarvasmarha vastagbél eredetű epiteliális sejtenyészetben (Birkner et al., 2003). Összességében ezek az eredmények azt jelezhetik, hogy ez az alcsalád konstitutívan gyengén expresszálddik szarvasmarhák bélrendszerének különböző szakaszaiban, ugyanakkor az is valószínűsíthető, hogy az általuk fogyasztott

takarmány CYP1A induktorokban szegény vagy azoktól mentes, mely tényezők szintén magyarázatul szolgálhatnak ezen izoenzimek alacsony aktivitására. Bizonyos természetes karotinoidok, például a lutein, amelyek kukoricaalapú étrendben megtalálhatók, közismert, hogy emberekben csökkentik CYP1A2 expresszióját. (Le Marchand et al., 1997). Az általunk elvégzett kísérlet eredményei korrelálnak a szakirodalomban található adatokkal.

Haszonállatok esetében a xenobiotikumok biotranszformációjának ideje élelmiszerhigiéniai szempontból is jelentős következményeket vonhat maga után. A nagyobb enzimaktivitás gyorsabb metabolizációt eredményez, míg a kisebb vagy gátolt aktivitással rendelkező enzimek szubsztrátjai felhalmozódhatnak a szervezetben, így az - állategészségügyi hatások mellett- megnövelhetik az élelmezés-egészségügyi várakozási időt. Az egyes xenobiotikumok anyagcseréjét tekintve végezhetünk kérődzőn belüli, különböző emlősfajok közötti (sertésfélék-kérődzők) illetve madár-emlős összehasonlító vizsgálatokat is.

A tanszék Biokémiai Osztályának korábbi kutatásai kiterjedtek többek között vaddisznó és házi sertés máj- és duodenumminták CYP1A2 és CYP2C9 enzimaktivitásának meghatározására is (Kurucz et al., 2019). E kutatás eredményeit összevetve a jelen tanulmánnyal, azt tapasztalhatjuk, hogy a vaddisznóhoz és házi sertéshez képest a szarvasmarha hepatikus CYP1A2 aktivitása magasabb, házi sertéshez viszonyítva közel hatszoros értéket mutat, de vaddisznóval összehasonlítva a különbség már sokkal kisebb. A házi sertés hepatikus CYP2C9 aktivitása több mint 100-szor, a vaddisznóban több mint 40-szer nagyobb, mint szarvasmarha esetében. A CYP1A2 nem csak fajok között összehasonlítva mutatott magasabb aktivitást, hanem a fentiekben már említetten a szarvasmarha minták közül is ez rendelkezett nagyobb aktivitással, így arra következtethetünk, hogy CYP1A2 kiemelt jelentőséggel bír a szarvasmarha detoxifikáló folyamataiban, míg a CYP2C9 nem tölt be kifejezett központi szerepet.

Vizsgálataink során tehát a nemzetközi szakirodalmat tekintve is elsőként állapítottuk meg, hogy a bendőfal CYP aktivitással rendelkezik, s a bendőfalon kívül a májban és a vékonybélben zajló xenobiotikum-biotranszformáció összehasonlító elemzésére is sor került. A nyert eredmények alaptudományi jelentőségük mellett, igen fontos információkat szolgáltathatnak az esetleges takarmány-gyógyszer vagy gyógyszer-gyógyszer kölcsönhatások megismeréséhez, így a maradékanyagoktól mentes, biztonságos élelmiszer előállításához.



## Összefoglalás

A xenobiotikumok lebontásában meghatározó szerepű citokróm P450 (CYP) enzimek működéséről kérdőőkben eddig viszonylag kevés irodalmi adat állt rendelkezésünkre, különös tekintettel az extrahepatikus szövetekre. Korábban már számos állatfaj esetében nem csak májban, hanem a vékonybél nyálkahártyájában is igazolták ezen enzimek jelenlétét, azonban kérdőők bendőfalából eddig csak egyes CYP alcsaládok kerültek kimutatásra mRNS szinten. A szájon át felvett xenobiotikumokból a bendőben zajló mikrobiális fermentáció révén különféle metabolitok keletkezhetnek, melyek anyagcseréjében a CYP enzimeknek, mint elsődleges metabolikus barriernek, fontos szerepe lehet. Kutatásaink során szarvasmarha eredetű hepatikus és extrahepatikus szövetekben vizsgáltuk a CYP1A2 és CYP2C9 izoenzimek aktivitását.

A mintákat Aberdeen Angus húshasznú szarvasmarhákból származó bendőpapillákból, a duodenum nyálkahártyájából, továbbá a máj *processus caudatusából* vettük (n=22), a Mikofami Kft. zalaszentiváni vágóhídján. A foszfátpufferben történő homogenizálást követően, kétlépcsős centrifugálással izoláltuk a posztmitokondriális felülúszót (ún. S9 frakciót), melyből a CYP1A2 és CYP2C9 enzimek aktivitását luminometriás módszerrel, CYP-Glo Kitek segítségével határoztuk meg. Az eredmények standardizálásához szükséges összfehérje-koncentráció mérését BCA módszerrel végeztük, a májminták hemoglobintartalmát ammóniareagens segítségével határoztuk meg. A májban mért enzimaktivitásokat a hemoglobinnal csökkentett összfehérje-koncentrációra, míg a bendő- és bélnyálkahártya CYP aktivitását az összfehérje-koncentrációra vonatkoztatva standardizáltuk.

Eredményeink szerint a máj, duodenum- és bendőnyálkahártya CYP1A1 és CYP2C9 aktivitása az alkalmazott luminometriás módszer segítségével jól meghatározható. Mindhárom általunk vizsgált szövetben a CYP1A2 aktivitása szignifikánsan nagyobb volt, mint a CYP2C9 esetében. Az eltérés a májmintákból mért enzimaktivitásoknál a legkifejezettebb, ott ugyanis közel 100-szoros különbséget tapasztaltunk. A duodenumból és a bendőből mért enzimaktivitások jelentősen alacsonyabbnak bizonyultak a májból kapott eredményekhez képest, azonban a detektálható szint felett voltak, így fontos adatokhoz jutottunk e szövetek vizsgálatával is. Eredményeink arra engednek következtetni, hogy a CYP1A2 izoenzim jelentős szerepet tölthet be a szarvasmarha detoxifikáló folyamataiban, míg a CYP2C9 izoenzimnek nem tulajdoníthatunk központi szerepet a xenobiotikumok lebontásában. Mindamelllett, hogy értékes eredményekhez jutottunk a szarvasmarhák

méregtelenítő folyamatainak vizsgálatára vonatkozóan, kijelenthetjük, hogy kutatócsoportunk a mérési eljárást sikeresen adaptálta kérődző eredetű minták CYP enzimaktivitásának kimutatására.

## Summary

Concerning the function of cytochrome P450 (CYP) enzymes in ruminants, limited data were available until now, especially regarding the extrahepatic tissues. Previously, the presence of these enzymes has been demonstrated in several animal species, not only in the liver, but also in the small intestines. So far, just a few CYP subfamilies were detected from rumen wall at mRNA level. Various metabolites can be produced by the ruminal microbial fermentation from orally ingested xenobiotics, and CYP enzymes, as a primary metabolic barrier, may have an important role in their metabolism. Hence, we investigated the activity of CYP1A2 and CYP2C9 isoenzymes in bovine hepatic and extrahepatic tissues.

Samples were gained from ruminal papillae, duodenal mucosa and *processus caudatus* of the liver from Aberdeen Angus beef cattle (n = 22) at the slaughterhouse of Mikofami Kft. in Zalaszentiván. The post-mitochondrial supernatant containing CYP enzymes was isolated after homogenization of tissue samples in phosphate buffer by a multi-step differential centrifugation. Specific activities of CYP1A2 and CYP2C9 enzymes were assessed by luminometric P450-Glo assays. BCA Assay Kit was applied to measure the total protein concentration of the samples in order to standardize the results. The amount of hemoglobin in the liver samples was determined with ammonia reagent. The enzyme activities measured in the liver were standardized to the total protein concentration excluding haemoglobin, whereas the CYP activity of the mucosal membrane of the rumen and intestines was standardized to the total protein concentration.

According to our results, activities of CYP1A2 and CYP2C9 were well detectable by the luminometric method. CYP1A2 activity was significantly higher than the activity of CYP2C9 in all three examined tissues. The difference between the activity of the investigated isoenzymes was the most remarkable in the case of liver samples, with nearly 100 times higher activity of CYP1A2 compared to that of CYP2C9. However, the activities of both examined isoenzymes were considerably lower in extrahepatic tissues compared to liver samples, but they were above the detection level, thus important data were gained by investigating these tissues as well. Our results suggest that the CYP1A2 isoenzyme may play an important role in the process of detoxification in cattle. meanwhile the CYP2C9 isoenzyme is suggested to play no central role in these processes. Valuable results have been obtained about the detection of detoxifying processes in cattle, hence we can state that our research group has successfully adapted the measurement procedure to detect CYP enzyme activity in ruminant samples.

## Irodalomjegyzék

- ANZENBACHER, P. AND ANZENBACHEROVÁ, E. (2001): Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 58, 737-747.
- ANZENBACHER, P., SOUCĚK, P., ANZENBACHEROVÁ, E., GUT, I., HRUBY', K., SVOBODA, Z., KVEĚTINA, A. (1998): Presence and activity of cytochrome P450 isoforms in minipig liver microsomes. *Drug Metabolism and Disposition*, 26,56-59.
- BALLENT, M., VIRKEL, G., MATÉ, L., VIVIANI, P., LANUSSE, C., LIFSCHITZ, A. (2016): Hepaticbiotransformation pathways and ruminal metabolic stability of the novel anthelmintic monepantel in sheep and cattle. *Journal of veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 39, 5.
- BOOBIS, A. R., SESARDIC, D., MURRAY, B. P., EDWARDS, R. J., SINGLETON, A.M., RICH, K. J., MURRAY, S., DE LA TORRES, R., SEGURA, J., PELKONEN, O., PASANEN, M., KOBAYASHI, S., ZHI-GUANG, T., DAVIES, D. S. (1990): Species variation in the response of the cytochrome P-450-dependent monooxygenase system to inducers and inhibitors. *Xenobiotica*, 20, 1139-1161.
- BIRKNER, S., WEBER, S., DOHLE, A., SCHMAHL, G., BOLRT, H. AND FÖLLMANN, W. (2003): Activities of drug metabolising enzymes in bovine colon epithelial cell cultures. *Archives of Toxicology*, 77, 621-629.
- BROSEN, K. (1995): Drug Interactions and the Cytochrome P450 System The Role of Cytochrome P450 1A2. *Clinical Pharmacokinetics*. 29, 20-25.
- CHOUDHARY, D., JANSSON, I., SCHENKMAN, J. B., SARFARAZI, M. AND STOILOV, I. (2003): Comparative expression profiling of 40 mouse cytochrome P450 genes in embryonic and adult tissues. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 414, 91-100.
- COLDHAM, N. G., BIANCOTTO, G., MONTESISSA, C., HOWELLS, L. C. AND SAUER, M. J. (1998): Utility of isolated hepatocytes and radio-HPLC-MSn for the analysis of the metabolic fate of 19-nortestosterone laurate in cattle. *Analyst* 123, 2589-94.
- COURT, M. H., DUAN, S. X., HESSE, L. M., VENKATAKRISHNAN, K., GREENBLATT, D. J. (2001): Cytochrome P450 2B6 is responsible for interindividual variability of propofol hydroxylation by human liver microsomes. *Anesthesiology*, 94, 110-119.

- CZERWINSKI, M., MCLEMORE, T. L., GELBOIN, H. V., GONZALEZ, F. J. (1994): Quantification of CYP2B7, CYP4B1, and CYPOR messenger RNAs in normal human lung and lung tumors. *Cancer Research*, 54, 1085-1091.
- DACASTO, M., EECKHOUTTE, C., CAPOLONGO, F., DUPUY, J., CARLETTI, M., CALLÉJA, C., NEBBIA, C., ALVINERIE, M., GALTIER, P. (2005): Effect of breed and gender on bovine liver cytochrome P450 3A (CYP3A) expression and inter-species comparison with other domestic ruminants. *Veterinary Research*, 36, 179-190.
- DARWISH, W. S., IKENAKA, Y., EL-GHAREE, W. R. AND ISHIZUKA M. (2010): High expression of the mRNA of cytochrome P450 and phase II enzymes in the lung and kidney tissues of cattle. *Animal*, 4, 2023-2029.
- DIPPLE, A. (1983): Formation, metabolism, and mechanism of action of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cancer Research*, 43:2422-2425.
- DJORDJEVIC, N., GHOTBI, R., BERTILSSON, L., JANKOVIC, S., AND AKLILLU, E. (2007): Induction of CYP1A2 by heavy coffee consumption in Serbs and Swedes. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 64, 381-385.
- FINK-GREMMELS, J. AND VAN MIERT, A. S. J. P. A. M. (1994): Veterinary drugs: disposition, biotransformation and risk evaluation. *Analyst* 119, 2521-28.
- FINK-GREMMELS, J. AND VAN MIERT, A. S. J. P. A. M. (1996): Species differences in biotransformation: conventional models in unconventional animal species. *Experimental and Toxicologic Pathology* 48, 120-27.
- GOLDSTEIN, J. A., DE MORAIS, S. M. (1994): Biochemistry and molecular biology of the human CYP2C subfamily. *Pharmacogenetics*, 4, 285-299.
- GRASSO, E., LONGO, V., COCEANI, F. AND GIOVANNI GERVASI, P. (2005): Cytochrome P450 expression and catalytic activity in coronary arteries and liver of cattle. *Biochimica et Biophysica Acta* 1722, 116-123.
- GREENER, M: (2000) The growing importance of cytochromes. *Pharma Market Letter*, 27, 24-25.
- GUENGERICH, F. P. (1997): Comparisons of catalytic selectivity of cytochrome P450 subfamily enzymes from different species. *Chemico-Biological Interactions*, 106, 161-182.

GUENGERICH, F. P. (1998): Environmental genome project: functional analysis of polymorphisms. *Environmental Health Perspectives*, 106, 365-368.

GUENGERICH, F. P., CYTOCHROME P450, IN: IOANNIDES C. (ED.) (2002): *Enzyme systems that metabolise drugs and other xenobiotics*, John Wiley & Sons Inc., New York, 33-65.

HARRIGAN, J. A., MCGARRIGLE, B. P., SUTTER, T. R., OLSON, J. R. (2006): Tissue specific induction of cytochrome P450 (CYP) 1A1 and 1B1 in rat liver and lung following in vitro (tissue slice) and in vivo exposure to benzo(a)pyrene. *Toxicol. In Vitro*, 20, 426-438.

HE, X. Y., TANG, L., WANG, S. L., CAI, Q. S., WANG, J. S., HONG, J. Y. (2006): Efficient activation of aflatoxin B1 by cytochrome P450 2A13, an enzyme predominantly expressed in human respiratory tract. *International Journal of Cancer*, 118, 2665-2671.

HONKAKOSKI, P., NEGISHI, M. (1997): The structure, function, and regulation of cytochrome P450 2A enzymes. *Drug Metabolism Review*, 29, 977-996.

HORBACH, G. J., WITKAMP, R. F., NATSUHORI, M., VAN RAAK, M., LIGTENBERG, M., KLEIJ, L., TEN BERGE, D., ZWEERS-ZEILMAKER, W. M., DE GROENE, E & VAN MIERT, A. S. J. P. A. M. (1997): Isolation of a bovine full length cytochrome P450 (CYP3A) cDNA sequence and its functional expression in V79 cells. *Environmental Pharmacology and Toxicology* 3, 17-24.

IOANNIDES, C. (1996): *Cytochromes P450: metabolic and toxicological aspects*. Boca Raton, FL., CRC Press.

IOANNIDES, C. (2006): Cytochrome P450 expression in the liver of foodproducing animals. *Current Drug Metabolism*, 7, 335-348.

KAMINSKY, L. S., ZHANG, Q. Y. (2003): The small intestine as a xenobiotic-metabolizing organ. *Drug Metabolism and Disposition*, 31:1520-1525.

KIDD, R. S., STRAUGHN, A. B., MEYER, M.C., BLAISDELL, J., GOLDSTEIN, J. A., DALTON, J. T. (1999): Pharmacokinetics of chlorpheniramine, phenytoin, glipizide and nifedipine in an individual homozygous for the CYP2C9\*3 allele. *Pharmacogenetics* 9, 71-80.

KLIEWER, S. A., LEHMANN, J. M., MILBURN, M. V. & WILSON, T. M. (1999). The PPARs and PXR: nuclear xenobiotic receptors that define novel hormone signaling pathways. *Recent Progress in Hormone Research* 54, 345-67.

KLOSE, T.S., BLAISDELL, J.A., GOLDSTEIN, J.A. (1999): Gene structure of CYP2C8 and extrahepatic distribution of the human CYP2Cs. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 13, 289-295.

KURUCZ, Á., NAGY, CS., KULCSÁR, A., ORBÁN, K., NEOGRÁDY, ZS., MÁTIS, G. (2018): Méregtelenítő folyamatok vizsgálata vadon élő állatfajokban. Irodalmi összefoglaló, *MAGYAR ÁLLATORVOSOK LAPJA*, 140, 551-562.

KURUCZ, Á., ORBÁN, K., MACKEI, M., KULCSÁR, A., NEOGRÁDI, ZS., MÁTIS, G. (2019): Investigation on hepatic and intestinal xenobiotic biotransformation in wild boar and domestic swine. *European Journal of Wildlife Research*, Publikálás folyamatban.

KUILMAN, M. E., MAAS, R. F., WOUTERSEN-VAN NIJNANTEN, F. M. & FINK-GREMMELS, J. (2000): Inhibition of aflatoxin M1 production. *Veterinary Quarterly*, 22, 30-5.

LEWIS, D. F. V. (2001) *Guide to cytochromes P450. Structure and function*. Taylor and Francis, London.

LEWIS, D. F. V., IOANNIDES, C., PARKE, D. V. (1998): Cytochrome P450 and species differences in xenobiotic metabolism and activation of carcinogen. *Environ Health Perspect*, 106, 633-641.

LE MARCHAND, L., FRANKE, A. A., CUSTER, L., WILKENS, L. R. AND COONEY, R. V.: (1997) Lifestyle and nutritional correlates of cytochrome CYP1A2 activity: inverse associations with plasma lutein and alpha-tocopherol. *Pharmacogenetics*, 7, 11-19.

MACHALA M., NEZVEDA K., IRIZAR A., BU-ABBAS A., IOANNIDES C. (1996): Expression and inducibility of cytochrome P450 proteins in the liver of chick embryo. *Archives of Toxicology*, 71, 57-63.

MARTIGNONI, M., GROOTHUIS, G. M. M. AND KANTER, R. D. (2006): Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism inhibition and induction. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*, 2, 875-894.

MCCREA, J. B., CRIBB, A., RUSHMORE, T., OSBORN, B., GILLEN, L., LO, M. W., WALDMAN, S., BJORNSSON, T., SPIELBERG, S., GOLDBERG, M. R. (1999): Phenotypic and genotypic investigations of a healthy volunteer deficient in the conversion of losartan to its active metabolite E-3174. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 65, 348-352.

MCFADYEN, M. C., BREEMAN, S., PAYNE, S., STIRK, C., MILLER, I. D., MELVIN, W. T. AND MURRAY, G. I. (1999): Immunohistochemical localization of cytochrome P450 CYP1B1 in breast cancer with monoclonal antibodies specific for CYP1B1. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 47, 1457-1464.

MUGFORD, C. A., KEDDERIS, G. L. (1998): Sex-dependent metabolism of xenobiotics. *Drug Metabolism Reviews*, 30, 441-498.

MURRAY, G. I., TAYLOR, M. C., MCFADYEN, M. C., MCKAY, J. A., GREENLEE, W. F., BURKE, M. D. AND MELVIN, W. T. (1997): Tumor-specific expression of cytochrome P450 CYP1B1. *Cancer Research*, 57, 3026-3031.

NEBBIA, C. (2001) Biotransformation enzymes as determinants of xenobiotic toxicity in domestic animals. *Journal of Veterinary Science*, 161, 238-252.

NEBBIA, C., DACASTO, M., GIULIANO ALBO, A. AND CARLETTI, M. (2000): Comparative expression of phase I and phase II hepatic drug metabolizing enzymes in horses, cattle, swine, chicks, rabbits and rats. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 23, D16.

NEBBIA, C., DACASTO, M., ROSSETTO GIACCHERINO, A., GIULIANO ALBO, A., CARLETTI, M. (2003): Comparative expression of liver cytochrome P450- dependent monooxygenases in the horse and in other agricultural and laboratory species. *Journal of Veterinary Science*, 165, 53-64.

NELSON, D. R., KAMATAKI, T., WAXMAN, D. J., GUENGERICH, P. F., ESTABROOK, R. W., FEYEREISEN, R., GONZALEZ, F. J., COON, M. J., GUNSALUS, I. C., GOTOH, O., OKUDA, K., AND NEBERT, D. W. (1993): The P450 Superfamily: Update on New Sequences, Gene Mapping, Accession Numbers, Early Trivial Names of Enzymes, and Nomenclature. *DNA AND CELL BIOLOGY* 12, 1-51.

PARKINSON, A., OGILVIE, B. W. (2007): Casarett and Doull's toxicology: The basic science of poison. Kansas City, Kansas The McGraw-Hill Companies, 2, 6.

PEGOLO, S., MERLANTI, R., GIANTIN, M., DACASTO, M., MONTESISSA, C. AND CAPOLONGO, F. (2010): High performance liquid chromatography determination of cytochrome P450 1A and 2C activities in bovine liver microsomes. *The Veterinary Journal* 183, 81-88.



RAHMAN, A., KORZEKWA, K.R., GROGAN, J., GONZALEZ, F.J., HARRIS, J.W. (1994): Selective biotransformation of taxol to 6 alpha-hydroxytaxol by human cytochrome P450 2C8. *Cancer Research*, 54, 5543-5546.

SAUER, M. J., DAVE, M., LAKE, B. G., MANCHEE, G. R., HOWELL, L. C. & COLDHAM, N. G. (1999): b2-agonist abuse in food producing animals: use of in vitro liver preparations to assess biotransformation and potential target residues for surveillance. *Xenobiotica* 29, 483-97.

SCHNEIDER, E. AND CLARK, D. S. (2013): Cytochrome P450 (CYP) enzymes and the development of CYP biosensors, *Biosensors and Bioelectronics*, 39, 1-13.

SERGENT, T., RIBONNET, L., KOLOSOVA, A., GARSOU, S., SCHAUT, A., DE SAEGER, S., VAN PETEGHEM, C., LARONDELLE, Y., PUSSEMIER, L. AND SCHNEIDER, Y. J. (2008): Molecular and cellular effects of food contaminants and secondary plant components and their plausible interactions at the intestinal level. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 813-841.

SHIMADA, T., MIMURA, M., INOUE, K., NAKAMURA, S., ODA, H., OHMORI, S., YAMAZAKI, H. (1997): Cytochrome P450-dependent drug oxidation activities in liver microsomes of various animal species including rats, guinea pigs, dogs, monkeys, and humans. *Archives of Toxicology*, 71, 401-408.

SIVAPATHASUNDARAM, S., MAGNISALI, P., COLDHAM, N. G., HOWELLS, L. C., SAUER M. J., IOANNIDES C. (2001): A study of the expression of the xenobiotic-metabolising cytochrome P450 proteins and of testosterone metabolism in bovine liver. *Biochemical Pharmacology*, 62, 635-645.

SRIDAR, C., KENT, U. M., NOTLEY, L. M., GILLAM, E. M., HOLLENBERG, P. F. (2002): Effect of tamoxifen on the enzymatic activity of human cytochrome CYP2B6. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 301, 945-952.

SUGIMURA, T., SATO, S. (1983): Mutagens –carcinogens in foods. *Cancer Research*, 43, 2415-2421.

SUTTER, T. R., TANG, Y. M., HAYES, C. L., WO, Y. Y., JABS, E. W., LI, X., YIN, H., CODY, C. W., GREENLEE, W. F. (1994): Complete cDNA sequence of a human dioxin-inducible mRNA identifies a new gene subfamily of cytochrome P450 that maps to chromosome 2. *Journal of Biological Chemistry*, 269, 13092-13099.

TANAKA, E. (1999): Gender-related differences in pharmacokinetics and their clinical significance. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*. 24, 339-346.

TOWBIN, H., STAEBELIN, T., GORDON, J. (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76, 4350-4354.

TREPANIER, L. A. (2006): Cytochrome P450 and Its Role in Veterinary Drug Interactions. *Veterinary Clinics Small Animal Practice* 36, 975-985.

VIRKEL, G., CARLETTI, M., CANTIELLO, M., DELLA DONNA, L., GARDINI, G., GIROLAMI, F., NEBBIA, C. (2009): Characterization of xenobiotic metabolizing enzymes in bovine small intestinal mucosa. *Journal of veterinary Pharmacology and Therapeutics* 33, 295-303.

WEAVER, R. J., THOMPSON, S., SMITH, G., DICKINS, M., ELCOMBE, C. R., MAYER, R. T., BURKE, M. D. (1994): A comparative study of constitutive and induced alkoxyresorufin O-dealkylation and individual cytochrome P450 forms in cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*), human, mouse, rat and hamster liver microsomes. *Biochemical Pharmacology*, 47, 763-773.

WILLIAMS, J. A., HYLAND, R., JONES, B. C., SMITH, D. A., HURST, S., GOOSEN, T. C., PETERKIN, V., KOUP, J. R., BALL, S. E., (2004). *Drug Metabolism and Disposition. The Biological Fate of Chemicals*, 32, 1201-1208.

WOLF, C. R. AND SMITH, G. (1999): Pharmacogenetics. *British Medical Bulletin*, 55, 366-386.

ZHAO, K., CHEN, Y. K., PENNER, G. B., OBA, M. AND GUAN, L. L (2017): Transcriptome analysis of ruminal epithelia revealed potential regulatory mechanisms involved in host adaptation to gradual high fermentable dietary transition in beef cattle. *BMC Genomics*, 18, 976.

## Köszönetnyilvánítás

Elsőként szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek Oláhné Dr. Orbán Katának és Dr. Mátis Gábornak elengedhetlen közreműködésükért, kitartó lelkesítésükért és fáradhatatlan segítségnyújtásukért a dolgozatom létrejöttéhez. Továbbá köszönettel tartozom Dr. Neogrády Zsuzsanna tanárnőnek, a Biokémiai Osztály vezetőjének, a támogatásáért, valamint, hogy lehetővé tette a Biokémiai Osztály kutatásaiba való bekapcsolódásomat. Hálásan köszönöm Dr. Mackei Máténak, Kovács Emmának a kísérletek során nyújtott segítségüket.

Hálámat szeretném kifejezni Dr. Fülöp Endrének, Dr. Kiss Anitának, Kurucz Katának. Továbbá a Mikofami Kft. és a Hubertus Agráripari Bt. valamennyi munkatársának a mintavételezésben, illetve annak szervezésében nyújtott segítségükért.

Köszönettel tartozom továbbá a Gyógyszertani és Méregtani Tanszék munkatársainak, valamint Dr. Jerzsele Ákos tanszékvezetőnek, illetve Dr. Farkas Orsolyának és Palócz Orsolyának, hogy lehetővé tették a CYP enzimek luminometriás mérését.

Kutatómunka az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap (ESZA) társfinanszírozásával valósul meg (a támogatási szerződés száma: AZ EFOP-3.-6.-3.-VEKOP-16-2017-000005, címe: Tudományos utánpótlás erősítése a hallgatók tudományos műhelyeinek és programjainak támogatásával, mentorálás folyamatának kidolgozásával).

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni a családomnak és barátaimnak a türelmüket és támogatásukat, hiszen e nélkül a dolgozat nem jöhetett volna létre.

**HuVetA**  
**ELHELYEZÉSI MEGÁLLAPODÁS ÉS SZERZŐI JOGI NYILATKOZAT\***

Név: Balogh Dániel  
Elérhetőség (e-mail cím): balogh.daniel2@gmail.com  
A feltöltendő mű címe: A máj, a borsó és a vörösvérsejt alakítása xenotranszformáció folyamatainak összehasonlító vizsgálata  
A mű megjelenési adatai: Budapest, 2019  
Az átadott fájlok száma: 1 db

---

Jelen megállapodás elfogadásával a szerző, illetve a szerzői jogok tulajdonosa nem kizárólagos jogot biztosít a HuVetA számára, hogy archiválja (a tartalom megváltoztatása nélkül, a megőrzés és a hozzáférhetőség biztosításának érdekében) és másolásvédett PDF formára konvertálja és szolgáltatssa a fenti dokumentumot (beleértve annak kivonatát is).

Beleegyezik, hogy a HuVetA egynél több (csak a HuVetA adminisztrátorai számára hozzáférhető) másolatot tároljon az Ön által átadott dokumentumból kizárólag biztonsági, visszaállítási és megőrzési célból.

Kijelenti, hogy az átadott dokumentum az Ön műve, és/vagy jogosult biztosítani a megállapodásban foglalt rendelkezéseket arra vonatkozóan. Kijelenti továbbá, hogy a mű eredeti és legjobb tudomása szerint nem sérti vele senki más szerzői jogát. Amennyiben a mű tartalmaz olyan anyagot, melyre nézve nem Ön birtokolja a szerzői jogokat, fel kell tüntetnie, hogy korlátlan engedélyt kapott a szerzői jog tulajdonosától arra, hogy engedélyezhesse a jelen megállapodásban szereplő jogokat, és a harmadik személy által birtokolt anyag rész mellett egyértelműen fel van tüntetve az eredeti szerző neve a művön belül.

A szerzői jogok tulajdonosa a hozzáférés körét az alábbiakban határozza meg **(egyetlen, a megfelelő négyzetben elhelyezett x jellel)**:

- engedélyezi, hogy a HuVetA-ban -ban tárolt művek korlátlanul hozzáférhetővé váljanak a világhálón,
- az Állatorvostudományi Egyetem belső hálózatára (IP címeire) korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,
- a Könyvtárban található, dedikált elérést biztosító számítógépre korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,
- csak a dokumentum bibliográfiai adatainak és tartalmi kivonatának feltöltéséhez járul hozzá (korlátlan hozzáféréssel),

Kérjük, **nyilatkozzon a négyzetben elhelyezett jellel a helyben használatról is:**

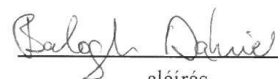


Engedélyezem a dokumentum(ok) nyomtatott változatának helyben olvasását a könyvtárban.

Amennyiben a feltöltés alapját olyan mű képezi, melyet valamely cég vagy szervezet támogatott illetve szponzorált, kijelenti, hogy jogosult egyetérteni jelen megállapodással a műre vonatkozóan.

A HuVetA üzemeltetői a szerző, illetve a jogokat gyakorló személyek és szervezetek irányában nem vállalnak semmilyen felelősséget annak jogi orvoslására, ha valamely felhasználó a HuVetA-ban engedéllyel elhelyezett anyaggal törvénytörtő módon visszaélne.

Budapest, 2019. év 11 hó 20 nap



aláírás

szerző/a szerzői jog tulajdonosa

---

*A HuVetAMagyar Állatorvos-tudományi Archívum – Hungarian Veterinary Archive az Állatorvostudományi Egyetem Hutjra Ferenc Könyvtár, Levéltár és Múzeum által működtetett egyetemi és szakterületi online adattár, melynek célja, hogy a magyar állatorvos-tudomány és -történet dokumentumait, tudásvagyonát elektronikus formában összegyűjtse, rendszerezze, megőrizze, kereshetővé és hozzáférhetővé tegye, szolgálta, a hatályos jogi szabályozások figyelembe vételével.*

*A HuVetA a korszerű informatikai lehetőségek felhasználásával biztosítja a könnyű, (internetes keresőgépekkel is működő) kereshetőséget és lehetőség szerint a teljes szöveg azonnali elérését. Célja ezek révén*

- *a magyar állatorvos-tudomány hazai és nemzetközi ismertségének növelése;*
- *a magyar állatorvosok publikációira történő hivatkozások számának, és ezen keresztül a hazai állatorvosi folyóiratok impakt faktorának növelése;*
- *az Állatorvostudományi Egyetem és az együttműködő partnerek tudásvagyonának koncentrált megjelenítése révén az intézmények és a hazai állatorvos-tudomány tekintélyének és versenyképességének növelése;*
- *a szakmai kapcsolatok és együttműködés elősegítése,*
- *a nyílt hozzáférés támogatása.*

## Nyilatkozat a TDK és a diplomamunka azonosságáról

Alulírott *Balogh Dániel*

nyilatkozom, hogy diplomamunkám,

melynek címe *A máj, a bendő és a vékonybél-gallékakétya xenobiotikum-biotransformációs folyamatainak összehasonlító vizsgálata rorvasnankétyben*

tartalmi és formai szempontból teljes mértékben megegyezik az azonos című, a *2014*

évi TDK konferencián szerepelt dolgozatommal.

Budapest, *2019. 11. 20*

*Balogh Dániel*

**BALOGH DÁNIEL**

a hallgató neve és aláírása

## Konzulensi ellenjegyzés

Alulírott Dr. Orbán Kata..... igazolom, hogy

Balogh Dániel..... (a hallgató neve)

A máj, a bendő- és vékonybél-nyálkahártya xenobiotikum-biotranszformációs folyamatainak

összehasonlító vizsgálata szarvasmarhában

című diplomamunkáját ismerem, azt beadásra és védésre alkalmasnak tartom.

Budapest, 2019. 11. 20.....

Dr. Orbán Kata.....

.....

a témavezető neve és aláírása

Elek Hani és Biokémiai.....

.....

tanszék