



**Instytut Farmakologii
im. Jerzego Maja
Polskiej Akademii Nauk**

mgr inż. Renata Pukło

**Znaczenie receptorów glutaminianergicznych NMDA
w regulacji cytochromu P450 w wątrobie**

Praca doktorska wykonana w Zakładzie Farmakokinetyki i Metabolizmu Leków
Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk

Promotor:

Prof. dr hab. Władysława Anna Daniel

Kraków, 2025



Rozprawa doktorska powstała w trakcie realizacji studiów doktoranckich w Krakowskiej Interdyscyplinarnej Szkole Doktorskiej (KISD).

Badania opisane w niniejszej pracy doktorskiej zostały zrealizowane w ramach funduszy pochodzących z:

- Grantu NCN – OPUS 12 (kierownik: prof. dr hab. Władysława Anna Daniel) „Rola systemu glutaminianergicznego mózgu w neuroendokrynej regulacji ekspresji i aktywności cytochromu P450 w wątrobie” (nr 2016/23/B/NZ7/02283)*
- Funduszy statutowych Zakładu Farmakokinetyki i Metabolizmu Leków Instytutu Farmakologii im. Jerzego Maja Polskiej Akademii Nauk.*

Pragnę złożyć serdeczne podziękowania

Pani Profesor dr hab. Władysławie Annie Daniel

*za udzieloną pomoc, poświęcony czas i cenne wskazówki
w trakcie przygotowywania niniejszej pracy.*

*Koleżankom i Kolegom
z Zakładu Farmakokinetyki i Metabolizmu Leków*

*za okazaną życzliwość, pomoc oraz wsparcie
na różnych etapach realizacji pracy.*

Mojej Rodzinie

za wsparcie i obecność.

SPIS TREŚCI

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW	5
I. WSTĘP	8
1. Cytochrom P450	9
1.1 Budowa i funkcje	10
1.2 Metabolizm związków endogennych i egzogennych	10
1.3 Różnice pomiędzy człowiekiem i szczurem	13
2. Fizjologiczna regulacja cytochromu P450 w wątrobie	15
2.1 Regulacja na poziomie molekularnym	16
2.2 Regulacja na poziomie obwodowym	20
2.3 Neuroendokrynną regulacją na poziomie mózgu	23
3. Układ glutaminianergiczny	27
3.1 Sygnalizacja glutaminianergiczna w mózgu	27
3.2 Sygnalizacja glutaminianergiczna na obwodzie	32
3.3 Sygnalizacja glutaminianergiczna w patofizjologii zaburzeń neuropsychiatrycznych	33
II. CEL I ZAKRES PRACY	37
III. MATERIAŁY I METODY	42
1. Materiał biologiczny	42
1.1 Zwierzęta	42
1.2 Szczurze mikrosomy wątrobowe	42
2. Związki i materiały użyte do badań	42
2.1 Substancje anestetyczne	42
2.2 Materiały do operacji stereotaktycznych i iniekcji domózgowych	42
2.3 Narzędzia farmakologiczne	43
2.4 Odczynniki do przygotowania mikrosomów wątrobowych	43
2.5 Specyficzne substraty i ich metabolity, kofaktory oraz pozostałe odczynniki do reakcji metabolicznych	43
2.6 Odczynniki do ekstrakcji oraz chromatografii cieczowej	44
2.7 Odczynniki do oznaczania białka całkowitego	44
2.8 Odczynniki i przeciwciała do analizy Western blotting	44
2.9 Odczynniki i testy TaqMan do analizy RT-PCR	46
2.10 Zestawy odczynników ELISA do pomiaru poziomu hormonów	46

3. Aparatura	46
4. Podania domózgowe związku CP-101,606	48
4.1 Podania do komór bocznych mózgu	48
4.2 Podania do jąder przykomorowych podwzgórza.....	49
4.3 Podania do jąder łukowatych podwzgórza	49
5. Przygotowanie materiału biologicznego.....	50
5.1 Przygotowanie surowicy	50
5.2 Przygotowanie mikrosomów wątrobowych.....	50
6. Badanie aktywności wybranych enzymów cytochromu P450 z wykorzystaniem specyficznych substratów, metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC).....	50
6.1 Metabolizm bufuralolu (CYP2D)	51
6.2 Metabolizm kofeiny (CYP1A).....	52
6.3 Metabolizm testosteronu (CYP2A, CYP2B, CYP2C11, CYP3A) – <i>ex vivo</i>	53
6.4 Metabolizm testosteronu (CYP2A, CYP2B, CYP2C11, CYP3A) – <i>in vitro</i> ...	54
6.5 Metabolizm warfaryny (CYP2C6).....	54
7. Pomiar stężenia białka całkowitego w mikrosomach wątrobowych metodą BCA	55
8. Oznaczenie poziomu białka wybranych enzymów cytochromu P450 w mikrosomach wątroby techniką Western blotting	55
9. Oznaczenie poziomu mRNA wybranych genów <i>CYP</i> w wątrobie techniką RT-PCR	57
10. Oznaczenie poziomu wybranych hormonów	58
11. Analiza statystyczna	58
V. WYNIKI	59
1. Wpływ wielokrotnego podawania związku CP-101,606 do komór bocznych mózgu na aktywność i ekspresję cytochromu P450 w wątrobie	59
1.1 Wpływ podawania CP-101,606 do komór bocznych na aktywność i ekspresję CYP1A.....	59
1.2 Wpływ podawania CP-101,606 do komór bocznych na aktywność i ekspresję CYP2A.....	62
1.3 Wpływ podawania CP-101,606 do komór bocznych na aktywność i ekspresję CYP2B.....	63
1.4 Wpływ podawania CP-101,606 do komór bocznych na aktywność i ekspresję CYP2C6.....	64

1.5 Wpływ podawania CP-101,606 do komórek bocznych na aktywność i ekspresję CYP2C11	65
1.6 Wpływ podawania CP-101,606 do komórek bocznych na aktywność i ekspresję CYP2D.....	66
1.7 Wpływ podawania CP-101,606 do komórek bocznych na aktywność i ekspresję CYP3A.....	67
1.8 Wpływ podawania CP-101,606 do komórek bocznych na poziom hormonów ...	68
2. Wpływ wielokrotnego podawania związku CP-101,606 do jąder przykomorowych podwzgórza na aktywność i ekspresję cytochromu P450 w wątrobie.....	70
2.1 Wpływ podawania CP-101,606 do jąder przykomorowych na aktywność i ekspresję CYP1A.....	70
2.2 Wpływ podawania CP-101,606 do jąder przykomorowych na aktywność i ekspresję CYP2A.....	72
2.3 Wpływ podawania CP-101,606 do jąder przykomorowych na aktywność i ekspresję CYP2B	74
2.4 Wpływ podawania CP-101,606 do jąder przykomorowych na aktywność i ekspresję CYP2C6	75
2.5 Wpływ podawania CP-101,606 do jąder przykomorowych na aktywność i ekspresję CYP2C11	76
2.6 Wpływ podawania CP-101,606 do jąder przykomorowych na aktywność i ekspresję CYP2D6.....	77
2.7 Wpływ podawania CP-101,606 do jąder przykomorowych na aktywność i ekspresję CYP3A.....	77
2.8 Wpływ podawania CP-101,606 do jąder przykomorowych na poziom hormonów	79
3. Wpływ wielokrotnego podawania związku CP-101,606 do jąder łukowatych podwzgórza na aktywność i ekspresję cytochromu P450 w wątrobie.....	80
3.1 Wpływ podawania CP-101,606 do jąder łukowatych na aktywność i ekspresję CYP1A.....	80
3.2 Wpływ podawania CP-101,606 do jąder łukowatych na aktywność i ekspresję CYP2A.....	82
3.3 Wpływ podawania CP-101,606 do jąder łukowatych na aktywność i ekspresję CYP2B.....	83

3.4 Wpływ podawania CP-101,606 do jąder łukowatych na aktywność i ekspresję CYP2C6.....	85
3.5 Wpływ podawania CP-101,606 do jąder łukowatych na aktywność i ekspresję CYP2C11.....	86
3.6 Wpływ podawania CP-101,606 do jąder łukowatych na aktywność i ekspresję CYP2D6.....	87
3.7 Wpływ podawania CP-101,606 do jąder łukowatych na aktywność i ekspresję CYP3A.....	87
3.8 Wpływ podawania CP-101,606 do jąder łukowatych na poziom hormonów ..	89
4. Bezpośredni wpływ związku CP-101,606 na aktywność enzymów CYP w mikrosomach wątrobowych szczura – badania <i>in vitro</i>	90
VI. DYSKUSJA.....	94
VII. WNIOSKI.....	108
VIII. STRESZCZENIE.....	110
IX. SUMMARY.....	113
X. LITERATURA	116

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

- α KG – α -ketoglutaran
- AAT – (ang. aspartate aminotransferase) – aminotransferaza asparaginianowa
- ACTH – (ang. *adrenocorticotropic hormone*) – hormon adrenokortykotropowy
- AhR – (ang. *aryl hydrocarbon receptor*) – receptor węglowodorów aromatycznych
- ARC – (ang. *arcuate nucleus*) – jądro łukowate podwzgórza
- ARNT – (ang. *aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*) translokator jądrowy receptora węglowodorów aromatycznych
- CAR – (ang. *constitutive androstane receptor*) – konstytutywny receptor androstanu
- CRH – (ang. *corticotropin-releasing hormone*) – kortykoliberyna
- CRT – (ang. *corticosterone*) – kortykosteron
- CYP – cytochrom P450
- C/EBP – (ang. *CCAAT/enhancer-binding protein*) – białko wiążące CCAAT/wzmacniacz transkrypcji
- EAATs – (ang. *excitatory amino acid transporters*) – transportery aminokwasów pobudzających
- ELISA – (ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*) – test immunoenzymatyczny
- GABA – (ang. *gamma-aminobutric acid*) – kwas γ -aminomasłowy
- GH – (ang. *growth hormone*) – hormon wzrostu
- GHR – (ang. *growth hormone receptor*) – receptor hormonu wzrostu
- GHRH – (ang. *growth hormone-releasing hormone*) – somatoliberyna
- Gln – glutamina
- Glu – glutaminian
- GR – (ang. *glucocorticoid receptor*) – receptor glukokortykoidowy
- GRE – (ang. *glucocorticoid responsive element*) – element odpowiedzi na glukokortykoidy
- HNF – (ang. *hepatic nuclear factor*) – jądrowy czynnik hepatocytarny
- HPLC – (ang. *high performance liquid chromatography*) – wysokosprawna chromatografia cieczowa
- INF γ – (ang. *interferon gamma*) – interferon γ
- IL – interleukina
- JAK2 – (ang. *Janus kinase 2*) – kinaza Janusa 2
- LHA – (ang. *lateral hypothalamus area*) – boczny obszar podwzgórza

- MAPK – (ang. *mitogen-activated protein kinases*) – kinazy białkowe aktywowane mitogenami
- mPFC – (ang. *medial prefrontal cortex*) – przyśrodkowa kora przedczołowa
- NADP – fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego
- NADPH – forma zredukowana fosforanu dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego
- NAMs – (ang. *negative allosteric modulators*) – negatywne modulatory allosteryczne
- NF- κ B – (ang. *nuclear factor kappa B*) – jądrowy czynnik kappa B
- NMDA – N-metylo-D-asparagininian; NMDAR – receptor N-metylo-D-asparaginowy
- NR – (ang. *nuclear receptor*) – receptor jądrowy
- OUN – ośrodkowy układ nerwowy
- PI3K – (ang. *phosphoinositide 3-kinase*) – kinaza 3-fosfatydylinozytolu
- Pit – (ang. *pituitary gland*) – przysadka mózgowa
- PVN – (ang. *paraventricular nucleus*) – jądro przykomorowe podwzgórza
- PXR – (ang. *pregnane X receptor*) – receptor pregnanu X
- RT-PCR – (ang. *real-time polymerase chain reaction*) łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym
- RXR – (ang. *retinoid X receptor*) – receptor retinoidowy X
- SNRI – (ang. *serotonin norepinephrine reuptake inhibitor*) – inhibitor wychwytu zwrotnego serotoniny i noradrenaliny
- SRIH – (ang. *somatotropin release-inhibiting hormone*) – somatostatyna
- SSRI – (ang. *selective serotonin reuptake inhibitor*) – inhibitor wychwytu zwrotnego serotoniny
- STAT5b – (ang. *signal transducer and activator of transcription 5b*) – przekaźnik i aktywator transkrypcji 5b
- T₃ – trójiodotyronina
- T₄ – tyroksyna
- TCA – (ang. *tricarboxylic acid cycle*) – cyklu kwasu trójkarboksylowego
- THR – (ang. *thyroid hormone receptor*) – receptor hormonu tarczycy
- TNF α – (ang. *tumor necrosis factor alpha*) – czynnik martwicy nowotworu α
- TRE – (ang. *thyroid hormone responsive element*) – element odpowiedzi na hormon tarczycy
- TRH – (ang. *thyrotropin-releasing hormone*) – tyreoliberyna
- TSH – (ang. *thyroid-stimulating hormone*) – hormon tyreotropowy

VGluT2 – (ang. *vesicular glutamate transporter 2*) – pęcherzykowy transporter glutaminianu 2

XRE – (ang. *xenobiotic response element*) – element odpowiedzi na ksenobiotyki

I. WSTĘP

Skuteczność i bezpieczeństwo potencjalnego leku zależą nie tylko od jego właściwości terapeutycznych, ale również od parametrów farmakokinetycznych, które determinują jego losy w organizmie. Procesy takie jak wchłanianie, dystrybucja, metabolizm i wydalanie wpływają zarówno na efektywność, jak i bezpieczeństwo terapii. W kontekście metabolizmu, kluczową rolę odgrywają enzymy cytochromu P450 (CYP), które uczestniczą w oksydacyjnej biotransformacji większości leków, w przeważającej części poprzez rodziny CYP1, CYP2 i CYP3. Jednocześnie funkcje enzymów cytochromu P450 obejmują syntezę i degradację endogennych hormonów steroidowych, witamin, kwasów tłuszczowych i żółciowych (Honkakoski i Negishi 2000).

Enzymy cytochromu P450 charakteryzują się szeroką i częściowo pokrywającą się specyficznością wobec substratów, jednak metabolizm wielu leków przy istotnych klinicznie stężeniach zachodzi głównie dzięki działaniu jednego lub kilku enzymów (Zanger i Schwab 2013). Ogranicza to zdolność układu fazy I do kompensacji w przypadku niedoboru danego enzymu. Istotnym elementem prognozowania różnic w farmakokinetyce i odpowiedzi organizmu na leki jest poznanie i zrozumienie, jakie czynniki wewnętrzne i środowiskowe wpływają na ekspresję i funkcjonowanie tych enzymów. W przypadku niektórych enzymów, zwłaszcza CYP2D6, istotnym źródłem zmiennego poziomu aktywności są jednogenowe polimorfizmy, natomiast regulacja większości enzymów jest bardziej skomplikowana i wieloczynnikowa. Obejmuje to zarówno dodatkowe polimorfizmy w genach regulacyjnych, jak i różnorodne czynniki środowiskowe i fizjologiczne (Zanger i Schwab 2013). Różnice w poziomie ekspresji oraz funkcjonalności poszczególnych enzymów CYP mogą znacząco determinować metabolizm leków i substancji chemicznych wpływając na interakcje farmakologiczne, a także na różnice gatunkowe. Zróznicowana ekspresja enzymów cytochromu P450 zależy od takich czynników jak płeć, rodzaj tkanki czy stadium rozwoju, a kontrola regulacyjna odbywa się za pośrednictwem hormonów i czynników wzrostu. Jednocześnie enzymy cytochromu P450 wykazują istotny udział w metabolizmie i eliminacji endogennych substancji sygnałowych, które pełnią swoją funkcję poprzez receptory błonowe, jądrowe czy cytoplazmatyczne zależne od ligandu (Honkakoski i Negishi 2000).

Regulacja ekspresji enzymów CYP odbywa się poprzez aktywację odpowiednich receptorów pod wpływem hormonów przysadkowych. Samo wydzielanie tych hormonów kontrolowane jest przez podwzgórze, unerwione przez różne układy neuroprzekaźnikowe, takie jak badane już w kontekście regulacji cytochromu układy monoaminergiczne: noradrenergiczny (Kot i Daniel 2011; Bromek i wsp. 2013; Sadakierska-Chudy i wsp. 2013; Kot i wsp. 2015), dopaminergiczny (Wójcikowski i wsp. 2007, 2008; Wójcikowski i Daniel 2009), serotoninerogeniczny (Rysz i wsp. 2015, 2016a, 2016b; Bromek i Daniel 2021) oraz ostatnio również układ glutaminianergiczny (Bromek i wsp. 2021; Pukło i wsp. 2023, 2025).

1. Cytochrom P450

Badania nad funkcją enzymów cytochromu P450 sięgają lat 60. XX wieku i po dzień dzisiejszy nie jest znana rola wszystkich obecnie zidentyfikowanych enzymów CYP. Ich odkrycie datuje się na rok 1962, kiedy to ukazała się praca Omura i Sato, którzy w swoich badaniach stwierdzili, iż zredukowany kompleks cytochromu P450 z tlenkiem węgla wykazuje maksymalną absorbancję przy długości fali 450 nm (Omura i Sato 1962, 1964; Guengerich 2021). Enzymy cytochromu P450 występują niemal we wszystkich organizmach, gdzie zakotwiczone są w retikulum endoplazmatycznym i wewnętrznej błonie mitochondrialnej (Werck-Reichhart i Feyereisen 2000). Wyjątkowa bioróżnorodność enzymów CYP występuje u bakterii (choć nie stwierdzono ich u *E. coli*), gdzie zazwyczaj zlokalizowane są one we frakcji cytosolowej komórki (Kelly i wsp. 2003).

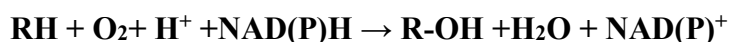
W badaniach *in vitro* wykorzystuje się frakcję homogenatu komórkowego, zawierającą fragmenty błon siateczki śródplazmatycznej, które to w wyniku wirowania różnicowego tworzą małe pęcherzykowate struktury, tak zwane mikrosomy od greckich słów *micros* (mały) i *soma* (ciało) (Wells 2005). U człowieka, enzymy cytochromu P450 występują w największej ilości w wątrobie, a następnie w korze nadnerczy i jelicie cienkim. Ich obecność stwierdzono również w innych tkankach, takich jak nerki, mózg czy płuca (Seliskar i Rozman 2007). Ze względu na homologię sekwencji aminokwasowej enzymy cytochromu P450 zostały przydzielone do rodzin (homologia sekwencji powyżej 40%) i podrodzin (homologia sekwencji powyżej 55%). Na przykład, enzym CYP3A4 oznacza 4 enzym, podrodziny A, rodziny 3, natomiast gen kodujący dane białko zapisywany jest kursywą (Nebert i wsp. 1991; Nelson 2006). Jak

dotąd zidentyfikowano 57 ludzkich genów kodujących enzymy CYP, które przyporządkowano do 18 rodzin i 44 podrodzin (Zanger i Schwab 2013).

1.1 Budowa i funkcje

Metabolizm leków zachodzi głównie w wątrobie, gdzie następuje biotransformacja związku w dwóch fazach. W fazie I (faza funkcjonalizacji) zachodzą reakcje katalizowane przez enzymy cytochromu P450, z których najczęstszą jest utlenianie. W fazie II (faza koniugacji) metabolit fazy I jest sprzęgany z cząsteczkami takimi jak kwas glukuronowy czy glutation, co ułatwia usuwanie z organizmu.

Cytochrom P450 w swojej strukturze zawiera grupę prostetyczną hemu, która jest kluczowa dla aktywności katalitycznej. Enzymy CYP charakteryzują się aktywnością monooksygenazy, a typowa reakcja utleniania zachodzi według następującego schematu:



gdzie RH – substrat, R-OH – produkt.

Po utworzeniu kompleksu substrat–cytochrom, dochodzi do przeniesienia elektronu z NADPH poprzez reduktazę cytochromu P450, co skutkuje zredukowaniem atomu żelaza hemu z Fe^{3+} do Fe^{2+} i umożliwia przyłączenie cząsteczki tlenu. W wyniku dostarczenia drugiego elektronu dochodzi do rozpadu kompleksu z utworzeniem hydroksylowanego produktu, cząsteczki wody oraz odtworzeniem zredukowanej formy cytochromu P450 (Guengerich 2018). Efektem reakcji katalizowanej przez enzymy CYP jest powstanie związku bardziej hydrofilnego względem substratu.

Cytochrom P450 charakteryzuje się niską specyficznością substratową, dzięki czemu metabolizuje wiele różnych związków o odmiennej budowie strukturalnej, zarówno endogennych, jak i egzogennych.

1.2 Metabolizm związków endogennych i egzogennych

Enzymy cytochromu P450 biotransformują szereg związków zarówno endogennych, jak i egzogennych. Większość leków wydawanych na receptę jest metabolizowana przez enzymy z rodzin CYP1–3 (Zanger i wsp. 2008). Mimo, że

głównymi miejscami metabolizmu leków są wątroba i jelita, to metabolizm lokalny zależny od CYP w danym organie (np. w płucach, nerkach, mózgu) również może mieć znaczenie w odpowiedzi organizmu na leczenie. W wątrobie człowieka w największej ilości występują enzymy należące do podrodzin CYP3A, CYP2C, CYP2E i CYP1A (tabela 1). Natomiast w jelitach najwięcej jest enzymów podrodziny CYP3A, ponad 80% (Zanger i wsp. 2008; Song i wsp. 2021).

Tabela 1. Procentowa zawartość enzymów CYP w wątrobie człowieka oraz procent leków wydawanych na receptę metabolizowanych przez konkretne enzymy CYP (Zanger i wsp. 2008; Prakash i wsp. 2015; Song i wsp. 2021).

CYP	Zawartość procentowa CYP w wątrobie człowieka	Procent leków wydawanych na receptę metabolizowanych przez CYP
1A2	~10–13%	8,9%
2A6	~4%	3,4%
2B6	~1–5%	7,2%
2C8	~7%	4,7%
2C9	~18–24%	12,8%
2C19	~2–7%	6,8%
2D6	~2–5%	20%
2E1	~7–10%	3%
3A4/5	~20–35%	30,2%

Głównymi grupami leków metabolizowanymi przez CYP1A2 są: leki przeciwpsychotyczne (neuroleptyki), przeciwbólowe, przeciwdepresyjne, przeciwnowotworowe i rozszerzające oskrzela, a ponadto CYP1A2 metabolizuje stymulanty (Brøsen i wsp. 1993; Clarke i wsp. 1994; Faber i wsp. 2005). Wykazano również powiązania pomiędzy polimorfizmem CYP1A2 a ryzykiem zachorowania na raka jelita grubego, raka piersi czy raka prostaty (Ma i Lu 2007; Takemura i wsp. 2013; Zhao i wsp. 2013; Niwa i wsp. 2015; Vilčková i wsp. 2023).

CYP2C9 metabolizuje leki należące do grup takich jak: niesteroidowe leki przeciwzapalne, leki przeciwcukrzycowe, przeciwnadciśnieniowe, przeciwpadaczkowe, przeciwzkrzepowe. CYP2C9 wykazuje znaczną zmienność genetyczną i jest

pierwszym ludzkim enzymem CYP, dla którego uzyskano strukturę krystaliczną (Williams i wsp. 2003; Rettie i Jones 2005).

CYP2D6 stanowi tylko 5% w puli wątrobowych enzymów CYP, jednak odpowiada za metabolizm około 20% leków wydawanych na receptę (Zanger i wsp. 2008; Song i wsp. 2021). Do najważniejszych grup leków metabolizowanych przez CYP2D6 należą: β -adrenolityki, opioidy, leki przeciwwarytmiczne, przeciwdepresyjne, przeciw nadciśnieniu, przeciwpsychotyczne (Haufroid i Hantson 2015; Eap i wsp. 2025). CYP2D6 charakteryzuje się wysokim polimorfizmem genetycznym oraz dużą zmiennością wariantów CYP2D6 w skali globalnej pomiędzy różnymi rasami, populacjami i grupami etnicznymi (Frederiksen 2023; Kehinde i wsp. 2023).

Najwięcej leków jest metabolizowane przez CYP3A4, który wykazuje dwukrotnie wyższą ekspresję u kobiet aniżeli u mężczyzn (Wolbold i wsp. 2003). Aktywność CYP3A4 wykazuje znaczną zmienność międzyosobniczą wynikającą z czynników genetycznych oraz pozagenetycznych, jednocześnie enzym ten jest źródłem wielu interakcji pomiędzy lekami. Czynniki te wpływają na ryzyko działań niepożądanych, zwłaszcza w przypadku leków o wąskim oknie terapeutycznym, jak na przykład leki przeciwnowotworowe (Wang i wsp. 2023). Obok leków przeciwnowotworowych, do substratów CYP3A4 należą następujące grupy leków: antybiotyki makrolidowe, benzodiazepiny, blokery kanału wapniowego, leki immunosupresyjne, przeciwdepresyjne, przeciwpsychotyczne, przeciwguźlicze, przeciwgrzybicze, przeciwwirusowe oraz statyny (Bu 2006; Zhou 2008).

Enzymy z rodzin CYP1–3 obok metabolizmu ksenobiotyków są zaangażowane również w metabolizm związków endogennych, takich jak kwas arachidonowy, hormony steroidowe czy przekąźniki monoaminergiczne (Rifkind i wsp. 1995; Hiroi i wsp. 1998, 2001; Lu i wsp. 2020), jednakże większą specjalizację w tym zakresie wykazują enzymy przyporządkowane do rodzin CYP4–51. Wśród wszystkich enzymów CYP najbardziej unikalny jest CYP51A1, uważany za jeden z najstarszych enzymów w tej nadrodzinie, który występuje we wszystkich królestwach żywych organizmów i charakteryzuje się wysoką stabilnością ewolucyjną ze względu na swoją fundamentalną rolę w syntezie steroli. Mutacje w obrębie sekwencji kodującej *CYP51A1* powiązane z występowaniem nadciśnienia tętniczego, niewydolności wątroby, opóźnienia w rozwoju oraz zaćmy dziecięcej. Wykazano również, że

wyłączenie *Cyp51a1* u myszy powodowało śmierć w 15 dniu życia zarodkowego (Režen i wsp. 2017; Hargrove i wsp. 2020). CYP11A1 uczestniczy w przekształcaniu cholesterolu w pregnenolon, który jest prekursorem hormonów steroidowych, co jest kluczowe dla właściwej funkcji jajników oraz prawidłowego przebiegu ciąży u ssaków. Upośledzoną aktywność CYP11A1 powiązano z zaburzeniami rozrodczymi (Hu i wsp. 2004; Chatuphonprasert i wsp. 2018; Guo i wsp. 2024). CYP19A1 przekształca androgeny do estrogenów, a aktywność tego enzymu została powiązana z determinacją i różnicowaniem płci (Nakamura 2010; Matsumoto i wsp. 2013; Tachibana 2016). Wykazano, iż CYP19A1 pełni ważną funkcję w patogenezie niektórych nowotworów, takich jak rak piersi, jelita grubego czy żołądka, a jednocześnie zmienność genetyczna *CYP19A1* może stanowić czynnik predykcji podatności na określone nowotwory, jak również wpływać na odpowiedź organizmu pacjenta na leczenie (Barros-Oliveira i wsp. 2021; Chen i wsp. 2022; Zhang i wsp. 2022; Zhou i wsp. 2023; Wang i wsp. 2024, 2025). Enzymy cytochromu są również zaangażowane w metabolizm witamin lub ich pochodnych: witaminy D (CYP2R1, CYP3A4, CYP24A1, CYP27A1, CYP27B1), witaminy E (CYP3A4, CYP4F2), czy kwasu retinowego będącego pochodną witaminy A (CYP26A1, CYP26B1) (Nebert i Russell 2002; Brigelius-Flohé 2019; Ben-Eltriki i wsp. 2024; Uga i wsp. 2024). CYP7A1 uczestniczy w biosyntezie kwasów żółciowych, a zmiany aktywności tego enzymu powiązano z hipercholesterolemią, kamicią żółciową i zaburzeniami metabolicznymi (Lorbek i wsp. 2012). Z kolei CYP5A1 katalizuje przekształcenie prostaglandyny H₂ w tromboksan A₂, co ma znaczenie w kontekście tworzenia skrzepów krwi oraz napięcia naczyń krwionośnych, a zaburzenie aktywności tego enzymu odgrywa rolę w chorobach sercowo-naczyniowych (Li i wsp. 2008). Innym ważnym enzymem jest CYP46A1, który katalizuje reakcję 24-hydroksylacji cholesterolu, umożliwiając utrzymanie homeostazy cholesterolu w mózgu. Zaburzenie równowagi metabolizmu cholesterolu w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) powiązano z chorobami neurodegeneracyjnymi, takimi jak Parkinson czy Alzheimer (Djelti i wsp. 2015).

1.3 Różnice pomiędzy człowiekiem i szczurem

Podobnie jak u człowieka, również i u szczura enzymy CYP odpowiadają za oksydacyjny metabolizm wielu, strukturalnie różnych związków endogennych i egzogennych. W szczurzej wątrobie występują i odgrywają ważną funkcję rodziny

enzymów CYP, które znajdują się w centrum zainteresowania w aspekcie metabolizmu ksenobiotyków u ludzi, takie jak CYP1A, CYP2A, CYP2B, CYP2C, CYP2D, CYP2E i CYP3A. Badania wykazały, iż homologia sekwencji aminokwasowych szczurzych odpowiedników konkretnych ludzkich enzymów CYP wynosi około 70–80%, co przedstawiono w tabeli 2 (Martignoni i wsp. 2006; Nishimuta i wsp. 2013; Wójcikowski i wsp. 2013; Su i wsp. 2014; Shah i wsp. 2018). Podobieństwa/różnice sekwencji aminokwasów w centrum aktywnym enzymu wydają się bardziej istotne pod względem funkcjonalnym (Funae i wsp. 2003).

Tabela 2. Szczurze ortologii ludzkich enzymów CYP metabolizujących ksenobiotyki (Martignoni i wsp. 2006; Nishimuta i wsp. 2013; Wójcikowski i wsp. 2013; Su i wsp. 2014; Shah i wsp. 2018).

Ludzki enzym CYP	Szczurze ortologii	Homologia sekwencji aminokwasowej
CYP1A2	CYP1A2	~80%
CYP2A6	CYP2A1, CYP2A2	~60%
CYP2B6	CYP2B1, CYP2B2	>75%
CYP2C8	CYP2C23	~70%
CYP2C9	CYP2C6, CYP2C11, CYP2C12	~75%
CYP2C19	CYP2C6, CYP2C7	~70%
CYP2D6	CYP2D 1–5, CYP2D18	>70%
CYP2E1	CYP2E1	~80%
CYP3A4/5	CYP3A1, CYP3A2	>72%

Oba gatunki wykorzystują enzymy cytochromu P450 do biotransformacji podobnych substratów, jednakże konkretne szlaki metaboliczne mogą się różnić, zatem specyficzność wobec metabolizowanych substratów również dostarcza cennych informacji o różnicach i podobieństwach pomiędzy gatunkami. I tak enzym CYP1A2 metabolizuje kofeinę, fenacetynę czy teofilinę, zarówno u człowieka jak i szczura. Jednakże omeprazol, który indukuje ludzki CYP1A2, nie ma takiego działania u szczura (Westerink i wsp. 2008; Zhou i wsp. 2010).

Enzymy z podrodziny CYP2C metabolizują szereg znanych substratów, do których należą celekoksyb, diklofenak, fenytoina, tolbutamid czy warfaryna, jak

również endogenne związki, takie jak kwas arachidonowy, retinoidy czy steroidy (Zhou i wsp. 2009). W badaniu Zhan i wsp. wykazano, iż wortioksetyna, która jest stosowana jako lek przeciwdepresyjny, wykazywała znacznie silniejsze hamowanie aktywności enzymów podrodziny CYP2C oraz inny typ inhibicji w szczurzych mikrosomach wątrobowych w stosunku do ludzkich mikrosomów wątrobowych (Zhan i wsp. 2023). Interesującym zagadnieniem u szczura jest wyraźny dymorfizm płciowy, gdzie samce wykazują ekspresję CYP2C11, a samice ekspresję CYP2C12.

U człowieka również obserwuje się pewnie zmiany w aktywności enzymatycznej wynikające z wpływu czynników środowiskowych, wieku czy poziomu hormonów, jednakże ludzkie enzymy CYP nie wykazują tak wyraźnie zależnej od płci ekspresji (Gerges i El-Kadi 2023; Basińska-Ziobroń i wsp. 2025). Szczurze i ludzkie enzymy podrodziny CYP3A metabolizują cyklosporynę, nifedypinę, midazolam, czy testosteron (Li i wsp. 1995; Kadono i wsp. 2014). Natomiast rifampicyna, która jest induktorem ludzkiego enzymu CYP3A4, nie wywiera takiego efektu na szczurzy enzym CYP3A1 (Zuber i wsp. 2002). Zarówno ludzki enzym CYP2D6, jak i jego szczurze ortologii metabolizują bufuralol, deksztrometorfan czy propranolol (Hiroi i wsp. 2002). Chinidyna jest inhibitorem ludzkiego CYP2D6, natomiast u szczura obserwuje się dużo słabszy wpływ chinidyny na CYP2D1, a z kolei chinina (izomer chinidyny) wywiera silny efekt na szczurze enzymy CYP2D (Boobis i wsp. 1990).

Mimo różnic występujących między szczurem a człowiekiem, szczury stanowią bardzo interesujący i przydatny model eksperymentalny w zakresie badań podstawowych. Obok szczurów, również myszy są stosunkowo często wykorzystywanym modelem w zakresie badań nad enzymami CYP, jednakże w przypadku procedur eksperymentalnych wymagających zabiegów chirurgicznych szczur często jest modelem z wyboru.

2. Fizjologiczna regulacja cytochromu P450 w wątrobie

Na aktywność enzymów cytochromu P450 wpływają różne czynniki, takie jak wiek, dieta, ksenobiotyki czy choroby. Jednak równie ważne jest szczegółowe zbadanie fizjologicznej regulacji enzymów CYP, co w sposób istotny przyczynia się do zrozumienia wpływu innych czynników. Początkowo badania nad fizjologiczną regulacją cytochromu P450 koncentrowały się na poziomie wątroby, biorąc pod uwagę udział hormonów i egzogennych ligandów w aktywacji receptorów błonowych,

cytoplazmatycznych i jądrowych regulujących ekspresję cytochromu P450. Jednakże wydzielanie hormonów pozostaje pod kontrolą układu nerwowego, dlatego w ciągu ostatnich dwóch dekad prowadzono badania nad udziałem różnych układów neuroprzekaznikowych – dopaminergicznego, noradrenergicznego i serotonergicznego – w regulacji ekspresji i aktywności enzymów cytochromu P450 w wątrobie.

2.1 Regulacja na poziomie molekularnym

Regulacja transkrypcji genów *CYP* odbywa się poprzez aktywację odpowiednich receptorów błonowych, cytoplazmatycznych i jądrowych, dla których ligandami są endogenne hormony lub ksenobiotyki. Do najważniejszych czynników transkrypcyjnych, których ligandami są hormony, zalicza się:

- receptor hormonu wzrostu (GHR – ang. *growth hormone receptor*)
- receptor glikokortykoidowy (GR – ang. *glucocorticoid receptor*)
- receptor hormonu tarczycy (THR – ang. *thyroid hormone receptor*).

Głównymi czynnikami transkrypcyjnymi, dla których ligandami są zarówno substancje endogenne, jak i ksenobiotyki (tzw. ksenoreceptory), są:

- receptor węglowodorów aromatycznych (AhR – ang. *aromatic hydrocarbon receptor*)
- konstytutywny receptor androstanu (CAR – ang. *constitutive androstane receptor*)
- receptor pregnanu X (PXR – ang. *pregnane X receptor*).

Związanie hormonu wzrostu (GH – ang. *growth hormone*) z receptorem GHR, aktywuje kinazę JAK2 (ang. *Janus kinase 2*) związaną z receptorem, prowadząc do fosforylacji GHR i zmiany jego konformacji, która umożliwia przyłączenie czynnika transkrypcyjnego STAT5b (ang. *signal transducer and activator of transcription 5*) i jego fosforylację przez JAK2, co w konsekwencji prowadzi do dimeryzacji STAT5b, a następnie do translokacji dimeru do jądra komórkowego (Choi i Waxman 2000; Waxman i O'Connor 2006). W jądrze komórkowym powstały homodimer wiąże się do odpowiednich miejsc na DNA, regulując ekspresję wybranych genów, w tym genów *CYP*. U szczurów, najważniejszymi enzymami cytochromu P450 regulowanymi przez

hormon wzrostu są CYP2C11 (samce) i CYP2C12 (samice). Badania wykazały, że w wątrobie szczurzych samców czynnik STAT5b ulega gwałtownej aktywacji w odpowiedzi na wydzielenie GH do krwi, natomiast u samic jego aktywność jest stabilna, lecz niska (Waxman i O'Connor 2006; Laz i wsp. 2009), co koreluje z zależnym od płci wzorcem sekrecji GH (pulsacyjnym u samców i ciągłym u samic). Jednocześnie przypuszcza się, że stałe wydzielanie GH u szczurzych samic może zachodzić przez stymulację fosfolipazy A2, inicjującej kaskadę kwasu arachidonowego, co prowadzi do indukcji ekspresji CYP2C12 (Gonzalez i Lee 1996). Innymi czynnikami transkrypcyjnymi, które uczestniczą w sygnalizacji wewnątrzkomórkowej regulowanej przez hormon wzrostu są C/EBP (ang. *CCAAT/enhancer-binding protein*) i HNF1/3/4/6 (ang. *hepatic nuclear factor*) (Li i wsp. 2015).

Glikokortykosteroidy, takie jak kortyzol u człowieka czy kortykosteron u szczura, wiążą się z receptorem glikokortykoidowym (GR), ale ich wysokie stężenia powodują również indukcję tzw. ksenoreceptorów, czyli receptora węglowodorów aromatycznych (AhR), konstytutywnego receptora androstanu (CAR) oraz receptora pregnanu X (PXR) (Honkakoski i Negishi 2000; Gibson i wsp. 2002; Pascussi i wsp. 2008). W przypadku receptora GR, po związaniu ligandu następuje przemieszczenie do jądra komórkowego, gdzie kompleks ten tworzy homodimer, który wiąże się z sekwencją GRE (ang. *glucocorticoid responsive element*) na DNA, co skutkuje regulacją ekspresji genów docelowych (Schuetz i wsp. 1984). Występowanie sekwencji GRE stwierdzono w genach kodujących enzymy z rodzin CYP2B, CYP2C i CYP3A (Pavek i Dvorak 2008).

Receptor hormonu tarczycy, należący do nadrodziny steroidowych receptorów jądrowych (NR – ang. *nuclear receptor*), występuje w dwóch izoformach THR α i THR β (Rehman i wsp. 2023), tworząc heterodimery z jądrowym receptorem X retinoidów (RXR – ang. *retinoid X receptor*), które są zaangażowane w regulację niektórych enzymów cytochromu P450 (Brtko i Dvorak 2011). Receptory hormonów tarczycy, tworzące kompleks z białkami hamującymi transkrypcję, wiążą się w obszarze sekwencji TRE (ang. *thyroid hormone responsive element*) na DNA. Przyłączenie ligandu, takiego jak trójiodotyronina (T₃) lub tyroksyna (T₄), powoduje, że kompleks ten ulega dysocjacji, a w efekcie uruchamia ekspresję genów. Natomiast badania fizjologiczne i biochemiczne *in vivo* przeprowadzone na ochotnikach ludzkich oraz na

szczurach pozbawionych przysadki mózgowej lub tarczycy, a także badania *in vitro* z użyciem szczurzych lub ludzkich hepatocytów wskazują, że hormony tarczycy mogą wpływać negatywnie na ekspresję i aktywność wielu enzymów cytochromu P450 należących do podrodzin CYP1A, CYP2A, CYP2B, CYP2C, CYP3A i CYP8B1 (Yamazoe i wsp. 1989; Waxman i wsp. 1990; Yamazoe i wsp. 1990; Murayama i wsp. 1991; Liddle i wsp. 1992; Anderson i wsp. 1999; Takahashi i wsp. 2010). Obserwowane efekty zależą od gatunku, płci, enzymu CYP, poziomu T₃/T₄ i mogą wynikać z wpływu hormonów tarczycy na sekrecję innych hormonów regulujących enzymy CYP lub być efektem działania na ekspresję genów *CYP* na poziomie hepatocytu. Mogą one być także wynikiem wpływu hormonu tarczycy na syntezę i degradację hemu, istotnego komponentu cytochromu P450 posiadającego strukturę hemoproteiny (Smith i Drummond 1988).

Receptor węglowodorów aromatycznych (AhR) w postaci nieaktywnej tworzy kompleks z białkami opiekuńczymi (Larigot i wsp. 2018). Ligand, np. w postaci wielopierścieniowego węglowodoru aromatycznego, wymusza zmianę konformacyjną, która umożliwia translokację do jądra komórkowego, gdzie tworzy kompleks z białkiem ARNT (ang. *aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*). Powstały aktywny czynnik transkrypcyjny wiąże się następnie do sekwencji XRE (ang. *xenobiotic response element*) na DNA (Hankinson 1995; Kou i Dai 2021), co wywołuje ekspresję genów *CYP*. AhR i enzymy cytochromu P450 są wzajemnie powiązane poprzez mechanizm sprzężenia zwrotnego. Enzymy cytochromu P450 metabolizują ligandy AhR, co tworzy pętlę regulacyjną, która moduluje aktywność AhR (Chiaro i wsp. 2007; Larigot i wsp. 2018). Ponieważ AhR jest zaangażowany w procesy odpowiedzi immunologicznej, zaburzenie regulacji szlaku AhR-CYP1 jest kojarzone z chorobami zapalnymi oraz nowotworowymi (Riaz i wsp. 2022; Bahman i wsp. 2024). Przypuszcza się, że szlak AhR-CYP1 może mieć związek z ochroną organizmu przed infekcjami (Xu i wsp. 2024).

Konstrytuwny receptor androstanu (CAR) pozostaje aktywny również pod nieobecność ligandu, choć obecność agonistów i antagonistów moduluje jego funkcję. Przemieszczenie CAR do jądra komórkowego następuje wskutek oddysocjowania białek pomocniczych i dimeryzacji z RXR (Yang i Wang 2014). Do agonistów CAR zalicza się CITCO, pochodną imidazo[1,2-a]pirydiny (Mejdrová i wsp. 2023), a do

agonistów odwrotnych androstenol i androstanol (Yang i Wang 2014). CAR pośredniczy w indukcji enzymów z rodzin CYP2B i CYP3A, u człowieka głównie CYP2B6 (Lynch i wsp. 2013). Jednocześnie CAR wpływa na utrzymanie homeostazy lipidów oraz glukozy, wpływając na metabolizm endogennych substancji zależnych od enzymów cytochromu P450, takich jak kwasy żółciowe czy steroidy (Stern i wsp. 2022).

Receptor pregnanu X (PXR) po związaniu z ligandem i oddysocjowaniu białek pomocniczych jest przemieszczany do jądra komórkowego, gdzie podobnie jak CAR tworzy heterodimer z RXR. Heterodimer PXR-RXR wiąże się ze specyficznymi sekwencjami DNA w promotorach genów docelowych, prowadząc tym samym do ich aktywacji transkrypcyjnej (Ma i wsp. 2008). PXR może być aktywowany przez wiele różnych substancji, zarówno endogennych, jak i egzogennych, takich jak steroidy i kwasy żółciowe, ale też antybiotyki (Kliewer i wsp. 2002). Pobudzenie receptora PXR prowadzi do indukcji enzymów cytochromu P450 z podrodzin CYP2B, CYP2C i CYP3A (Smutny i wsp. 2013). Jednocześnie PXR reguluje także ekspresję enzymów II fazy metabolizmu leków (Ramanjulu i wsp. 2021).

Na ekspresję enzymów cytochromu P450 mogą wpływać także cytokiny, poprzez różne ścieżki regulacyjne, oddziałując na procesy transkrypcji, modyfikacje potranslacyjne, jak również oddziałując ze szlakami hormonalnymi. Wykazano, iż aktywacja wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych MAPK (ang. *mitogen-activated protein kinases*), PI3K (ang. *phosphoinositide 3-kinase*), JAK-STAT (ang. *Janus kinase-signal transducer and activator of transcription*) i czynnika NF- κ B (ang. *nuclear factor kappa B*) poprzez cytokiny IL-1 β , IL-4, IL-6, TNF- α (ang. *tumor necrosis factor alpha*) oraz IFN- γ (ang. *interferon gamma*), wiąże się na przykład ze zmianą poziomu kompleksów RXR/receptor jądrowy, a w konsekwencji wpływa na transkrypcję genów *CYP* (Abdel-Razzak i wsp. 1993; Wang i wsp. 2022). W badaniu Abdulla i wsp. (Abdulla i wsp. 2005) iniekcja lipopolisacharydu – bakteryjnej endotoksyny – do komór mózgu szczura, spowodowała zwiększenie poziomu cytokin w mózgu oraz wzrost ekspresji TNF- α i inhibitora kappa B-alfa w wątrobie, którym towarzyszyło obniżenie ekspresji enzymów CYP2D1/5, CYP2B1/2 oraz CYP1A1. Cytokiny mogą również wpływać na regulację hormonalną cytochromu P450. Na przykład, IL-6 oddziałuje na sygnalizację GH poprzez zmianę właściwości

heterodimerów STAT, modulując w ten sposób regulację ekspresji enzymów CYP (Wang i wsp. 2022).

2.2 Regulacja na poziomie obwodowym

Regulacja aktywności enzymów cytochromu P450 pozostaje pod kontrolą osi:

- podwzgórze–przysadka–nadnercza
- podwzgórze–przysadka–tarczyca
- podwzgórze–przysadka–wątroba.

Oś podwzgórze–przysadka–nadnercza reguluje poziomy glikokortykosteroidów w tkankach, kortyzolu u ludzi lub kortykosteronu u szczurów, które są wydzielane przez korę nadnerczy, co jest zależne od przysadkowego hormonu adrenokortykotropowego (ACTH – ang. *adrenocorticotropic hormone*), którego sekrecja podlega regulacji przez podwzgórzowy hormon uwalniający kortykotropinę (CRH – ang. *corticotropin-releasing hormone*) (Burford i wsp. 2017). Wydzielanie kortyzolu u ludzi przebiega zgodnie z rytmem dobowym, najwyższe stężenie osiągnęte jest wkrótce po przebudzeniu, co wspomaga czujność i aktywność metaboliczną, następnie stężenie kortyzolu we krwi spada osiągając najniższy poziom między 2:00 a 4:00 godziną rano (Chan i Debono 2010; Mohd Azmi i wsp. 2021). Literatura naukowa nie wykazuje większych różnic w poziomie kortyzolu między płciami (Díaz-Mardomingo i wsp. 2023; Teo i wsp. 2023), natomiast czynniki stresowe o charakterze psychologicznym powodują u mężczyzn znacznie wyższy wyrzut kortyzolu aniżeli u kobiet. Różnice te są znacznie mniejsze, jeśli dotyczą stresu o charakterze niepsychologicznym (Kirschbaum i wsp. 1992). U szczurów z kolei kortykosteron osiąga najwyższe stężenie w fazie aktywnej, która przypada w nocy, natomiast najniższy poziom w ciągu dnia w fazie nieaktywnej (Yao i wsp. 2006). Jednocześnie, podobnie jak u ludzi, wyraźniejszy wzrost wydzielania kortykosteronu w odpowiedzi na stres psychologiczny występuje u samców w porównaniu do samic (Mohawk i wsp. 2007). Wpływ glikokortykosteroidów na ekspresję enzymów cytochromu P450 jest wieloaspektowy i obejmuje regulację transkrypcyjną, interakcje z różnymi szlakami hormonalnymi, a także modulację ścieżek zapalnych. Poprzez receptor GR glikokortykosteroidy regulują bezpośrednio geny *CYP2A*, *CYP2B*, *CYP2C* i *CYP3A* (Honkakoski i Negishi 2000; Gibson i wsp. 2002). W regulacji enzymów

podrodziny CYP3A poza receptorem GR, znaczenie mają również receptory PXR i CAR, których ekspresja jest regulowana przez glikokortykosteroidy (Pascussi i wsp. 2003, 2004). U zwierząt niski poziom kortykosteronu indukuje ekspresję CYP2C11, natomiast wysoki hamuje ją, w czym pośredniczą receptory GR. Podobny efekt zaobserwowano po podaniu syntetycznego glikokortykosteroidu – deksametazonu (Iber i wsp. 1997). Regulacja CYP1A zachodzi z kolei głównie poprzez receptor AhR, indukując ekspresję szczurzego CYP1A1/2 i ludzkiego CYP1A2, lecz nie CYP1A1 (Monostory i wsp. 2005; Monostory i Dvorak 2011). Ponadto, glikokortykosteroidy wiążą się do elementu GRE w obrębie genów *CYP1A*, wpływając pozytywnie na transkrypcję (Monostory i wsp. 2009).

Oś podwzgórze–przysadka–tarczyca kontroluje poziom hormonów tarczycy: trójiodotyroniny – T_3 i tyroksyny – T_4 , których sekrecja jest zależna od wydzielanej z przysadki tyreotropiny (TSH – ang. *thyroid-stimulating hormone*), podlegającej kontroli podwzgórzowej tyreoliberyny (TRH – ang. *thyrotropin-releasing hormone*). Hormon TSH wykazuje cykliczne zmiany w ciągu doby – najwyższe wartości obserwuje się na początku snu, a najniższe w godzinach popołudniowych. Wzmocniona nocna produkcja TSH pobudza wydzielanie T_3 i T_4 po przebudzeniu, a następnie ich stężenie stopniowo maleje w ciągu dnia (Fisher 1996). Poziom TSH u kobiet jest wyższy niż u mężczyzn, co może być efektem wpływu hormonów takich jak estrogen (Shinkov i wsp. 2014; Yang i Cao 2022). Jednocześnie w okresach stresu poziom hormonów tarczycy u kobiet może wahać się w większym stopniu, aniżeli u mężczyzn (Zhao i wsp. 2023). U szczurów z kolei większy wpływ na wydzielanie hormonów tarczycy ma testosteron niż estrogen. Rytm dobowy TSH jest niezależny od sprzężenia zwrotnego hormonów T_3 i T_4 , lecz w pewnym stopniu podlega bodźcom takim jak pory karmienia (Stringer i wsp. 1981). Literatura naukowa wykazuje, iż hormony tarczycy negatywnie wpływają na regulację enzymów CYP1A, CYP2A, CYP2B oraz CYP3A (Yamazoe i wsp. 1989; Waxman i wsp. 1990). W badaniach na ludziach oraz ludzkich hepatocytach obserwowano obniżenie aktywności enzymu CYP3A4 pod wpływem T_3 ; w hodowli hepatocytów stwierdzono również spadek poziomu białka oraz mRNA tego enzymu (Liddle i wsp. 1998; Takahashi i wsp. 2010). Uważa się, iż enzymy CYP3A podlegają regulacji przez hormony tarczycy w podobnym stopniu co przez hormon wzrostu i glikokortykoidy (Liddle i wsp. 1998). Stwierdzono również, iż deplecja hormonów tarczycy zmniejsza aktywność reduktazy cytochromu P450 zależnej od

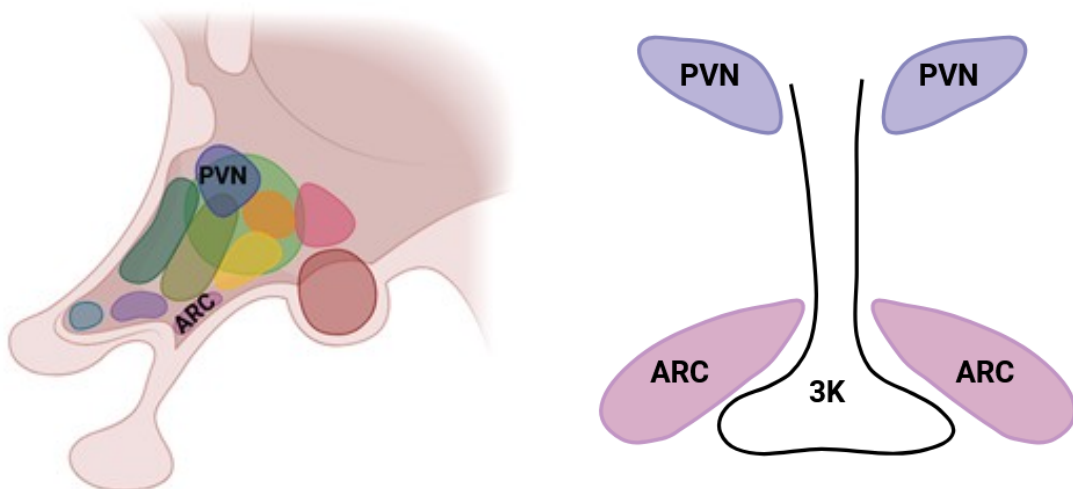
NADPH, która jest kluczowa dla enzymów cytochromu P450, a podanie T₃ lub T₄ przywraca aktywność reduktazy (Ram i Waxman 1992).

Oś podwzgórze–przysadka–wątroba odpowiada za wydzielanie hormonu wzrostu (GH) z przedniego płata przysadki mózgowej oraz jego oddziaływanie na procesy transkrypcji w wątrobie. Wydzielanie GH jest zależne od podwzgórzowych peptydów: somatostatyny (SRIH – ang. *somatotropin release-inhibiting hormone*) i somatoliberyny (GHRH – ang. *growth hormone-releasing hormone*). Somatostatyna reguluje sekrecję hormonu wzrostu negatywnie, natomiast somatoliberyna pozytywnie. Jednocześnie wydzielanie hormonu wzrostu jest zależne od czynników takich jak płeć czy gatunek. U szczurzych samców sekrecja hormonu wzrostu wykazuje wyraźny pulsacyjny wzorec co 3–4 godziny o wysokiej amplitudzie. Szczurze samice natomiast charakteryzują się złożonym profilem wydzielania hormonu wzrostu z impulsami co 1–2 godziny i niższą amplitudą niż u samców, z prawie ciągłym wydzielaniem GH w ciągu dnia, co skutkuje stosunkowo stałym poziomem GH w krążeniu, jednak w porze nocnej wzorec uwalniania staje się szybszy i wysoce pulsacyjny (O’Sullivan i wsp. 1986; Clark i wsp. 1987; Pincus i wsp. 1996). U szczurzych osobników męskich pulsacyjna sekrecja hormonu wzrostu stymuluje ekspresję enzymu CYP2C11, natomiast u szczurzych osobników żeńskich bardziej ciągłe wydzielanie GH pobudza ekspresję enzymu CYP2C12 (Zaphiropoulos i wsp. 1989; Agrawal i Shapiro 2000; Pampori i wsp. 2001; Waxman i O’Connor 2006). Zaobserwowano również, iż zakłócenie pulsacyjnego wydzielania GH u samców szczurów tłumi produkcję specyficznych dla samców enzymów cytochromu P450, a indukuje enzymy żeńskie, co stwierdza się także u starzejących się samców szczurów, które wraz z wiekiem tracą epizodyczny wzorec sekrecji GH (Dhir i Shapiro 2003). Podobnie u ludzi obserwuje się różny poziom hormonu wzrostu w zależności od płci. Sekrecja GH charakteryzuje się nocnym szczytem, a różnice między płciami wynikają z dynamiki podwzgórzowych hormonów somatostatyny i somatoliberyny oraz modulującego wpływu estrogeny na przysadkę (Schaub i wsp. 1980; Jaffe i wsp. 1995; Farhy i wsp. 2007). Bardziej regularne wydzielanie hormonu wzrostu obserwuje się u mężczyzn, zaś u kobiet sekrecja hormonu wzrostu jest nieregularna i o większej amplitudzie (Pincus i wsp. 1996). U człowieka GH wpływa na ekspresję enzymów CYP2B6 i CYP3A4 (Lamba i wsp. 2003; Dhir i wsp. 2006). Ponadto na sekrecję GH mogą wpływać też glikokortykoidy, zależnie od stężenia. Fizjologiczne stężenie glikokortykoidów pobudza syntezę

receptorów dla GHRH oraz inicjuje ekspresję genu *GH*. Natomiast wysokie stężenie glikokortykoidów powoduje zwiększenie uwalniania podwzgórzowej somatostatyny, obniżając tym samym wydzielanie GH (Devesa i wsp. 1995; Miller i Mayo 1997). Innym ważnym czynnikiem wpływającym na wydzielanie GH są hormony płciowe, takie jak testosteron czy estrogeny, oddziałujące na poziomie podwzgórza i przysadki (Zaphiropoulos i wsp. 1989).

2.3 Neuroendokrynną regulacja na poziomie mózgu

Z poziomu mózgu, kontrolę neuroendokrynną nad sekrecją hormonów w organizmie pełni podwzgórze. Podwzgórze zawiera liczne jądra, odpowiadające za regulację kluczowych funkcji fizjologicznych organizmu. W aspekcie regulacji endokrynej cytochromu P450 najważniejszą rolę odgrywają jądra łukowate ARC (ang. *arcuate nucleus*) oraz przykomorowe PVN (ang. *paraventricular nucleus*), których lokalizację przedstawiono na rycinie 1. W PVN wytwarzane są: CRH, TRH oraz SRIH, natomiast GHRH pochodzi głównie z ARC (Lechan i Toni 2000).



Rycina 1. Lokalizacja jąder łukowatego (ARC) i przykomorowego (PVN) w podwzgórzu, oraz względem trzeciej komory mózgu (3K) (na podstawie Tran i wsp. 2022; Makrygianni i Chrousos 2023).

Hormony podwzgórzowe, po wydzieleniu w obszarze wyniosłości przyśrodkowej, docierają do przedniego płata przysadki mózgowej poprzez wrotny układ naczyniowy, wpływając na sekrecję hormonów przysadkowych. Bogato unerwione podwzgórze jest łącznikiem pomiędzy układem nerwowym i hormonalnym, stanowiąc tym samym

najwyższy poziom kontroli neuroendokrynej enzymów cytochromu P450 (Müller 1989; McMahon i wsp. 2001; Wójcikowski i Daniel 2011). Literatura naukowa dostarcza informacji na temat wpływu układów monoaminergicznych mózgu dopaminergicznego (Wójcikowski i wsp. 2007, 2008; Wójcikowski i Daniel 2009), noradrenergicznego (Kot i Daniel 2011; Bromek i wsp. 2013; Sadakierska-Chudy i wsp. 2013; Kot i wsp. 2015) i serotonergicznego (Rysz i wsp. 2015, 2016a, 2016b) – w aspekcie regulacji cytochromu P450 w wątrobie.

Po raz pierwszy wpływ układu dopaminergicznego na regulację cytochromu P450 w wątrobie przedstawiono w pracy Wójcikowski i wsp., gdzie obserwowano wpływ uszkodzeń szlaków dopaminergicznych: guzowo-lejkowego, czarno-prążkowiowego i mezolimbicznego na poziom i aktywność enzymów CYP w wątrobie szczura (Wójcikowski i wsp. 2007). Badacze wykazali, że uszkodzenie szlaku guzowo-lejkowego zmniejszyło poziom i aktywność enzymów CYP2B, CYP2C11 i CYP3A oraz spowodowało wzrost aktywności i poziomu białka CYP1A. Podobne zmiany dla enzymów CYP1A oraz CYP3A obserwowano po uszkodzeniu szlaku mezolimbicznego, natomiast uszkodzenie szlaku czarno-prążkowiowego nie wykazało istotnych zmian. W kolejnym badaniu Wójcikowski i wsp. zbadali wpływ aktywacji dopaminergicznych szlaków: guzowo-lejkowego oraz mezolimbicznego na enzymy cytochromu P450 w wątrobie szczura (Wójcikowski i wsp. 2008). W celu aktywacji szlaku guzowo-lejkowego zastosowano dootrzewnowe podania dopaminy (agonista receptorów D₁/D₂), natomiast do pobudzenia szlaku mezolimbicznego przeprowadzono lokalne iniekcje apomorfiny (nieselektywny agonista receptorów D₁/D₂) lub amfetaminy (pośredni dopaminomimetyk). Aktywacja obu szlaków doprowadziła do uzyskania odwrotnych zmian w aktywności i poziomach wybranych enzymów cytochromu P450 w wątrobie, w stosunku do wyników, które uzyskano po uszkodzeniu tychże szlaków. Jednocześnie stwierdzono zmiany w poziomach hormonów: aktywacji szlaku guzowo-lejkowego towarzyszył wzrost poziomu GH oraz obniżenie poziomu T₃. Natomiast w przypadku aktywacji szlaku mezolimbicznego stwierdzono wzrost poziomu kortykosteronu oraz obniżenie poziomu T₃. Uważa się, iż w aspekcie zaangażowania szlaków dopaminergicznych w neuroendokrynną regulację cytochromu P450, główną rolę odgrywają receptory D₂ przysadki mózgowej oraz jądra półleżącego przegrody (Wójcikowski i Daniel 2009).

Potencjalne zaangażowanie układu noradrenergicznego w regulację wątrobowych enzymów cytochromu P450 wykazano w pracy Kot i Daniel (Kot i Daniel 2011). Zaobserwowano, iż dootrzewnowe podanie szczurom DSP-4 (N-(2-chloroetylo)-N-etylo-2-bromobenzylamina), neurotoksyny specyficznej dla układu noradrenergicznego, które wywołało spadek poziomu noradrenaliny w mózgu, spowodowało obniżenie aktywności enzymów CYP2B, CYP2C11 i CYP3A oraz podwyższenie aktywności CYP1A w wątrobie. Uzyskane wyniki potwierdzono w badaniu Sadakierska-Chudy i wsp. (Sadakierska-Chudy i wsp. 2013), w którym badacze tą samą toksynę podali do komór bocznych mózgu szczura, w wyniku czego zaobserwowano obniżenie aktywności enzymów CYP2C11 i CYP3A (lecz nie CYP2B), a podwyższenie aktywności CYP1A w wątrobie. Podobne wyniki uzyskano w poziomie białka powyższych enzymów cytochromu P450. Jednocześnie stwierdzono zmiany w poziomach hormonów: obniżenie poziomu GH, T₄ i testosteronu, a wzrost stężenia kortykosteronu. W badaniu przeprowadzonym przez Bromek i wsp. (Bromek i wsp. 2013) neurotoksynę DSP-4 podano lokalnie do PVN lub ARC, które spowodowało selektywne obniżenie poziomu noradrenaliny w tych strukturach. Podaniu DSP-4 do PVN towarzyszył wzrost aktywności i poziomu białka enzymów CYP2C11 i CYP3A w wątrobie (CYP1A bez zmian) oraz wzrost stężenia GH. Natomiast podanie DSP-4 do ARC wywołało obniżenie aktywności CYP2C11 oraz zauważalny spadek poziomu białka i stężenia GH. Podobną tendencję zaobserwowano w przypadku CYP3A. W pracy Kot i wsp. (Kot i wsp. 2015) zbadano rolę grzbietowego szlaku noradrenergicznego w regulacji cytochromu P450 w wątrobie poprzez lokalne podanie neurotoksyny 6-hydroksydopaminy do miejsca sinawego, które spowodowało obniżenie poziomu noradrenaliny mózgu szczura. Towarzyszył temu wzrost aktywności i poziomu białka CYP2C11 oraz aktywności CYP3A w wątrobie. Jednocześnie stwierdzono wyższy poziom GH. Natomiast podanie noradrenaliny do komór bocznych mózgu wywołało odwrotne efekty niż w przypadku zastosowania 6-hydroksydopaminy. Powyższe badania wskazują na zaangażowanie unerwienia noradrenergicznego podwzgórzowych jąder PVN i ARC w regulację wątrobowego cytochromu P450, gdzie wymienione jądra działają przeciwstawnie (negatywnie i pozytywnie, odpowiednio). Grzbietowy szlak noradrenergiczny unerwiający PVN (stymulacja syntezy somatostatyny) odgrywa hamującą rolę w tej regulacji.

W innym badaniu zaobserwowano potencjalny wpływ układu serotonergicznego na regulację enzymów cytochromu P450 w wątrobie szczura (Kot i Daniel 2011). Badacze zastosowali dootrzewnowe podania PCA (p-chloroamfetamina) – neurotoksyny specyficznej wobec neuronów serotonergiczných oraz PCPA (p-chlorofenyloalanina) – inhibitora syntezy serotoniny. Oba związki spowodowały spadek poziomu serotoniny oraz jej metabolitu kwasu 5-hydroksyindoloocetowego w mózgu, którym towarzyszyło obniżenie aktywności enzymów CYP2C11 i CYP3A oraz podwyższenie aktywności CYP1A w wątrobie. W innym badaniu Rysz i wsp. (Rysz i wsp. 2015) podano inną specyficzną neurotoksynę – 5,7-DHT (5,7-dihydroksytryptamina) do grzbietowych i środkowych jąder szwu mózgu szczura, co doprowadziło do obniżenia poziomu serotoniny oraz kwasu 5-hydroksyindoloocetowego w strukturach mózgu. Jednocześnie stwierdzono wzrost aktywności i poziomu białka enzymów CYP1A, CYP2C11 i CYP3A oraz poziomu mRNA *CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP2C11* i *CYP3A1*, którym towarzyszyło wyższe stężenie GH, kortykosteronu i testosteronu. W kolejnej pracy przedstawiono natomiast efekty stymulacji mózgowego układu serotonergicznego podaniem prekursora serotoniny 5-hydroksytryptofanu do komórek bocznych mózgu szczura (Rysz i wsp. 2016a), które spowodowały wzrost poziomu serotoniny i jej metabolitu kwasu 5-hydroksyindoloocetowego w strukturach mózgu. W wątrobie zaobserwowano obniżenie aktywności i poziomu białka enzymów CYP1A, CYP2A, CYP2B, CYP2C11 i CYP3A, jak również mRNA odpowiednich genów. Zmianom tym towarzyszyło obniżenie stężenia GH i podwyższenie T₄. Następnie zaprezentowano wyniki uzyskane po uszkodzeniu unerwienia serotonergicznego jąder PVN lub ARC za pomocą lokalnych podań neurotoksyny 5,7-DHT (Rysz i wsp. 2016b). Podanie 5,7-DHT do PVN spowodowało obniżenie aktywności, poziomu białka oraz mRNA enzymu CYP2C11, czemu towarzyszył wzrost stężenia GH i testosteronu. Natomiast iniekcja 5,7-DHT do ARC skutkowała odwrotnymi efektami niż w przypadku podań do PVN. Przedstawione badania podkreślają ważną rolę mózgowego układu serotonergicznego w neuroendokrynnej regulacji cytochromu P450 w wątrobie, gdzie PVN i ARC pełnią przeciwstawną rolę – pozytywną i negatywną, odpowiednio.

Podsumowując, układy dopaminergiczny i noradrenergiczny mózgu regulują ekspresję wątrobowych enzymów CYP2C11 i CYP3A w sposób pozytywny, natomiast układ serotonergiczny w sposób negatywny. Jednocześnie regulacja CYP1A zachodzi

w sposób negatywny przez wszystkie powyższe układy monoaminergiczne. Ważną rolę w aspekcie neuroendokrynej regulacji pełnią podwzgórzowe jądra ARC i PVN, działające w sposób przeciwstawny. Układy monoaminergiczne mogą wpływać również na przysadkę mózgową, gdzie także znajdują się receptory dopaminergiczne D₂, noradrenergiczne α_1 i α_2 oraz serotonergiczne 5-HT₁ i 5-HT₂ (Wójcikowski i Daniel 2011). Warto wspomnieć, że podwzgórze reguluje funkcje fizjologiczne wątroby nie tylko za pomocą hormonów, ale także poprzez stymulowanie autonomicznego układu nerwowego, wpływając na poziom glukozy i metabolizm glikogenu, jak również na regenerację wątroby, oddziałując bezpośrednio na samą wątrobę lub pośrednio poprzez nadnercza i trzustkę, stymulując wydzielanie adrenaliny i noradrenaliny lub glukagonu (Wójcikowski i Daniel 2009).

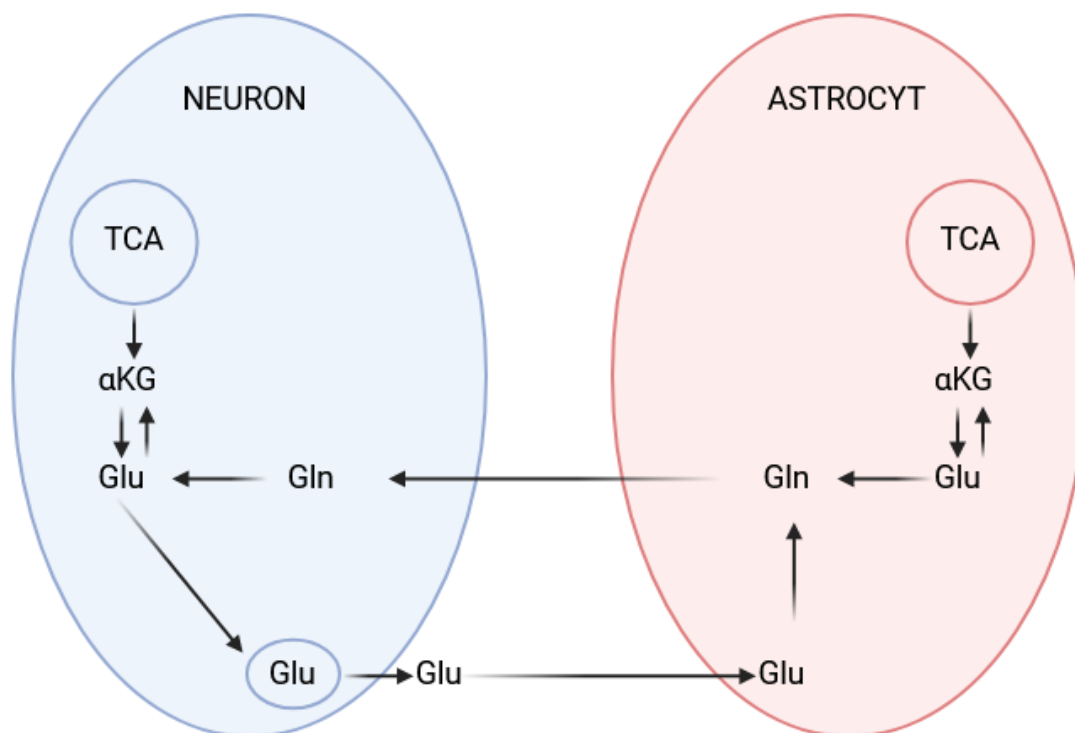
3. Układ glutaminianergiczny

Leczenie zaburzeń neuropsychiatrycznych oparte jest głównie o wpływ na układy neuroprzekaźników monoaminowych, chociaż literatura naukowa dostarcza coraz więcej dowodów, iż układ glutaminianergiczny również jest zaangażowany w mechanizmy patofizjologiczne wielu chorób związanych z układem nerwowym, takich jak choroby neurodegeneracyjne czy depresja, tym samym otwierając nowe obszary dla odkrywania potencjalnych leków (Niciu i wsp. 2012). Receptor N-metylo-D-asparaginianowy (NMDA) wydaje się być interesującym celem terapeutycznym o dużym potencjale, jednakże jak dotąd potencjalni kandydaci na leki, w postaci antagonistów receptora NMDA, napotkali szereg przeszkód w postaci działań niepożądanych czy trudności przenikania przez barierę krew–mózg. Receptor NMDA jest niezbędny do fizjologicznego funkcjonowania organizmu, choć w warunkach patologicznych wymaga blokowania, dlatego allosteryczni modulatorzy lub antagoniści z ukierunkowaniem na podjednostkę GluN2B wydają się być atrakcyjnym celem badań m.in. ze względu na niski profil działań niepożądanych (Egunlusi i Joubert 2024).

3.1 Sygnalizacja glutaminianergiczna w mózgu

W latach 80. XX wieku stwierdzono, że glutaminian jest głównym neuroprzekaźnikiem pobudzającym w ośrodkowym układzie nerwowym ssaków. Wcześniej jego wpływ na mózg był znany, choć sprowadzano go głównie do funkcji metabolicznej. Egzogenny glutaminian dostarczany wraz z dietą nie przekracza bariery krew–mózg, w mózgu produkowany jest z glukozy docierającej do ośrodkowego układu

nerwowego, gdzie służy również jako prekursor do produkcji kwasu γ -aminomasłowego (GABA – ang. *gamma-aminobutric acid*) głównego neuroprzekaźnika hamującego, który może być wykorzystywany do ponownej syntezy glutaminianu (Petroff 2002; Niciu i wsp. 2012; Onaolapo i Onaolapo 2020). Istnieją jednak doniesienia sugerujące, iż glutaminian oddziałujący w świetle jelita może w pewnym stopniu wpływać na różne struktury mózgu pośrednio poprzez stymulację aferentnego nerwu błędnego (Onaolapo i Onaolapo 2020). Metabolizm glutaminianu w mózgu jest złożony i obejmuje neurony oraz astrocyty w cyklu glutaminian–glutamina. W procesie glikolizy, glukoza w cytoplazmie jest metabolizowana do pirogronianu, który następnie ulega przekształceniu do acetylokoenzymu A i szczawiooctanu, a te z kolei podlegają kondensacji do cytrynianu, z którego powstaje α -ketoglutaran (α KG) w cyklu kwasu trójkarboksylowego (TCA – ang. *tricarboxylic acid cycle*). Uwolniony z cyklu α -ketoglutaran służy dalej do utworzenia glutaminianu (Glu) w procesie katalizowanym przez aminotransferazę asparaginianową (AAT – ang. *aspartate aminotransferase*). Dalszy metabolizm, zachodzący w astrocytach, prowadzi do powstania glutaminy (Gln) przez syntezę glutaminy (rycina 2).

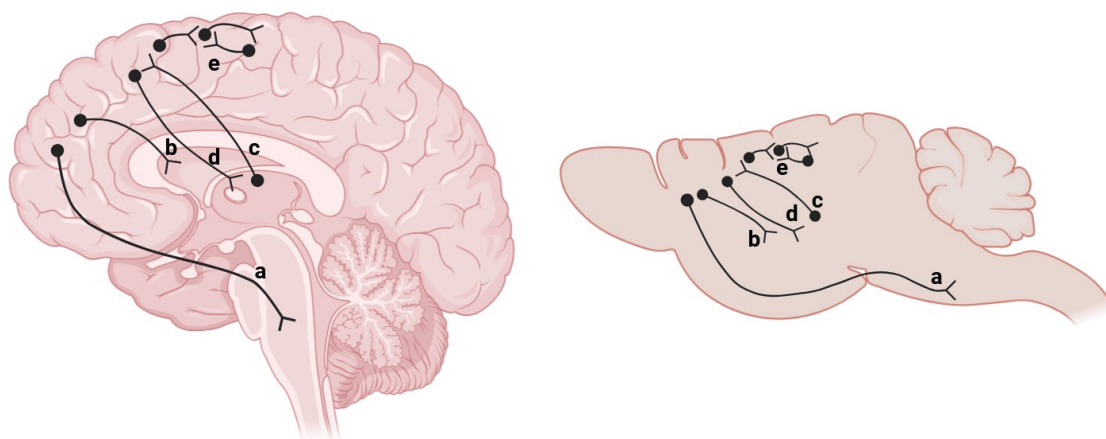


Rycina 2. Schemat przedstawiający powstawanie glutaminianu z α -ketoglutaranu (α -KG), pochodzącego z cyklu kwasu trikarboksylowego (TCA), oraz dalsze przemiany w cyklu

glutaminian–glutamina zachodzące między neuronem a astrocytem. W astrocytach α -ketoglutaran ulega przekształceniu do glutaminianu, a następnie do glutaminy, która jest transportowana do neuronów. Tam glutamina ulega deamidacji do glutaminianu, pełniącego funkcję neuroprzekaźnika. Uwolniony glutaminian jest ponownie wychwytywany przez astrocyty, co zamyka cykl (na podstawie Schousboe i wsp. 2014; Hertz i Chen 2017).

Glutamina uwolniona przez astrocyty jest ponownie metabolizowana w neuronach do glutaminianu przez mitochondrialną transaminazę (Schousboe i wsp. 2014; Hertz i Chen 2017). Poziom glutaminianu w przestrzeni zewnątrzkomórkowej jest ściśle regulowany, a jego nadmiar w szczelinie synaptycznej jest usuwany poprzez transportery aminokwasów pobudzających (EAATs – ang. *excitatory amino acid transporters*) (Niciu i wsp. 2012).

Istnieje pięć głównych szlaków glutaminianergicznych w ośrodkowym układzie nerwowym: trzy zstępujące z kory do struktur podkorowych (takich jak pień mózgu, wzgórze, jądro półleżące i prążkowie), jeden wstępujący ze wzgórza do kory mózgowej oraz szlak korowo–korowy w postaci pętli stabilizujących aktywność sieci neuronalnych, co przedstawiono na rycinie 3 (Cieślik i Wierońska 2020).



Rycina 3. Szlaki glutaminianergiczne w mózgu człowieka i szczura; a – szlak korowo–pniowy, b – szlak korowo–prążkowiowy, c – szlak wzgórzowo–korowy, d – szlak korowo–wzgórzowy, e – szlak korowo–korowy (na podstawie Schwartz i wsp. 2012; Cieślik i Wierońska 2020).

Pobudzająca aktywność układu glutaminianergicznego mózgu pozostaje pod hamującym wpływem układu GABA, co pozwala utrzymać równowagę homeostatyczną mózgu. Jednocześnie w pracy Supiot i wsp. (Supiot i wsp. 2024) autorzy ukazują istnienie połączenia pomiędzy przysiódkową korą przedczołową

(mPFC – ang. *medial prefrontal cortex*) a bocznym podwzgórzem (LHA – ang. *lateral hypothalamus area*), gdzie mPFC kontroluje różne podtypy komórek w LHA, ale szczególnie silnie oddziałuje na neurony glutaminianergiczne. Badacze zauważają, iż szlak mPFC-LHA pełni ważną rolę w regulowaniu przyjmowania pokarmu, a pod wpływem stresu społecznego pobudzenie szlaku mPFC-LHA prowadzi do zwiększonego spożycia pokarmów.

Badania immunocytochemiczne z zastosowaniem markera glutaminianergicznego VGluT2 (ang. *vesicular glutamate transporter 2*, białko odpowiedzialne za kumulowanie glutaminianu w pęcherzykach synaptycznych) wykazały glutaminianergiczne unerwienie neuroendokrynych komórek podwzgórza, odpowiedzialnych za wydzielanie CRH, GHRH, TRH, SRIH, jak również obszaru wyniosłości przyśrodkowej (Kiss i wsp. 2006; Hrabovszky i Liposits 2008). Potwierdzono także obecność jonotropowych receptorów glutaminianu (NMDA, AMPA, KA) w obszarach zarówno wyniosłości przyśrodkowej, jak i przysadki mózgowej (Hrabovszky i Liposits 2008). Eksperymenty na preparatach tkankowych ARC wykazały uwalnianie glutaminianu w synapsach (Belousov i van den Pol 1997). Uważa się, że glutaminianergiczne unerwienie ARC może być kluczowe dla regulacji endokrynej, ponieważ obserwowano, że komórki glutaminergiczne w ARC kierowały swoje aksony do wyniosłości przyśrodkowej. W badaniach na hodowlach neuronów pochodzących z ARC, które prowadzono w obecności antagonistów receptorów glutaminianergicznych stwierdzono, że usunięcie długotrwale stosowanych antagonistów prowadziło do zwiększonej odpowiedzi na glutaminian uwolniony przez inne neurony ARC, głównie poprzez receptory NMDA, których udział w regulacji neuroendokrynej był już badany (Belousov i van den Pol 1997). Również w pracy Aguilar i wsp. (Aguilar i wsp. 2005) przeanalizowano wpływ agonistów i antagonistów różnych receptorów glutaminianergicznych na uwalnianie GH u szczurów i stwierdzono stymulację wydzielania GH przez receptory jonotropowe (NMDA, KA i AMPA) oraz marginalną rolę receptorów metabotropowych w tym procesie. Analizy morfologiczne wykazały gęste unerwienie glutaminianergiczne neuronów CRH i TRH we wszystkich obszarach drobnokomórkowych PVN, sygnalizując zaangażowanie glutaminianu w regulację uwalniania CRH i TRH (Wittmann i wsp. 2005; Ulrich-Lai i wsp. 2011). Głównymi źródłami projekcji glutaminergicznych do PVN są istota szara okołowodociągowa, boczne jądro przyramienne i obszar siatkowaty śródmózgowia

(Ziegler i wsp. 2012). W pracy Kiss i wsp. (Kiss i wsp. 2006) potwierdzono glutaminianergiczne unerwienie neuronów odpowiedzialnych za wydzielania GHRH w ARC oraz SRIH w PVN, wykorzystując VGluT2 i podkreślając, iż glutaminian wpływa na wydzielanie GH z przysadki mózgowej poprzez bezpośrednie oddziaływanie na neurony PVN i ARC, które uwalniają neurohormony do naczyń wrotnych. Jednocześnie badacze zauważyli, iż część neuronów wydzielających GHRH tworzy połączenia synaptyczne na dendrytach i ciałach innych neuronów syntetyzujących GHRH lub na dendrytach neuronów wydzielających SRIH.

Literatura naukowa dostarcza informacji na temat roli jonotropowych receptorów glutaminianergicznych w regulacji wydzielania ACTH oraz GH, natomiast receptory metabotropowe w tym kontekście były mniej badane. Brann (Brann 1995) donosi, że regulacja wydzielania GH przez NMDA zachodzi głównie na poziomie neuronów GHRH w jądrze łukowatym, choć zauważa, iż somatostatyna może również odgrywać pewną rolę w tym procesie. W pracy Brann i Mahesh (Brann i Mahesh 1997) autorzy stwierdzili, iż glutaminian jest głównym neuroprzekaźnikiem kontrolującym oś HPA, wpływając na poziom CRH w PVN oraz stymulując wydzielanie ACTH poprzez receptory NMDA. Natomiast Evanson i wsp. oraz Evanson i Herman wykazali rolę receptorów kainowych i metabotropowych grupy I w regulacji poziomu CRH w PVN (Evanson i wsp. 2009; Evanson i Herman 2015). Ponadto Alfonso i wsp. oraz Arufe i wsp. wykazali regulację wydzielania TSH i hormonów tarczycy przez jonotropowe receptory NMDA, AMPA i kainowe (Alfonso i wsp. 2000; Arufe i wsp. 2002).

Receptory NMDA należą do glutaminianergicznych receptorów jonotropowych (obok receptorów AMPA i kainowych), które są szeroko rozpowszechnione w ośrodkowym układzie nerwowym i występują głównie postsynaptycznie, ale także presynaptycznie jako autoreceptory lub heteroreceptory, mogą również występować pozasynaptycznie (Beaurain i wsp. 2024). W warunkach spoczynkowych, receptor NMDA jest blokowany przez jony magnezu, natomiast do jego aktywacji poza glutaminianem wymagana jest również obecność glicyny lub D-seryny oraz odpowiedni potencjał błonowy, co umożliwia przepływ głównie jonów wapnia oraz w mniejszym stopniu jonów sodu do wnętrza komórki, a jonów potasu na zewnątrz. Receptor NMDA zbudowany jest z trzech typów podjednostek: GluN1, GluN2 (cztery podtypy GluN2A–D) i GluN3 (dwa podtypy GluN3A–B). Klasyczny

heterotetramer tworzą dwie podjednostki GluN1 niezbędne do funkcjonowanie kanału, oraz najczęściej dwie podjednostki GluN2 lub kombinacja podjednostek GluN2 i GluN3, które determinują właściwości farmakologiczne oraz kinetykę receptora. Receptory triheteromeryczne występują w całym mózgu, ale najobficiej w ciele migdałowatym, hipokampie i podwzgórzu (Ladagu i wsp. 2023). Skład podjednostek receptora zmienia się wraz z wiekiem i jest zależny od obszaru mózgu. W ośrodkowym układzie nerwowym podjednostki GluN1 oraz GluN2A występują powszechnie. Podjednostki GluN2B, GluN2C i GluN2D dominują kolejno w przodomózgowiu, mózdzku i śródmózgowiu, z czego funkcjonalne kanały budują głównie podjednostki GluN2A i GluN2B, stając się tym samym celem dla potencjalnych leków (Adell 2020; Egunlusi i Joubert 2024). Podjednostka GluN2B najbardziej rozpowszechniona jest w korze mózgowej, silną ekspresję wykazuje również w hipokampie i prążkowie, a w znacznie mniejszym stopniu stwierdzono jej obecność w mózdzku (Fuchigami i wsp. 2018; Ahmed i wsp. 2019, 2022; Rischka i wsp. 2022; Korff i wsp. 2023).

3.2 Sygnalizacja glutaminianergiczna na obwodzie

Glutaminian występuje również poza ośrodkowym układem nerwowym wpływając m.in. na funkcje sensoryczne i motoryczne oraz bólowe obwodowego układu nerwowego, a także uczestnicząc z regulacji funkcji fizjologicznych tkanek obwodowych, takich jak płuca, nerki, wątroba, układ pokarmowy, serce czy układ odpornościowy. Badanie roli glutaminianu na obwodzie może mieć ważne znaczenie biologiczne i farmakologiczne. W płucach wykazano ważną rolę receptora NMDA, który jest zaangażowany w rozwój obrzęku płuc, włóknienia i nowotworów. Jednocześnie potwierdzono, że blokowanie receptora NMDA zmniejszało ostre uszkodzenie płuc wywołane różnymi czynnikami (Du i wsp. 2016). Glutaminian wydalany jest z moczem w niewielkim stopniu, ponieważ jest wchłaniany zwrótnie w kanalikach nerkowych. Nadmiar glutaminianu jest metabolizowany przez organizm do różnych form związków azotu, takich jak amoniak, który jest następnie przekształcany do mocznika i usuwany z moczem. Zbyt duże stężenie glutaminianu w osoczu może prowadzić do uszkodzenia nerek. Wykazano, że w nerkach są obecne receptory glutaminianergiczne, takie jak NMDA, a ich blokowanie po niedokrwieniu lub toksycznym uszkodzeniu nerek prowadzi do poprawy funkcji nerek (Du i wsp. 2016).

W wątrobie glutaminian bierze udział w fizjologicznej przemianie aminokwasów i metabolizmie energetycznym, a w cyklu glutaminian–glutamina uczestniczy w wymianie azotu między tkankami oraz detoksykacji amoniaku (Treberg i wsp. 2014; Voss i wsp. 2021). W pracy Huang i wsp. (Huang i wsp. 2021) wykazano, iż receptor NMDA bierze udział w utrzymaniu homeostazy glukozy i lipidów w mysiej wątrobie, a blokowanie receptora NMDA hamuje insulinooporność i akumulację lipidów wywołaną dietą wysokotłuszczową, podczas gdy nadmierna aktywacja NMDA przyczynia się do insulinooporności, hiperlipidemii i zmian morfologicznych wątroby. Wydaje się zatem, że receptor NMDA wydaje się być interesującym celem terapeutycznym w leczeniu zaburzeń metabolicznych. Wykazano również obecność podjednostki GluN2B w wątrobie (Huang i wsp. 2021; Rischka i wsp. 2022).

3.3 Sygnalizacja glutaminianergiczna w patofizjologii zaburzeń neuropsychiatrycznych

W warunkach fizjologicznych stężenie glutaminianu w synapsie jest ściśle kontrolowane, a zaburzenie homeostazy prowadzi do wzrostu neurotransmisji glutaminianergicznej i ekscytotoksyczności. Nadmiar glutaminianu w przestrzeni pozakomórkowej, wywołuje zbyt intensywną aktywację receptorów NMDA, co skutkuje śmiercią neuronów w wyniku apoptozy lub martwicy (Egunlusi i Joubert 2024). Utrzymanie homeostazy w przestrzeni pozakomórkowej zachodzi m.in. poprzez transportery aminokwasów pobudzających (EAATs), których dysfunkcje powiązane z patologią różnych chorób neurodegeneracyjnych, a obniżony poziom EAATs z zaburzeniami nastroju (Niciu i wsp. 2012). Uważa się, iż synaptyczne receptory NMDA posiadają pewne właściwości ochronne, podczas gdy aktywacja pozasynaptycznych receptorów NMDA powiązana została z procesami ekscytotoksycznymi i zaburzeniami neuropsychiatrycznymi, takimi jak choroby neurodegeneracyjne czy depresja. Podjednostki GluN2A receptora NMDA występują głównie w synapsach, natomiast GluN2B i GluN2D występują również pozasynaptycznie. Dlatego sądzi się, iż receptory zawierające podjednostkę GluN2A przyczyniają się do plastyczności synaptycznej, natomiast selektywni antagoniści GluN2B mogą mieć właściwości neuroprotektoryjne. Z tego powodu podjednostka GluN2B wydaje się obiecującym celem dla rozwoju nowych leków (Adell 2020; Rischka i wsp. 2022). Stwierdzono dyfuzję receptora NMDA (głównie z podjednostką

GluN2B) do kolców dendrytycznych i tworzenie receptorów pozasynaptycznych, co powiązano ze starzeniem się i spadkiem funkcji poznawczych związanych z wiekiem (Egunlusi i Joubert 2024).

Badania wykazały, iż ekscytotoksyczność jest ważnym czynnikiem w patogenezie chorób neurodegeneracyjnych. Opracowano i zbadano wiele antagonistów receptora NMDA, jednak na chwilę obecną zastosowanie kliniczne znalazło tylko kilka związków, takich jak amantadyna w chorobie Parkinsona, memantyna w chorobie Alzheimera czy riluzol w leczeniu stwardnienia zanikowego bocznego (Egunlusi i Joubert 2024). Ze względu na skutki uboczne, wiele związków będących kompetecyjnymi antagonistami musiało zostać wycofanych z badań, również na etapie badań klinicznych. Do innych problemów należała słaba przenikalność przez barierę krew–mózg. Aktualne podejście badawcze stawia na selektywne blokowanie podjednostki GluN2B, które miałyby zapobiegać ekscytotoksyczności, a jednocześnie ograniczać wpływ na fizjologiczne funkcjonowanie synaptycznych receptorów NMDA, niezbędnych dla zachowania prawidłowego neuroprzekaznictwa, ograniczając tym samym skutki uboczne.

Zainteresowanie potencjałem terapeutycznym receptorów NMDA w aspekcie działania przeciwdepresyjnego wzbudziła ketamina, będąca antagonistą receptora NMDA oraz pojawiające się selektywne związki podjednostek GluN2A–D, które umożliwiły prowadzenie badań funkcji mózgu i stanów patologicznych poprzez zaangażowanie konkretnych podjednostek. Już krótka ekspozycja na ketaminę, która blokuje kanał jonowy niezależnie od składu podjednostek, wywoływała u pacjentów długotrwale (kilka dni do kilku tygodni) utrzymujące się działanie przeciwdepresyjne. Szybkie działanie przeciwdepresyjne wykazały również negatywne modulatory allosteryczne (NAMs – ang. *negative allosteric modulators*) podjednostki GluN2B, wiążące się poza kanałem w obrębie styku podjednostek GluN1 i GluN2B, stabilizując nieaktywną konformację receptora (Hanson i wsp. 2024). Pierwszym prototypowym związkiem selektywnie blokującym podjednostkę GluN2B był ifenprodil, na podstawie którego opracowano kolejnych selektywnych antagonistów (modulatorów) podjednostki GluN2B, takich jak CP-101,606 czy Ro 25-6981, którzy stali się szeroko wykorzystywanymi narzędziami farmakologicznymi, stosowanymi w badaniach nad funkcją receptorów NMDA zawierających podjednostkę GluN2B (Perin-Dureau i wsp.

2002; Borza i Domány 2006; Gogas 2006; Schreiber i wsp. 2019). Związek CP-101,606 (traxoprodil) został oceniony w fazie I i II badań klinicznych, w których wykazał szybkie działanie przeciwdepresyjne u pacjentów z depresją lekooporną, jednak z dalszych badań wykluczyły go problemy w zakresie bezpieczeństwa kardiologicznego. Ponadto wykazano, iż powodował efekty dysocjacyjne i zaburzenia poznawcze w badaniach dotyczących zastosowania w leczeniu chorób neurodegeneracyjnych (Hanson i wsp. 2024). W badaniu przeprowadzonym przez Poleszak i wsp. (Poleszak i wsp. 2016) zbadano wpływ CP-101,606 w dawce subterapeutycznej w połączeniu z obecnie stosowanymi lekami przeciwdepresyjnymi, takimi jak imipramina, escitalopram, fluoksetyna czy reboksetyna, również w dawkach nieskutecznych, na zachowanie myszy w teście wymuszonego pływania. Wykazano, iż traxoprodil nasilał działania escitalopramu i fluoksetyny, leków z grupy selektywnych inhibitorów wychwyty zwrotnego serotoniny (SSRI – ang. *selective serotonin reuptake inhibitors*), ale nie miał podobnego wpływu w przypadku reboksetyny, selektywnego inhibitora wychwyty zwrotnego noradrenaliny (SNRI – ang. *serotonin norepinephrine reuptake inhibitor*). Badacze podkreślają, iż łączne zastosowanie niższych dawek leków przeciwdepresyjnych ze związkiem CP-101,606 może pozwolić na skuteczniejszą i bezpieczniejszą terapię, jednak potrzebne są dalsze badania farmakokinetyczne i farmakodynamiczne. Do aktualnie badanych związków oddziałujących selektywnie na podjednostkę GluN2B receptora NMDA należą między innymi:

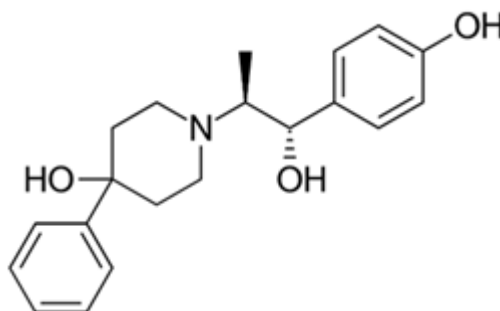
- radiprodil – który aktualnie znajduje się w fazie badań klinicznych, z planowaną fazą III, w aspekcie schorzeń neurologicznych, w tym neurorozwojowych oraz lekoopornej padaczki (Auvin i wsp. 2020; Bertocchi i wsp. 2024)
- CERC-301 (inne nazwy: MK-0657, rislenemdaz), który osiągnął II fazę badań klinicznych w leczeniu zaburzeń depresyjnych, jednak nie wykazał dostatecznej skuteczności; dlatego badania kliniczne w tym zakresie zostały przerwane, natomiast stwierdzono pewien potencjał terapeutyczny tego związku w leczeniu objawowym niedociśnienia ortostatycznego (Garner i wsp. 2015; Lener i wsp. 2017; Henter i wsp. 2018)
- NBI-1070770 – obecnie w II fazie badań klinicznych, w aspekcie zastosowania jako lek przeciwdepresyjny (Freudenberg i wsp. 2024)

- BMS-986163 – we wczesnej fazie badań przedklinicznych, rozwijany jako kandydat na prolek w terapii przeciwdepresyjnej (Bristow i wsp. 2017; Marcin i wsp. 2018).

II. CEL I ZAKRES PRACY

Receptor NMDA z ukierunkowaniem na podjednostkę GluN2B staje się atrakcyjnym celem dla poszukiwania nowych kandydatów na leki w zakresie chorób neurodegeneracyjnych czy depresji. Jednocześnie w ciągu ostatnich dwóch dekad wykazano, iż leki oddziałujące na poziomie OUN poprzez neuroprzekaźnikowe układy monoaminergiczne – dopaminergiczny, noradrenergiczny i serotonergiczny – wpływają na neuroendokrynną regulację enzymów cytochromu P450 w wątrobie, które pełnią kluczową rolę w I fazie metabolizmu leków. Natomiast znaczenie układu glutaminianergicznego mózgu w neuroendokrynną regulacji wątrobowego cytochromu P450 nie zostało jak dotąd zbadane, chociaż obecność unerwienia glutaminianergicznego w podwzgórzu i jego wpływ na czynności hormonalne został już wcześniej dostrzeżony. W związku z powyższym, w niniejszej pracy podjęto temat zaangażowania unerwienia glutaminergicznego i receptorów NMDA w neuroendokrynną regulację cytochromu P450 w wątrobie.

Jak dotąd, potencjalni kandydaci na leki oddziałujące poprzez receptor NMDA napotkali licznie trudności, takie jak problemy z przenikaniem przez barierę krew–mózg oraz skutki uboczne. Jednakże ze względu na ich potencjał terapeutyczny, rozwijane są nowe związki lub prowadzi się badania z wykorzystaniem dawek subterapeutycznych w połączeniu ze związkami oddziałującymi na inne typy receptorów. Związek CP-101,606, selektywny antagonist podjednostki GluN2B receptora NMDA, którego strukturę przedstawiono na rycinie 4, nie przeszedł badań klinicznych ze względu na skutki uboczne, jednak pozostaje dobrze przebadanym i do dnia dzisiejszego wykorzystywanym narzędziem farmakologicznym o właściwościach przeciwdepresyjnych.



Rycina 4. Struktura CP-101,606 – selektywnego antagonisty podjednostki GluN2B receptora NMDA.

W badaniach wstępnych, w których brałam udział, oceniono wpływ wielokrotnych, dootrzewnowych podań związku CP-101,606 samcom szczurów rasy Wistar Han (20 mg/kg, 5 dni), na enzymy cytochromu P450 biorące udział w metabolizmie oksydacyjnym leków w wątrobie (Bromek i wsp. 2021). Wyniki badań wykazały spadek poziomu ekspresji i aktywności wątrobowych enzymów CYP1A, CYP2C11 oraz CYP3A, jak również obniżenie aktywności enzymów CYP2A i CYP2B bez zmian w poziomie białka i mRNA. Jednocześnie obserwowano także obniżenie poziomu GHRH w przysadce mózgowej oraz GH i kortykosteronu w surowicy krwi. W kolejnej pracy z moim udziałem przedstawiono wyniki dla wątrobowego CYP2D, gdzie stwierdzono zmiany poziomu aktywności bez zmian poziomu ekspresji enzymu (Haduch i wsp. 2022). Jednakże po podaniu dootrzewnowym, poza wpływem neuroendokrynnym, należy także uwzględnić wpływ związku na regulację cytochromu P450 na poziomie wątroby oraz bezpośredni wpływ na białko enzymu. Zatem efekty obserwowane po podaniu obwodowym mogą być konsekwencją różnych bezpośrednich i pośrednich interakcji pomiędzy związkiem a enzymem, dlatego trudno jednoznacznie stwierdzić, czy mechanizm neuroendokrynnny jest w nim dominujący.

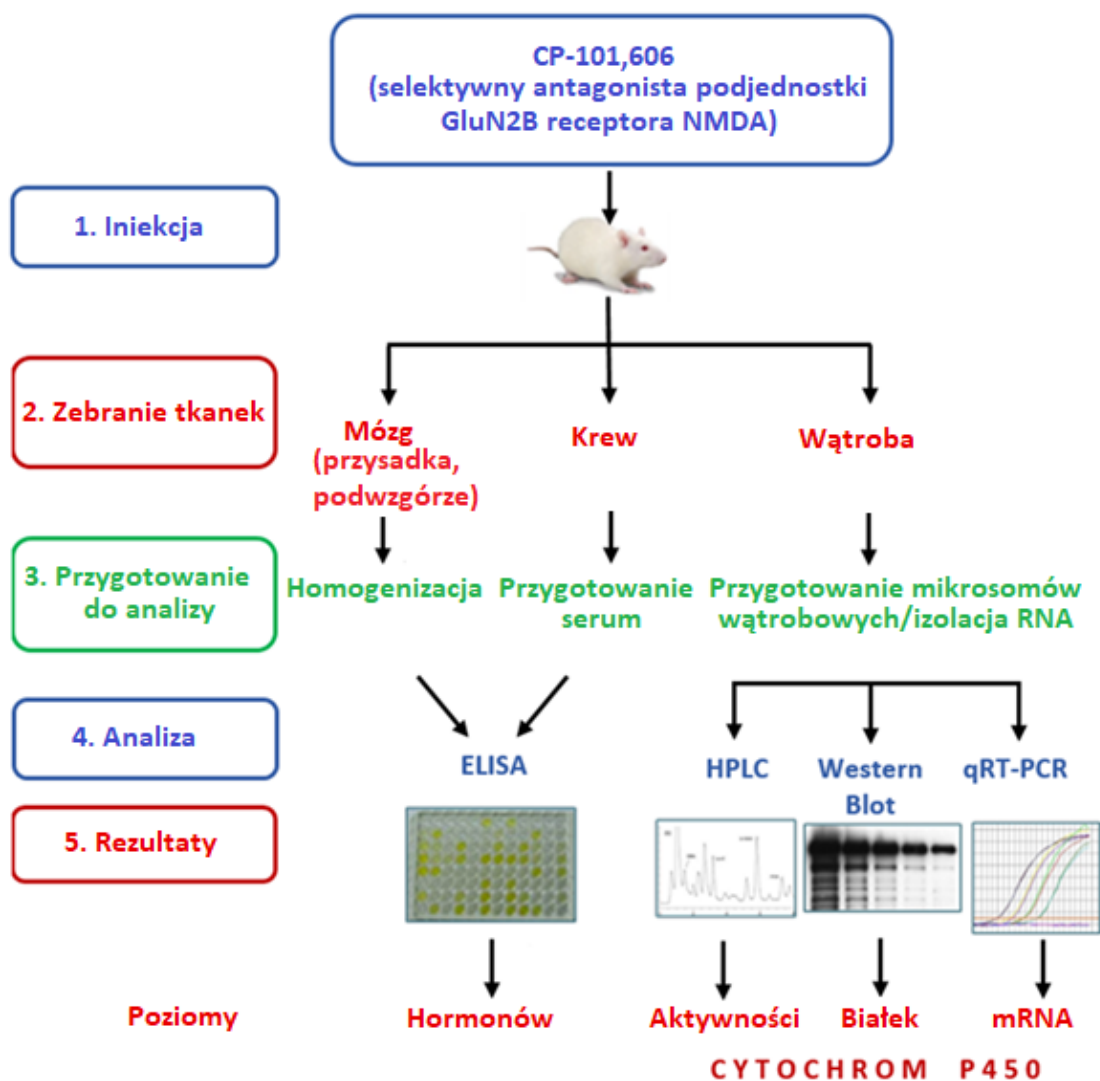
Celem niniejszej pracy było zbadanie wpływu związku CP-101,606 na centralną neuroendokrynną regulację cytochromu P450 w wątrobie, a w szczególności identyfikację struktur mózgowych i hormonów pośredniczących w tym procesie. Przyjęto hipotezę, iż selektywny antagonist podjednostki GluN2B receptora NMDA, związek CP-101,606, spowoduje istotne zmiany w funkcjonowaniu osi podwzgórzowo–przysadkowej, co z kolei doprowadzi do zmian w ekspresji i aktywności enzymów cytochromu P450 w wątrobie zależnych od hormonów. Mechanizm wydzielania hormonów przez jądra podwzgórza oraz hormonalna regulacja cytochromu P450 są bardzo złożone, stąd ocena wpływu związku CP-101,606 na poszczególne enzymy cytochromu P450 wymagała szczegółowego rozwiązania eksperymentalnego, które objęło:

- wielokrotne obustronne podania związku CP-101,606 do komórek bocznych mózgu szczura, w trzech różnych dawkach, aby ocenić wpływ centralnego działania leku na mechanizmy neuroendokrynnne regulujące ekspresję cytochromu P450

- wielokrotne lokalne podania związku CP-101,606, obustronnie do jąder podwzgórza mózgu: jąder przykomorowych (PVN) lub jąder łukowatych (ARC), w celu zbadania zaangażowania receptorów NMDA obecnych w wymienionych strukturach mózgu w regulacji ekspresji i aktywności enzymów cytochromu P450 w wątrobie.

W kolejnych etapach badań, przedstawionych na rycinie 5, przeprowadzono pomiary:

- aktywności enzymów cytochromu P450, w tym CYP1A, CYP2A, CYP2B, CYP2C, CYP2D oraz CYP3A, w mikrosomalnej frakcji wątroby po zastosowaniu różnych dróg podania domózgowego związku CP-101,606
- poziomu białka oraz mRNA wybranych enzymów cytochromu P450, dla których wcześniej zaobserwowano zmiany w aktywności enzymatycznej, w celu oceny wpływu leku na ich ekspresję
- stężenia hormonów w surowicy krwi, takich jak hormon wzrostu, kortykosteron trójiodotyronina, tyroksyna, a także hormonów uwalniających lub hamujących, takich jak GHRH i somatostatyna w przysadce mózgowej oraz w jądrach podwzgórza
- dodatkowo zbadano bezpośredni wpływ związku CP-101,606 na aktywność wybranych enzymów cytochromu P450 w szczurzych mikrosomach wątrobowych.



Rycina 5. Schemat procedur eksperymentalnych przeprowadzonych w kolejnych etapach badań.

Analiza porównawcza wyników badań przeprowadzonych w różnych modelach doświadczalnych *in vitro* oraz *in vivo*, uzyskanych po różnych drogach podania (dootrzewnowym, dokomorowym oraz lokalnym do jąder podwzgórza), pozwoliła na ocenę, w jakim stopniu wpływ związku CP-101,606 na wątrobowy cytochrom P450 jest wynikiem działania centralnego lub obwodowego oraz poznanie zaangażowania mechanizmów neuroendokrynych w tę regulację. Głównym założeniem niniejszej pracy było poszerzenie wiedzy na temat znaczenia układu glutaminianergicznego mózgu w regulacji neuroendokrynej cytochromu P450 w wątrobie, celem lepszego zrozumienia mechanizmów fizjologicznych/farmakologicznych wpływających na metabolizm wątrobowy leków. Istotne było również znalezienie odpowiedzi na pytanie, czy nowe leki będące antagonistami podjednostki GluN2B receptora NMDA będą

mogły wywierać wpływ na wątrobowy cytochrom P450 poprzez mechanizm ich działania farmakologicznego na system neuroendokryny.

III. MATERIAŁY I METODY

1. Materiał biologiczny

1.1 Zwierzęta

Do badań wykorzystano samce szczurów rasy Wistar Han zakupione w Charles River Laboratories (Sulzfeld, Niemcy) o masie 280–300 g, które przetrzymywano w typowych warunkach laboratoryjnych ($22 \pm 2^\circ\text{C}$, $55 \pm 5\%$ wilgotności względnej) z nieograniczonym dostępem do wody pitnej oraz karmy granulowanej. Na 18 godzin przed zakończeniem doświadczeń zwierzęta były poddawane restrykcji pokarmowej, pozostawiając wolny dostęp do wody pitnej.

1.2 Szczurze mikrosomy wątrobowe

Szczurze mikrosomy wątrobowe pozyskano metodą wirowania różnicowego z wątrób samców szczurów rasy Wistar Han o masie 280–300 g zakupionych w Charles River Laboratories (Sulzfeld, Niemcy).

2. Związki i materiały użyte do badań

2.1 Substancje anestetyczne

Do anestezji zwierząt laboratoryjnych użyto:

- chlorowodorek ketaminy (Biowet, Puławy) – 65 mg/kg masy ciała
- chlorowodorek ksylazyny (Biowet, Puławy) – 5 mg/kg masy ciała.

2.2 Materiały do operacji stereotaktycznych i iniekcji domózgowych

Do zamontowania kaniul stereotaktycznych zastosowano:

- kaniule stereotaktyczne, śrubki mocujące, sterylny воск do neurochirurgii (Agtho's AB, Lidingö, Sweden), samoutwardzalną dentystyczną żywicę dwuskładnikową Dentalon plus (Kulzer, Hanau, Niemcy).

Celem wykonania iniekcji domózgowych użyto:

- kaniule iniekcyjne, precyzyjne strzykawki Hamilton (Agntho's AB, Lidingö, Szwecja), rurki FEP, konektory, adaptory (Microbiotech/se AB, Sztokholm, Szwecja).

2.3 Narzędzia farmakologiczne

W przeprowadzonych eksperymentach wykorzystano związek CP-101,606 w postaci soli mesylanowej, który jest selektywnym antagonistą podjednostki GluN2B receptora NMDA, zakupiony w Axon Medchem (Groningen, Holandia). Zwierzętom podawano związek rozpuszczony w 0,9% NaCl, w zależności od drogi podania w następujących stężeniach:

- do komór bocznych mózgu szczura – 6 µg, 15 µg, 30 µg/mózg
- do jąder przykomorowych lub łukowatych podwzgórza – 3 µg/mózg.

W badaniach *in vitro* z wykorzystaniem szczurzych mikrosomów wątrobowych zastosowano 3 stężenia związku CP-101,606: 10 µM, 50 µM, 100 µM.

2.4 Odczynniki do przygotowania mikrosomów wątrobowych

Do przygotowania mikrosomów wątrobowych wykorzystano następujące odczynniki:

- chlorek potasu, kwas chlorowodorowy, sacharozę (Sigma Aldrich, ST. Louis, MO, USA)
- tris(hydroksymetyl)aminometan (Tris) (BioShop, Ontario, Canada).

2.5 Specyficzne substraty i ich metabolity, kofaktory oraz pozostałe odczynniki do reakcji metabolicznych

W badaniach aktywności enzymów cytochromu P450 zastosowano:

- specyficzne substraty oraz ich metabolity – bufuralol i 1'-hydroksybufuralol, kofeina oraz kwas 1,3,7-trimetylomoczwowy, paraksantyna, teobromina, teofilina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), testosteron oraz 2α-, 2β-, 6β-, 7α-, 16α- i 16β-hydroksytestosteron (Steraloids, Newport, KY, USA), warfaryna (Merck, Darmstadt, Niemcy) i 7-hydroksywarfaryna (zsyntetyzowana w Instytucie Farmakologii im. Jerzego Maja PAN)

- kofaktory – chlorek magnezu, dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa, glukozy-6-fosforan, NADP, NADPH, (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- pozostałe odczynniki – diwodorofosforan potasu, diwodorofosforan sodu, kwas chlorowodorowy, kwas etylenodiaminotetraoctowy, kwas nadchlorowy, siarczan cynku, wodorofosforan potasu, wodorofosforan sodu, wodorotlenek sodu. (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA).

2.6 Odczynniki do ekstrakcji oraz chromatografii cieczowej

W przygotowaniu próbek i analizie metodą chromatografii cieczowej użyto:

- do ekstrakcji – dichlorometan, izopropanol, octan etylu (Merck, Darmstadt, Niemcy)
- do chromatografii cieczowej – acetonitryl, kwas ortofosforowy, metanol (Merck, Darmstadt, Niemcy), kwas nadchlorowy, octan sodu, trietyloamina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA).

2.7 Odczynniki do oznaczania białka całkowitego

Do oznaczenia stężenia białka całkowitego w mikrosomach wątrobowych wykorzystano zestaw Pierce™ BCA Protein Assay Kit, z albuminą surowicy bydlęcej jako standardem.

2.8 Odczynniki i przeciwciała do analizy Western blotting

W analizie Western blotting zastosowano:

- odczynniki do przygotowania żeli poliakrylamidowych – akrylamid / bis-akrylamid, dodecylosiarczan sodu (SDS), tris(hydroksymetyl)aminometan (BioShop, Ontario, Canada), kwas chlorowodorowy, nadsiarczan amonu (APS) (Sigma Aldrich, ST. Louis, MO, USA), n,n,n',n'-tetrametyloetylenodiamina (TEMED) (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)
- odczynniki do przygotowania buforów do elektroforezy i transferu białek oraz do płukania, blokowania i odzyskiwania membran – kwas chlorowodorowy, monolaurynian polioksyetylenosorbitolu (Tween 20) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), chlorek sodu, tris(hydroksymetyl)aminometan (Tris) (BioShop, Ontario, Canada), glicyna (Lab Empire, Rzeszów, Polska), membrana

nitrocelulozowa (Cytiva, Marlborough, MA, USA), metanol (Merck, Darmstadt, Niemcy), mleko w proszku odtłuszczone granulowane (OSM Gostyń, Gostyń, Polska), papier filtracyjny (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)

- odczynniki do przygotowania próbek do nałożenia na żel poliakrylamidowy – 2-merkaptoetanol (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), Laemmli sample buffer (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- szczurze supersomy enzymów CYP1A1, CYP1A2, CYP2A1, CYP2B1, CYP2C6, CYP2C11, CYP3A1, CYP3A2 oraz ludzkie supersomy enzymów CYP2A6, CYP2D6 wykorzystane jako standardy (Gentest Corp., Woburn, MA, USA)
- odczynniki do przygotowywania roztworów przeciwciał I- i II-rzędowych – SignalBoost™ Immunoreaction Enhancer Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- I-rzędowe przeciwciała – monoklonalne mysie skierowane przeciwko szczurzym CYP1A1/1A2, CYP2B1/2B2 lub CYP2C6 (Santa Cruz, Dallas, TX, USA), poliklonalne królicze skierowane przeciwko szczurzym CYP1A1/1A2 (Millipore, Temecula, CA, USA), poliklonalne królicze skierowane przeciwko szczurzemu CYP2A oraz przeciwko ludzkim CYP2D6 i CYP3A4 (Fine Test, Wuhan, Hubei, China), poliklonalne królicze skierowane przeciwko szczurzemu CYP2C11 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), monoklonalne mysie skierowane przeciwko szczurzej β -aktynie (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- II-rzędowe przeciwciała sprzężone z peroksydazą chrzanową (HRP) – królicze skierowane przeciwko mysim (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) oraz kozie skierowane przeciwko króliczym (Vector Laboratories Burlingame, CA, USA)
- zestaw odczynników do immunodetekcji – SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

2.9 Odczynniki i testy TaqMan do analizy RT-PCR

W analizie RT-PCR wykorzystano:

- zestaw odczynników do izolacji mRNA – Total RNA Mini kit (A&A Biotechnology, Gdynia, Poland)
- zestaw odczynników do odwrotnej transkrypcji – High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)
- testy TaqMan Gene expression assay dla wybranych genów *CYP* i *ACTB* – *CYP1A1* (Rn00487218_m1), *CYP1A2* (Rn1422531_m1), *CYP2A1* (Rn00562200_m1), *CYP2A2* (Rn00562207_m1), *CYP2B1* (Rn01457875_m1), *CYP2B2* (Rn02786833_m1), *CYP2C6* (Rn03417171_gH), *CYP2C11* (Rn01502203_m1), *CYP3A1* (Rn01412959_g1), *CYP3A2* (Rn01412889_mH), *ACTB* (Rn00667869_m1) (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)
- TaqMan Gene Expression Master Mix (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

2.10 Zestawy odczynników ELISA do pomiaru poziomu hormonów

Zestawy ELISA użyto do pomiaru poziomu wybranych hormonów:

- hormonu wzrostu (GH), kortykosteronu (CRT), trójiodotyroniny (T_3), tyroksyny (T_4), somatostatyny (SRIH) (Bioassay Technology Laboratory, Szanghaj, Chiny oraz Fine Test, Wuhan, Hubei, Chiny)
- hormonu uwalniającego hormon wzrostu (GHRH) (Elabscience Biotechnology, Bethesda, MD, USA oraz Fine Test, Wuhan, Hubei, Chiny).

3. Aparatura

W niniejszej pracy zastosowano następującą aparaturę:

- aparat stereotaktyczny Kopfa (Tujunga, CA, USA)
- pompę do mikroiniekcji U-864 Syringe Pump (Agntho's AB, Lidingö, Szwecja)
- wysokoobrotowy homogenizator FastPrep-24 5G (MP Biomedicals, Irvine, CA, USA)
- ultrawirówkę Optima L-100XP (Beckman Coulter, Brea, CA, USA)

- chromatograf cieczowy LaChrom Elite z detekcją UV-Vis i fluorescencyjną, z oprogramowaniem Hitachi D-7000 HPLC System Manager (Merck Hitachi, Schaumburg, IL, USA)
- chromatograf cieczowy Vanquish Core z detekcją UV-Vis i fluorescencyjną, z oprogramowaniem Chromeleon 7 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- kolumnę chromatograficzną 5 µm, 250 mm × 4,6 mm, Econosphere™ C18 (Alltech, Deerfield, IL, USA)
- kolumnę chromatograficzną 5 µm, 150 mm × 4,6 mm, Supelcosil™ LC-18 (Sigma-Aldrich, Bellefonte, PA, USA)
- czytnik mikroplitek Synergy HTX Multi-Mode Microplate Reader (BioTek Instruments, Santa Clara, CA, USA)
- wysokoczuły analizator obrazów luminescencyjnych LAS-1000 plus, z systemem obrazującym Image Reader LAS-1000 i współpracującym oprogramowaniem Image Gauge 3.11 (Fuji Film, Tokyo, Japan)
- System do reakcji PCR w czasie rzeczywistym QuantStudio 12K Flex (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Ponadto użyto:

- pipety Eppendorf Research plus (Eppendorf, Hamburg, Niemcy)
- wagę analityczną Medicat Ltd 160M – dokładność 0,001 g (Medicat Limited, Swansea, Wielka Brytania)
- wagę mikroanalityczną Sartorius – dokładność 0,00001 g (Sartorius Polska, Kostrzyn, Polska)
- system do demineralizacji wody Millipore Direct-Q UV3 (Merck Millipore, Darmstadt, Niemcy)
- wytwornicę lodu (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- wirówkę Sorvall ST 16 / ST 16R Centrifuge Series (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- mikrowirówkę Sigma 1-15 PK (Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz, Niemcy)
- łaźnię wodną z wytrząsaniem (Medingen, Dresden, Niemcy)

- ewaporator RapidVap Vertex™ Dry Evaporator (Labconco Corporation, Kansas City, MO, USA)
- minikomorę do elektroforezy Mini-PROTEAN Vertical Tetra Cell oraz zasilacz do elektroforezy PowerPac™ Basic (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)
- system do transferu białek Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)
- blok grzewczy Digital Dry Baths/Block Heaters (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- termocykler MiniAmp Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

4. Podania domózgowe związku CP-101,606

Celem podań domózgowych badanego związku, przeprowadzono operacje stereotaktyczne na samcach szczurów rasy Wistar Han o masie 280–300 g. W tym celu zwierzęta wprowadzono w stan znieczulenia ogólnego poprzez domięśniowe podanie chlorowodorku ketaminy w dawce 65 mg/kg masy ciała oraz chlorowodorku ksylazyny w dawce 10 mg/kg masy ciała. Następnie zwierzęta umieszczano w stoliku stereotaktycznym i implantowano kaniule, zgodnie z koordynatami według atlasu mózgu szczura (Paxinos i Watson 2007). Podania związku CP-101,606 przeprowadzono tydzień po operacji.

4.1 Podania do komór bocznych mózgu

Zwierzętom z zaimplantowanymi kaniulami według współrzędnych:

- AP (w tył od punktu bregma): – 0,8 mm
- L (boczenie od linii szwu): ± 1,5 mm
- V (brzuszenie od powierzchni opony twardej): – 4,0 mm

przez 5 kolejnych dni podawano związek CP-101,606 rozpuszczony w 0,9% NaCl, w 3 dawkach: 6 µg, 15 µg lub 30 µg/mózg (3 µg, 7,5 µg lub 15 µg do jednej komory). Grupę kontrolną stanowiły zwierzęta, którym podawano 0,9% NaCl. Związek albo rozpuszczalnik wprowadzono przez kaniulę iniekcyjną w objętości 5 µL, z szybkością 1 µL/min do obu komór bocznych, przy użyciu pompy do mikroiniekcji. Następnie kaniulę iniekcyjną pozostawiano w miejscu podania przez 5 kolejnych minut, a później

powoli wyciągano. Zwierzęta dekapitowano 2 godziny po ostatnim podaniu, a następnie pobierano krew, wątrobę oraz przysadkę mózgową. Położenie kaniuli iniekcyjnej zweryfikowano histologicznie.

4.2 Podania do jąder przykomorowych podwzgórza

Zwierzętom z zaimplantowanymi kaniulami według współrzędnych:

- AP (w tył od punktu bregma): – 1,6 mm
- L (boczenie od linii szwu): ± 0,3 mm
- V (brzuszenie od powierzchni opony twardej): – 7,2 mm

przez 5 kolejnych dni podawano związek CP-101,606 rozpuszczony w 0,9% NaCl, w dawce 3 µg/mózg (1,5 µg do każdego jądra). Grupę kontrolną stanowiły zwierzęta, którym podawano 0,9% NaCl. Związek albo rozpuszczalnik wprowadzano obustronnie przez kaniulę iniekcyjną w objętości 1 µL, z szybkością 1 µL/min, przy użyciu pompy do mikroiniekcji. Następnie kaniulę iniekcyjną pozostawiano w miejscu podania przez 5 kolejnych minut, a później powoli wyciągano. Zwierzęta dekapitowano 2 godziny po ostatnim podaniu, a następnie pobierano krew, wątrobę, przysadkę i obszar podwzgórza zawierający PVN. Położenie kaniuli iniekcyjnej zweryfikowano histologicznie.

4.3 Podania do jąder łukowatych podwzgórza

Zwierzętom z zaimplantowanymi kaniulami według współrzędnych:

- AP (w tył od punktu bregma): – 1,6 mm
- L (boczenie od linii szwu): ± 0,3 mm
- V (brzuszenie od powierzchni opony twardej): – 9,4 mm

przez 5 kolejnych dni podawano związek CP-101,606 rozpuszczony w 0,9% NaCl, w dawce 3 µg/mózg (1,5 µg do każdego jądra). Grupę kontrolną stanowiły zwierzęta, którym podawano 0,9% NaCl. Związek albo rozpuszczalnik wprowadzano obustronnie przez kaniulę iniekcyjną w objętości 1 µL, z szybkością 1 µL/min, przy użyciu pompy do mikroiniekcji. Następnie kaniulę iniekcyjną pozostawiano w miejscu podania przez 5 kolejnych minut, a później powoli wyciągano. Zwierzęta dekapitowano 2 godziny po ostatnim podaniu, a następnie pobierano krew, wątrobę, przysadkę i obszar podwzgórza zawierający ARC. Położenie kaniuli iniekcyjnej zweryfikowano histologicznie.

5. Przygotowanie materiału biologicznego

5.1 Przygotowanie surowicy

Po dekapitacji zwierząt, krew zbierano i pozostawiano na okres 2 h do skrzepnięcia. Po odwirowaniu ($1500 \times g$, 20 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) uzyskaną surowicę zbierano nad osadu i przechowywano w $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.2 Przygotowanie mikrosomów wątrobowych

Wątroby pobrane od zwierząt zhomogenizowano w 20 mM buforze Tris/KCl, pH 7,4, a następnie odwirowano przez 20 min, przy przyspieszeniu odśrodkowym $12\,000 \times g$, w temperaturze $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Uzyskany supernatant odwirowano w ultrawirówce, przy przyspieszeniu odśrodkowym $100\,000 \times g$, w temperaturze $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ przez 1 h. Pozyskaną frakcję mikrosomalną przemyto 0,15 M KCl, a następnie ponownie odwirowano w ultrawirówce przy takich samych parametrach. Peletę z mikrosomami wątrobowymi, pozyskaną metodą wirowania różnicowego (Netter 1960; Legrum i wsp. 1979), zawieszono w 20 mM buforze Tris/HCl (pH 7,4) zawierającym 8,5% sacharozy. Otrzymaną zawiesinę mikrosomalną przechowywano w temperaturze $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ do dalszych badań.

6. Badanie aktywności wybranych enzymów cytochromu P450 z wykorzystaniem specyficznych substratów, metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC)

W badaniach aktywności enzymów cytochromu P450 wykorzystano metabolizm specyficznych substratów (bufuralolu, kofeiny, testosteronu, warfaryny). Miarą aktywności konkretnych enzymów cytochromu P450 była ilość powstającego w czasie inkubacji metabolitu:

- 1'-hydroksybufuralolu (CYP2D)
- 2α - i 16α -hydroksytestosteronu (CYP2C11)
- 2β - i 6β -hydroksytestosteronu (CYP3A)
- 7α -hydroksytestosteronu (CYP2A)
- 16β -hydroksytestosteronu (CYP2B)
- 7-hydroksywarfaryny (CYP2C6)

- kwasu 1,3,7-trimetylomoczwowego, paraksantyny, teobrominy (CYP1A).

6.1 Metabolizm bufuralolu (CYP2D)

Do pomiaru aktywności wątrobowych enzymów z podrodziny CYP2D wykorzystywano specyficzną reakcję 1'-hydroksylacji bufuralolu (Hiroi i wsp. 2001; Haduch i wsp. 2022). Mieszanina inkubacyjna przygotowywana na lodzie zawierała:

- 2 mM bufor fosforanowy (pH 7,4)
- 4 mM MgCl₂
- 1,6 mM NADP
- 5 mM glukozy-6-fosforan
- 2,5 U/próbkę dehydrogenazy glukozy-6-fosforanu
- 0,5 mg białka mikrosomalnego/mL mieszaniny inkubacyjnej
- 5 μM bufuralol (specyficzny substrat).

Reakcję rozpoczynano wprowadzeniem do mieszaniny inkubacyjnej bufuralolu, a następnie próbki o końcowej objętości 0,4 mL inkubowano przez 10 min w łaźni wodnej o temperaturze 37 °C, z wytrząsaniem. Reakcję zatrzymywano poprzez strącenie białka, dodaniem 30 μL 70% HClO₄, a próbkę umieszczano w lodzie. Następnie próbki odwirowywano (10 000 × g, 10 min, 4 °C), a otrzymany supernatant przenoszono do nowej próbki Eppendorfa i przechowywano do czasu oznaczenia w -20 °C. Stężenie bufuralolu i 1'-hydroksybufuralolu oznaczano z wykorzystaniem wysokosprawnego chromatografu cieczowego z detekcją fluorymetryczną, przy zachowaniu zastępujących parametrów:

- faza stacjonarna – kolumna Econosphere C18 (5 μm, 250 mm × 4,6 mm)
- faza ruchoma – 40% acetonitryl z dodatkiem 0,75 mL trietyloaminy (pH 3,0)
- temperatura termostatu – 50 °C
- fala wzbudzenia i emisji – 252 nm, 302 nm
- przepływ – 1,0 mL/min w czasie 0–6 min, 1,8 mL/min w czasie 6,1–11 min, 1,0 mL/min w czasie 11,1–12 min
- czasy retencji – 1'-hydroksybufuralol 4,5 min oraz bufuralol 7,9 min.

Stężenie badanych analitów wyznaczano na podstawie standardów zewnętrznych.

6.2 Metabolizm kofeiny (CYP1A)

Do pomiaru aktywności enzymów z podrodziny CYP1A zastosowano metabolizm kofeiny, ze szczególnym uwzględnieniem procesu 8-hydroksylacji jako specyficznej reakcji dla enzymu CYP1A u szczura (Kot i Daniel 2008). Mieszanina inkubacyjna przygotowywana na lodzie zawierała:

- 0,15 mM bufor fosforanowy (pH 7,4)
- 1 mg białka mikrosomalnego/mL mieszaniny inkubacyjnej
- 100 μ M kofeinę (specyficzny substrat)
- 1,5 mM NADPH.

Reakcję rozpoczynano wprowadzeniem do mieszaniny inkubacyjnej NADPH, a następnie próbki o końcowej objętości 1 mL inkubowano przez 50 min w łaźni wodnej o temperaturze 37 °C, z wytrząsaniem. Reakcję zatrzymywano poprzez dodanie 700 μ L 2% ZnSO₄ i 50 μ L 2M HCl, a próbkę umieszczano w lodzie. Następnie próbki odwirowywano (2 500 \times g, 10 min, 4 °C), a z otrzymanego supernatantu ekstrahowano kofeinę i jej metabolity przy użyciu 6 mL mieszaniny octanu etylu i izopropanolu w stosunku objętościowym 8:1 (v/v). Oddzieloną warstwę organiczną po ekstrakcji odparowywano w strumieniu azotu, a uzyskany suchy osad rozpuszczano w 100 μ L mobilnej fazy chromatograficznej. Stężenie kofeiny i jej metabolitów (kwas 1,3,7-trimetylomoczowy, paraksantyna, teobromina, teofilina) oznaczano z wykorzystaniem wysokosprawnego chromatografu cieczowego z detekcją UV, przy zachowaniu zastępujących parametrów:

- faza stacjonarna – kolumna Supelcosil LC-18 (5 μ m, 150 mm \times 4,6 mm)
- faza ruchoma – 0,01 M bufor octanowy (pH 5,0) zmieszany z metanolem w stosunku objętościowym 91:9 (v/v)
- temperatura termostatu – 30 °C
- długość fali – 270 nm
- przepływ – 1,2 mL/min w czasie 0–12 min, 1,0 mL/min w czasie 12,1–17 min, 3,0 mL/min w czasie 17,1–27 min, 1,2 mL/min w czasie 27,1–28 min
- czasy retencji – teobromina 8,5 min, paraksantyna 14,0 min, teofilina 15,1 min, kwas 1,3,7-trimetylomoczowy 18,9 min, kofeina 25 min.

Stężenie badanych analitów wyznaczano na podstawie standardów zewnętrznych. Oznaczony poziom teofiliny nie został uwzględniony w dalszych analizach, ponieważ w jej powstawaniu z kofeiny kluczową rolę odgrywają enzymy podrodziny CYP2C (Kot i Daniel 2008).

6.3 Metabolizm testosteronu (CYP2A, CYP2B, CYP2C11, CYP3A) – *ex vivo*

Do pomiaru aktywności enzymów CYP2A, CYP2B, CYP2C11, CYP3A w mikrosomach wątrobowych zwierząt traktowanych wielokrotnie CP-101,606 lub solą fizjologiczną wykorzystano metabolizm testosteronu (Haduch i wsp. 2006, 2008; Wójcikowski i wsp. 2013). Mieszanina inkubacyjna przygotowywana na lodzie zawierała:

- 50 mM bufor fosforanowy (pH 7,4)
- 3 mM MgCl₂
- 1 mM NADP
- 1 mM EDTA
- 5 mM glukozy-6-fosforan
- 1,55 U/próbkę dehydrogenazy glukozy-6-fosforanu
- 1 mg białka mikrosomalnego/mL mieszaniny inkubacyjnej
- 100 μM testosteron (specyficzny substrat).

Reakcję rozpoczynano wprowadzeniem do mieszaniny inkubacyjnej testosteronu, a następnie próbki o końcowej objętości 1 mL inkubowano przez 15 min w łaźni wodnej o temperaturze 37 °C, z wytrząsaniem. Reakcję zatrzymywano poprzez dodanie 200 μL metanolu, a próbkę umieszczano w lodzie. Następnie testosteron i jego metabolity ekstrahowano przy użyciu 6 mL dichlorometanu. Oddzieloną warstwę organiczną po ekstrakcji odparowywano w strumieniu azotu, a uzyskany suchy osad rozpuszczano w 100 μL 50% metanolu. Stężenie testosteronu i jego metabolitów (2α-, 2β-, 6β-, 7α-, 16α-, 16β-hydroksytestosteron) oznaczano z wykorzystaniem wysokosprawnego chromatografu cieczowego z detekcją UV, przy zachowaniu zastępujących parametrów:

- faza stacjonarna – kolumna Supelcosil LC-18 (5 μm, 150 mm × 4,6 mm)

- faza ruchoma – faza A: metanol/woda/acetonitryl (39:60:1, v/v/v), faza B: metanol/woda/acetonitryl (80:18:2, v/v/v)
- temperatura termostatu – 40 °C
- długość fali – 254 nm
- przepływ i gradient – 1,5 mL/min, skład fazy ruchomej zmieniał się w czasie, zawartość fazy B wzrastała liniowo do 70% w 22 min, później do 24 min skład fazy wracał do warunków początkowych
- czasy retencji – 6 β -OH-testosteron 6,5 min, 7 α -OH-testosteron 7,1 min, 16 α -OH-testosteron 8,5 min, 16 β -OH-testosteron 9,3 min, 2 α -OH-testosteron 11,0 min, 2 β -OH-testosteron 11,6 min, testosteron 15,7 min.

Stężenie badanych analitów wyznaczano na podstawie standardów zewnętrznych.

6.4 Metabolizm testosteronu (CYP2A, CYP2B, CYP2C11, CYP3A) – *in vitro*

Metabolizm testosteronu *in vitro* przeprowadzono analogicznie jak w podrozdziale 6.3, z tym, że mikrosomy wątrobowe pochodziły od zwierząt nie traktowanych *in vivo* związkiem CP-101,606. Natomiast związek ten wprowadzono do środowiska reakcji w trzech wybranych stężeniach: 10 μ M, 50 μ M, 100 μ M. Grupa kontrolna zawierała rozpuszczalnik w postaci 0,9% NaCl. Po preinkubacji przez okres 0, 15 lub 30 minut, rozpoczęto standardową 15 minutową inkubację poprzez dodanie do mieszaniny inkubacyjnej testosteronu. Pozostałe parametry przygotowania próbek oraz analizy ilościowej pozostały jak wyżej.

6.5 Metabolizm warfaryny (CYP2C6)

Do pomiaru aktywności enzymu CYP2C6 wykorzystywano reakcję 7-hydroksylacji warfaryny (Daniel i wsp. 2006). Mieszanina inkubacyjna przygotowywana na lodzie zawierała:

- 20 mM bufor Tris/KCl (pH 7,4)
- 2,5 mM MgCl₂
- 0,33 mM NADP
- 7,85 mM glukozy-6-fosforan
- 5,6 U/próbkę dehydrogenazy glukozy-6-fosforanu
- 1 mg białka mikrosomalnego/mL mieszaniny inkubacyjnej

- 60 μM warfaryny (specyficzny substrat).

Reakcję rozpoczynano wprowadzeniem do mieszaniny inkubacyjnej warfaryny, a następnie próbki o końcowej objętości 0,5 mL inkubowano przez 15 min w łaźni wodnej o temperaturze 37 °C, z wytrząsaniem. Reakcję zatrzymywano poprzez strącenie białka, dodaniem 10 μL 70% HClO_4 , a próbkę umieszczano w lodzie. Następnie próbki odwirowywano (10 000 \times g, 10 min, 4 °C), a otrzymany supernatant przenoszono do nowej próbki Eppendorfa i przechowywano do czasu oznaczenia w –20 °C. Stężenie warfaryny i 7-hydroksywarfaryny oznaczano z wykorzystaniem wysokosprawnego chromatografu cieczowego z detekcją fluorymetryczną, przy zachowaniu zastępujących parametrów:

- faza stacjonarna – kolumna Supelcosil LC-18 (5 μm , 150 mm \times 4,6 mm)
- faza ruchoma – 0,25% H_3PO_4 zmieszany z acetonitrylem w stosunku objętościowym 62:38 (v/v)
- temperatura termostatu – 40 °C
- fala wzbudzenia i emisji – 320 nm, 415 nm
- przepływ – 2,0 mL/min w czasie 0–8 min
- czasy retencji – 7-hydroksywarfaryny 3 min oraz warfaryny 5,7 min.

Stężenie badanych analitów wyznaczano na podstawie standardów zewnętrznych.

7. Pomiar stężenia białka całkowitego w mikrosomach wątrobowych metodą BCA

Do oznaczenia ogólnego poziomu białka w mikrosomach wątrobowych wykorzystano zestaw PierceTM BCA Protein Assay Kit. Oznaczenie wykonano zgodnie z zaleceniami producenta, stosując jako standard albuminę surowicy bydlęcej. Pomiar absorbancji przeprowadzono w czytniku mikroplitek przy długości fali 562 nm.

8. Oznaczenie poziomu białka wybranych enzymów cytochromu P450 w mikrosomach wątroby techniką Western blotting

Oznaczanie poziomu białka enzymów cytochromu P450 wykonywano stosując technikę Western blotting. W tym celu przygotowano próbki poprzez zmieszanie 5 μg (CYP1A, 2B, 2C6, 2C11, 2D, 3A) lub 10 μg (CYP2A) białka mikrosomalnego

z buforem Laemmli, w stosunku objętościowym 1:1 (v/v), który umożliwia denaturację i przygotowanie białek do elektroforezy na żelu poliakrylamidowym (SDS-PAGE). Przygotowane w ten sposób próbki zostały poddane denaturacji w temperaturze 100 °C przez 5 min. Próbki oraz standardy w postaci szczurzych (CYP1A1 – 1 µg, CYP1A2 – 3 µg, CYP2A1 – 20 µg, CYP2B1 – 5 µg, CYP2C6 – 0,5 µg, CYP2C11 – 5 µg, CYP3A1 – 2 µg, CYP3A2 – 5 µg) i ludzkich supersomów (CYP2A6 – 2,5 µg, CYP2D6 – 1 µg) naniesiono na przygotowany wcześniej żel SDS-PAGE, składający się z 4% żelu zagęszczającego (4% akrylamid, 0,25 M Tris-HCl o pH 6,8, 0,2% SDS, 0,1% APS i 0,1% TEMED) oraz 12% żelu rozdzielającego (12% akrylamid, 0,75 M Tris-HCl o pH 8,8, 0,2% SDS, 0,1% APS i 0,1% TEMED), w komorze do elektroforezy. Elektroforezę prowadzono w buforze elektroforetycznym (25 mM Tris, 192 mM glicyna, 0,1% SDS) przez 15 minut przy napięciu 90 V, a później przez kolejne 75 min przy napięciu 130 V. Po rozdziale białka przenoszono na membranę nitrocelulozową z wykorzystaniem sprzętu do transferu półsuchego przez 10 minut, przy ustawieniach: natężenie 2,5 A, napięcie 25 V, w trybie dla białek o wysokiej masie cząsteczkowej, oraz buforu transferowego (25 mM Tris, 192 mM glicyna, 20% metanol). Membrany z przeniesionymi białkami blokowano przez 15 h w 5% roztworze mleka odtłuszczonego w buforze płuczającym (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1% Tween 20, pH 7,6). Po intensywnym odplukaniu membrany inkubowano z odpowiednimi przeciwciałami I-rzędowymi przez około 1 h, a później II-rzędowymi przez około 1h, po każdym etapie odplukując membrany w buforze płuczającym. Wykorzystane stężenia przeciwciał podano w tabeli 3.

Do immunodetekcji wykorzystywano komercyjny zestaw do detekcji białek zgodnie z zaleceniami producenta oraz wysokoczuły analizator obrazów chemiluminescencyjnych i luminescencyjnych. Po przeprowadzeniu analizy dla enzymów cytochromu P450, membrany odplukiwano w buforze do odzyskiwania membran (0,2 M glicyna, 0,0035 M SDS, 1% Tween 20, pH 2,2) oraz buforze płuczającym i blokującym, a następnie przeprowadzano analogicznie jak wcześniej immunodetekcję β -aktyny, użytej jako białko referencyjne.

Tabela 3. Przeciwciała I- i II-rzędowe oraz ich stężenia wykorzystane do immunodetekcji poziomów białka enzymów CYP oraz β -aktyny.

CYP	I-rzędowe przeciwciała		II-rzędowe przeciwciała	
	typ	stężenie	typ	stężenie
1A1/1A2	monoklonalne mysie / poliklonalne królicze	1:1000	królicze anty-mysie (HRP) / kozie anty- królicze (HRP)	1:2000
2A	poliklonalne królicze	1:1000	kozy anty-królicze (HRP)	1:4000
2B1/2B2	monoklonalne mysie	1:2000	królicze anty-mysie (HRP)	1:2000
2C6	monoklonalne mysie	1:2000	królicze anty-mysie (HRP)	1:2000
2C11	poliklonalne królicze	1:4000	kozy anty-królicze (HRP)	1:4000
2D6	poliklonalne królicze	1:4000	kozy anty-królicze (HRP)	1:2000
3A4	poliklonalne królicze	1:2000	kozy anty-królicze (HRP)	1:2000
β -aktyna	monoklonalne mysie	1:10 000	królicze anty-mysie (HRP)	1:2000

9. Oznaczenie poziomu mRNA wybranych genów *CYP* w wątrobie techniką RT-PCR

Celem oznaczenia poziomu mRNA wybranych genów *CYP* przeprowadzono izolację całkowitego RNA z 25–30 mg zamrożonej wątroby przy użyciu komercyjnego zestawu Total RNA Mini zgodnie z zaleceniami producenta. Następnie sprawdzano jakość (stosunek absorbancji A260/A280 oraz A260/A230) i stężenie otrzymanego RNA przy użyciu spektrofotometrycznego czytnika mikroplitek. W kolejnym etapie przeprowadzono reakcję odwrotnej transkrypcji, stosując komercyjny zestaw High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit w końcowej objętości 20 μ L, zawierającej 2 μ g RNA. Reakcję prowadzono kolejno w temperaturach: 25 °C przez

10 min (denaturacja RNA), 37 °C przez 120 min (synteza cDNA), 85 °C przez 5 min (inaktywacja enzymu). Uzyskane cDNA przechowywano w –20 °C do dalszej analizy.

Do przeprowadzenia reakcji PCR wykorzystywano komercyjnie dostępną mieszaninę reakcyjną TaqMan Gene Expression MasterMix oraz testy TaqMan Gene expression assay dla wybranych genów *CYP* oraz *ACTB* jako genu referencyjnego. Reakcja PCR była prowadzona w próbce o końcowej objętości 10 µL, z wykorzystaniem systemu do reakcji PCR w czasie rzeczywistym, według standardowego protokołu termicznego: inkubacja wstępna celem aktywacji enzymu – 95 °C przez 10 minut, 40 cykli składających się z etapu denaturacji (15 s, 95 °C) oraz hybrydyzacji starterów i elongacji (60 s, 60 °C).

10. Oznaczenie poziomu wybranych hormonów

Pomiar stężenia wybranych hormonów (SRIH, GHRH, GH, CRT, T₃, T₄) w surowicy krwi oraz w przysadce mózgowej i w obszarach podwzgórza zwierających PVN lub ARC przeprowadzono przy użyciu gotowych zestawów ELISA (ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*), stosując się do zaleceń producenta. Pomiar absorbancji przeprowadzono w czytniku mikroplamki przy długości fali 450 nm.

11. Analiza statystyczna

Analizę statystyczną uzyskanych wyników oraz opracowanie graficzne przeprowadzono z wykorzystaniem programu GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). W celu oceny istotności różnic pomiędzy grupami zastosowano: test t-Studenta w przypadku porównywania dwóch grup, a w przypadku większej liczby grup przeprowadzono analizę wariancji (ANOVA) z odpowiednimi testami *post hoc* (test Dunnetta lub Tukeya).

V. WYNIKI

1. Wpływ wielokrotnego podawania związku CP-101,606 do komór bocznych mózgu na aktywność i ekspresję cytochromu P450 w wątrobie

Związek CP-101,606 podawano do komór bocznych mózgu szczura przez 5 dni, w 3 dawkach: 6 µg, 15 µg lub 30 µg/mózg (grupę kontrolną stanowiły zwierzęta, którym podawano 0,9% NaCl). Zbadano aktywność wybranych enzymów cytochromu P450 biorących udział w metabolizmie leków w mikrosomach wątrobowych, z wykorzystaniem specyficznych reakcji metabolicznych. Ilość powstałych metabolitów, zmierzonych za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją UV lub fluorymetryczną, przeliczono na mg białka mikrosomalnego na minutę czasu inkubacji.

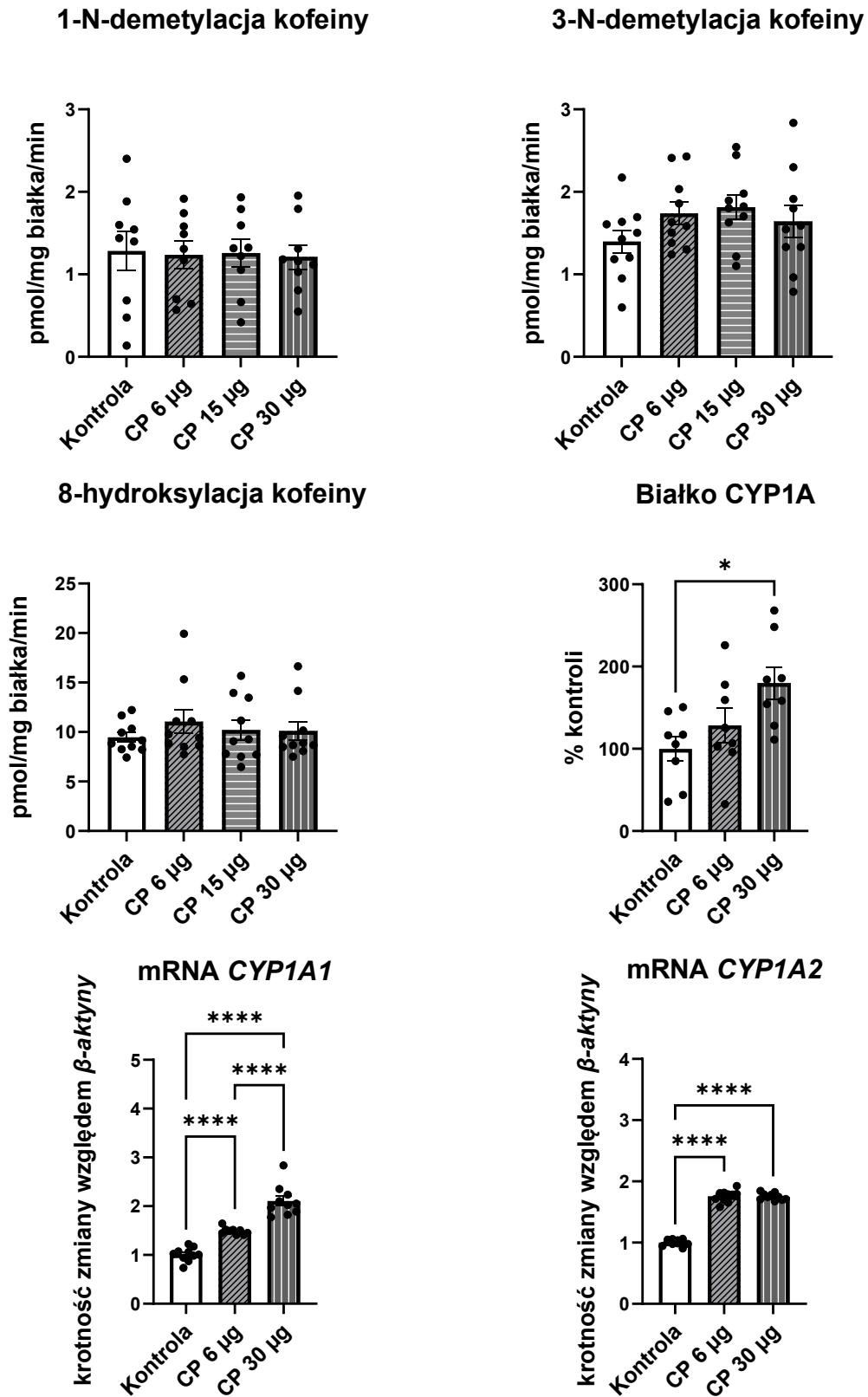
Na podstawie uzyskanych wyników aktywności enzymów cytochromu P450, w kolejnych etapach zbadano wpływ związku CP-101,606, podanego dokomorowo w dawkach 6 µg lub 30 µg/mózg, na poziom białka enzymów cytochromu P450 w mikrosomach wątrobowych. Poziom białka uzyskany techniką Western blotting znormalizowano w odniesieniu do β-aktyny, a wyniki zaprezentowano jako procent kontroli.

W oparciu o zmiany uzyskane w aktywności i poziomie białka enzymów CYP, do dalszego etapu badań wybrano geny *CYP*, dla których zmierzono poziomy mRNA w tkance wątrobowej metodą RT-PCR. Do oceny zmian w poziomie ekspresji wykorzystano porównawczą metodę $\Delta\Delta Ct$ ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) (Livak and Schmittgen 2001), a wyniki zaprezentowano jako względną krotność zmiany ekspresji w odniesieniu do genu referencyjnego β-aktyny (*ACTB*).

1.1 Wpływ podawania CP-101,606 do komór bocznych na aktywność i ekspresję CYP1A

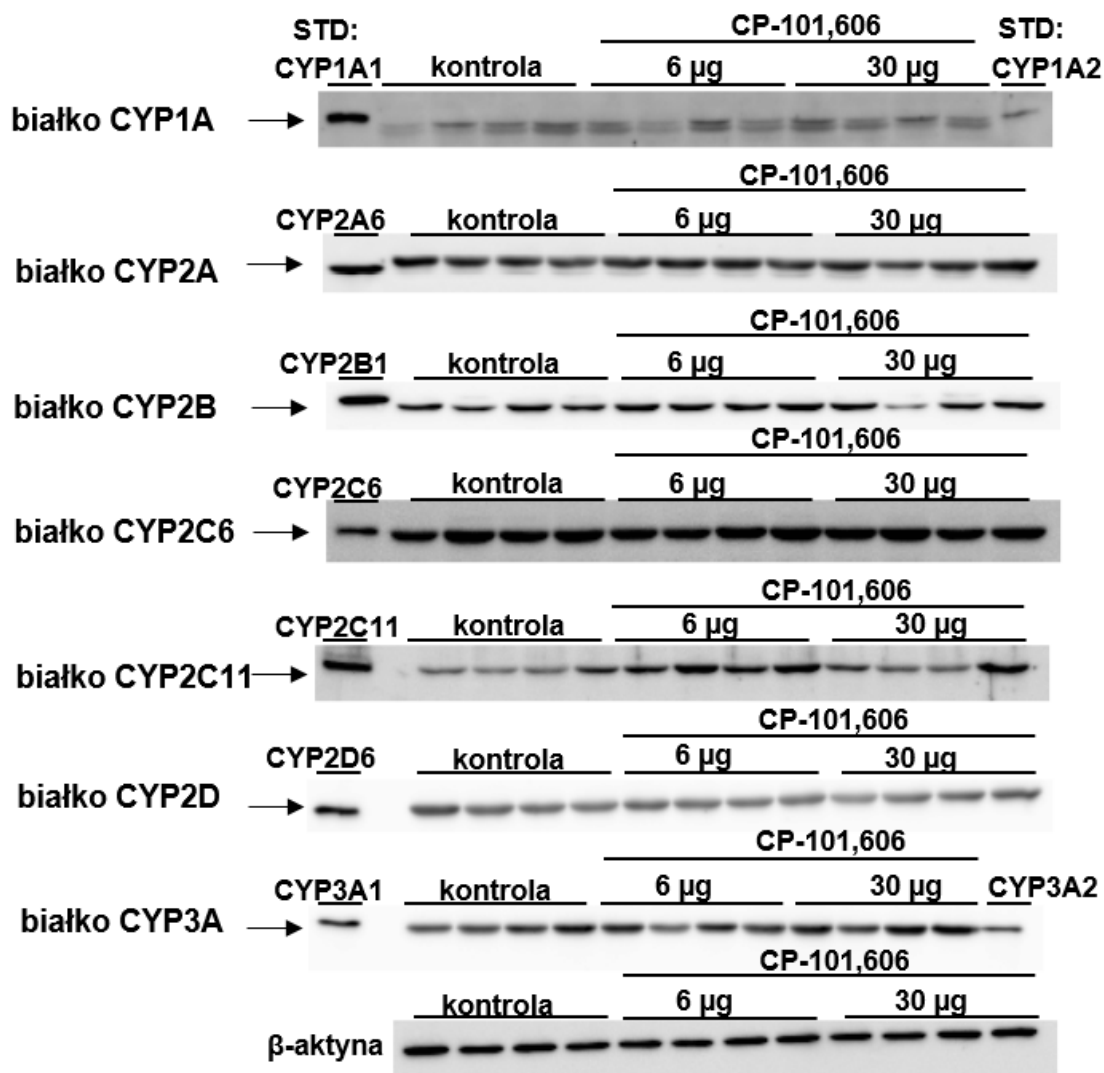
Aktywność podrodziny CYP1A zmierzono na podstawie szybkości metabolizmu kofeiny (Kot i Daniel 2008): szybkości reakcji 8-hydroksylacji (72% udziału CYP1A), a także 3-N-demetylacji (47% udziału CYP1A) i 1-N-demetylacji

(38% udziału CYP1A), dla których nie zaobserwowano istotnych statystycznie zmian (rycina 6).



Rycina 6. Wpływ 5-dniowego podawania związku CP-101,606 (6, 15 lub 30 µg/mózg – aktywność, 6 lub 30 µg/mózg – poziom białka i mRNA) do komórek bocznych mózgu szczura na

aktywność enzymu CYP1A1/2 oraz poziom białka i mRNA. Aktywność CYP1A1/2 mierzono na podstawie szybkości 1-N-demetylacji, 3-N-demetylacji i 8-hydroksylacji kofeiny. Wartości przedstawiono jako średnią \pm SEM ($n = 8-10$). Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z testem *post hoc* Tukeya. Istotność statystyczna została oznaczona następująco: * $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$. CP — CP-101,606.

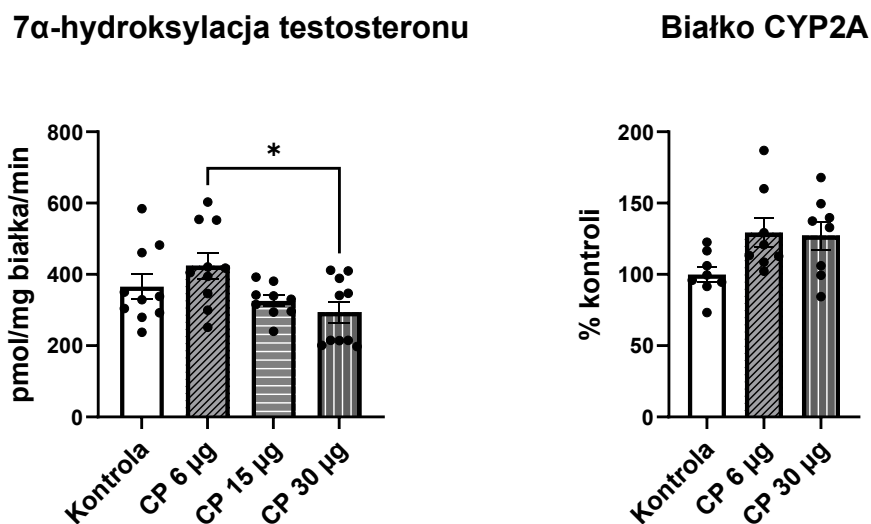


Rycina 7. Wpływ 5-dniowego podawania związku CP-101,606 do komór bocznych mózgu (6 lub 30 µg/mózg) na intensywność prążków białek cytochromu P450 (CYP1A, CYP2A, CYP2B, CYP2C6, CYP2C11, CYP2D, CYP3A) w mikrosomach wątrobowych, uzyskanych techniką Western blotting. Na rycinie przedstawiono reprezentatywne prążki białek CYP; jako standardy wykorzystano szczurze lub ludzkie (CYP2A6, CYP2D6) supersomy. Średnie wartości poziomów poszczególnych białek CYP \pm SEM ($n = 8$ szczurów) zaprezentowano na rycinach 6 oraz 8–13. STD — standard.

W przypadku najwyższej dawki antagonisty podjednostki GluN2B receptora NMDA obserwowano istotny wzrost poziomu białka względem grupy kontrolnej (180%); reprezentatywne prążki przedstawiono na rycinie 7. Jednocześnie, zarówno dawka 6 μg jak i 30 μg antagonisty doprowadziła do statystycznie istotnego wzrostu poziomu mRNA *CYP1A1* – kolejno 148% i 209% oraz *CYP1A2* – kolejno 175% i 175%, w porównaniu z grupą kontrolną (rycina 6). Wzrost poziomu mRNA *CYP1A1* obserwowany po dawce 6 μg antagonisty był wyraźnie niższy niż obserwowany po dawce 30 μg . Jednakże w przeciwieństwie do *CYP1A1*, nie zaobserwowano istotnej różnicy w poziomach mRNA *CYP1A2* między grupami, w których zastosowano różne dawki antagonisty.

1.2 Wpływ podawania CP-101,606 do komór bocznych na aktywność i ekspresję CYP2A

Aktywność CYP2A, mierzona na podstawie szybkości reakcji 7 α -hydroksylacji testosteronu, była podwyższona po najniższej dawce antagonisty, względem dawki najwyższej (wartość procentowa względem grupy kontrolnej: 6 μg – 116%, 15 μg – 89%, 30 μg – 80%). Ponieważ nie obserwowano istotnych zmian w poziomie białka enzymu (ryciny 7 i 8), nie przeprowadzono dalszej analizy molekularnej w kierunku pomiaru mRNA.



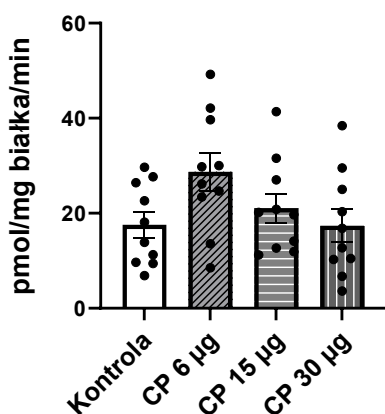
Rycina 8. Wpływ 5-dniowego podawania związku CP-101,606 (6, 15 lub 30 $\mu\text{g}/\text{m}\ddot{\text{o}}\text{zg}$ – aktywność, 6 lub 30 $\mu\text{g}/\text{m}\ddot{\text{o}}\text{zg}$ – poziom białka i mRNA) do komór bocznych mózgu szczura na aktywność enzymu CYP2A oraz poziom białka. Aktywność CYP2A mierzono na podstawie szybkości 7 α -hydroksylacji testosteronu. Wartości przedstawiono jako średnią \pm SEM

(n = 8–10). Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z testem *post hoc* Tukeya. Istotność statystyczna została oznaczona następująco: * p < 0,05. CP — CP-101,606.

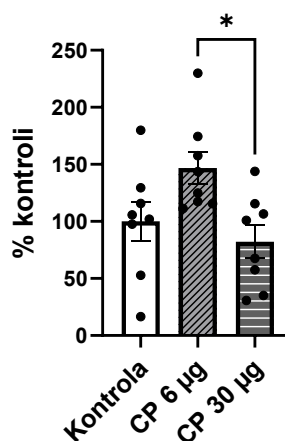
1.3 Wpływ podawania CP-101,606 do komór bocznych na aktywność i ekspresję CYP2B

Aktywność CYP2B zmierzono na podstawie szybkości reakcji 16 β -hydroksylacji testosteronu i nie stwierdzono istotnie statystycznych zmian. Wartości procentowe względem grupy kontrolnej wyniosły kolejno: 6 μ g – 164%, 15 μ g – 120%, 30 μ g – 99% (rycina 9).

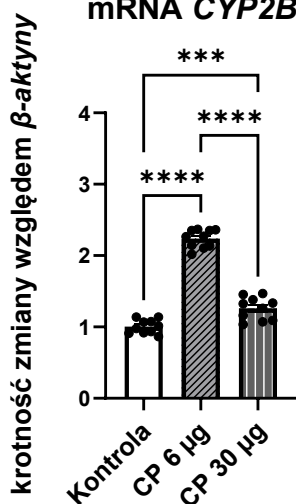
16 β -hydroksylacja testosteronu



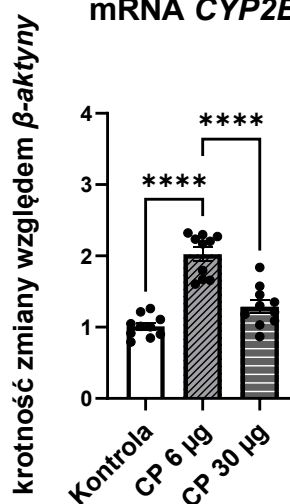
Białko CYP2B



mRNA CYP2B1



mRNA CYP2B2



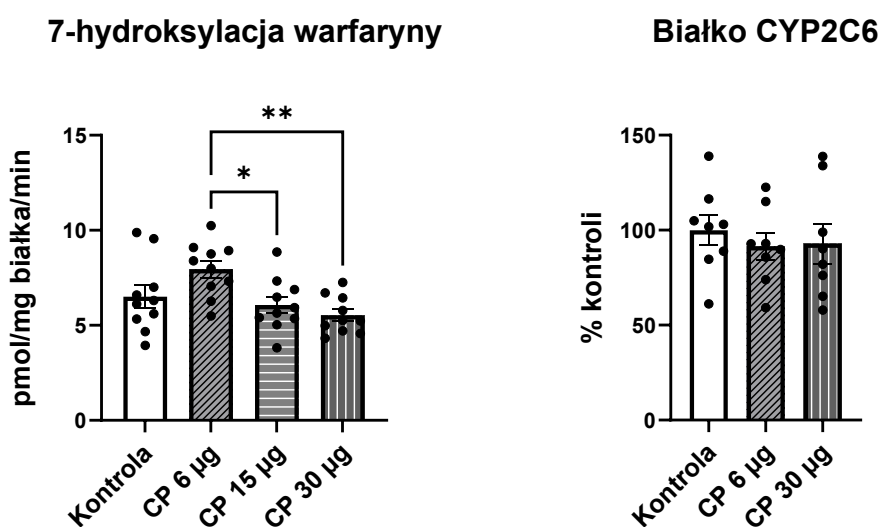
Rycina 9. Wpływ 5-dniowego podawania związku CP-101,606 (6, 15 lub 30 μ g/mózg – aktywność, 6 lub 30 μ g/mózg – poziom białka i mRNA) do komór bocznych mózgu szczura na aktywność enzymu CYP2B oraz poziom białka i mRNA. Aktywność CYP2B mierzono na podstawie szybkości 16 β -hydroksylacji testosteronu. Wartości przedstawiono jako średnią

± SEM (n = 8–10). Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z testem *post hoc* Tukeya. Istotność statystyczna została oznaczona następująco: * p < 0,05; *** p < 0,001; **** p < 0,0001. CP — CP-101,606.

Poziom białka CYP2B był podwyższony po najniższej dawce CP-101,606, względem dawki najwyższej, wartość procentowa względem grupy kontrolnej wyniosła kolejno: 6 µg – 147%, 30 µg – 82% (ryciny 7 i 9). Dawka 6 µg antagonisty spowodowała wyraźny wzrost poziomu mRNA *CYP2B1* – 223% i *CYP2B2* – 200% względem kontroli. Natomiast po dawce 30 µg obserwowano istotnie niższy poziom mRNA, zarówno *CYP2B1* jak i *CYP2B2*, względem dawki 6 µg (wartość procentowa po dawce 30 µg względem kontroli kolejno – 125% i 128%). Jednocześnie poziom mRNA *CYP2B1* po najwyższej dawce antagonisty był istotnie wyższy względem kontroli (rycina 9).

1.4 Wpływ podawania CP-101,606 do komór bocznych na aktywność i ekspresję CYP2C6

Aktywność CYP2C6 zmierzono na podstawie szybkości reakcji 7-hydroksylacji warfaryny i zaobserwowano, że najniższa dawka antagonisty spowodowała wyższą aktywność CYP2C6 w stosunku do dawek 15 µg i 30 µg. Wartości procentowe względem grupy kontrolnej wyniosły kolejno: 6 µg – 122%, 15 µg – 93%, 30 µg – 85% (rycina 10). Nie stwierdzono zmian w poziomie białka (rycina 7 i 10), wobec czego nie przeprowadzono dalszej analizy mRNA.

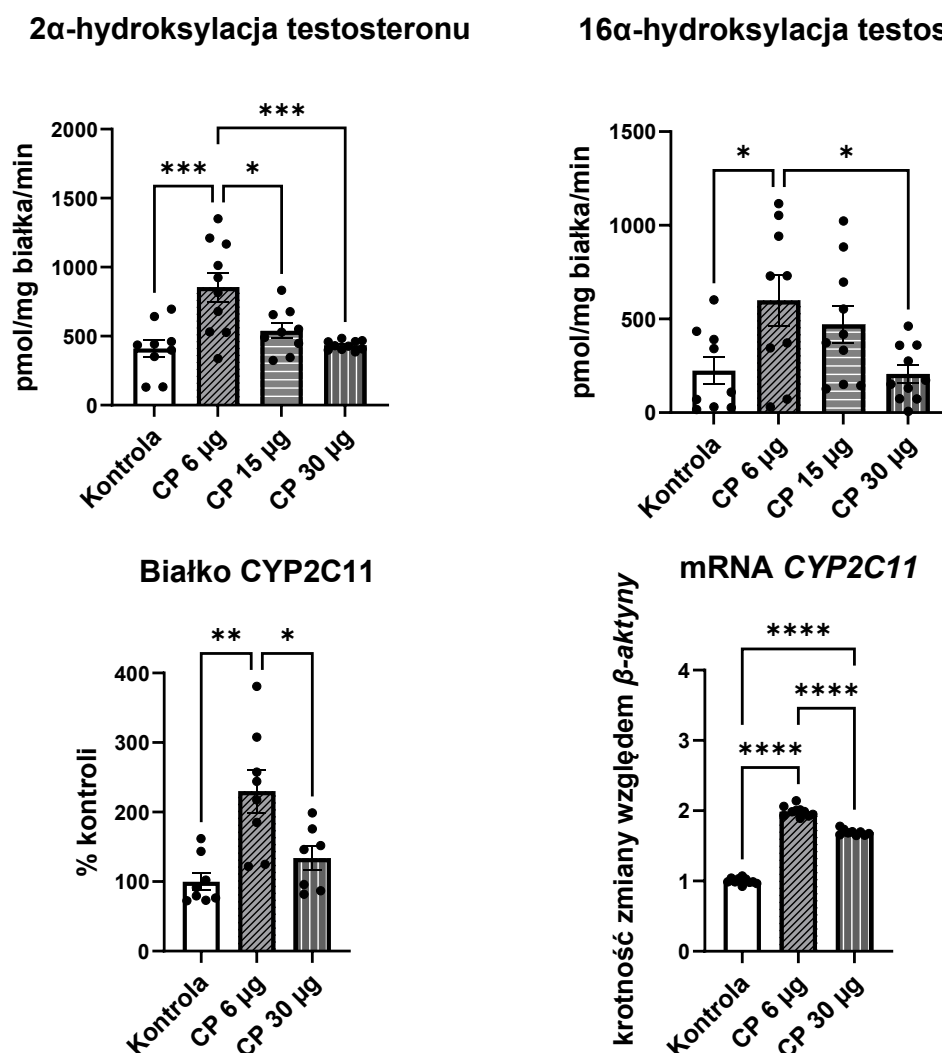


Rycina 10. Wpływ 5-dniowego podawania związku CP-101,606 (6, 15 lub 30 µg/mózg – aktywność, 6 lub 30 µg/mózg – poziom białka i mRNA) do komór bocznych mózgu szczura na

aktywność enzymu CYP2C6 oraz poziom białka. Aktywność CYP2C6 mierzono na podstawie szybkości 7-hydroksylacji warfaryny. Wartości przedstawiono jako średnią \pm SEM (n = 8–10). Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z testem *post hoc* Tukeya. Istotność statystyczna została oznaczona następująco: * p < 0,05; ** < 0,01. CP — CP-101,606.

1.5 Wpływ podawania CP-101,606 do komór bocznych na aktywność i ekspresję CYP2C11

Aktywność CYP2C11 zmierzono na podstawie szybkości reakcji 2 α - oraz 16 α -hydroksylacji testosteronu (rycina 11).



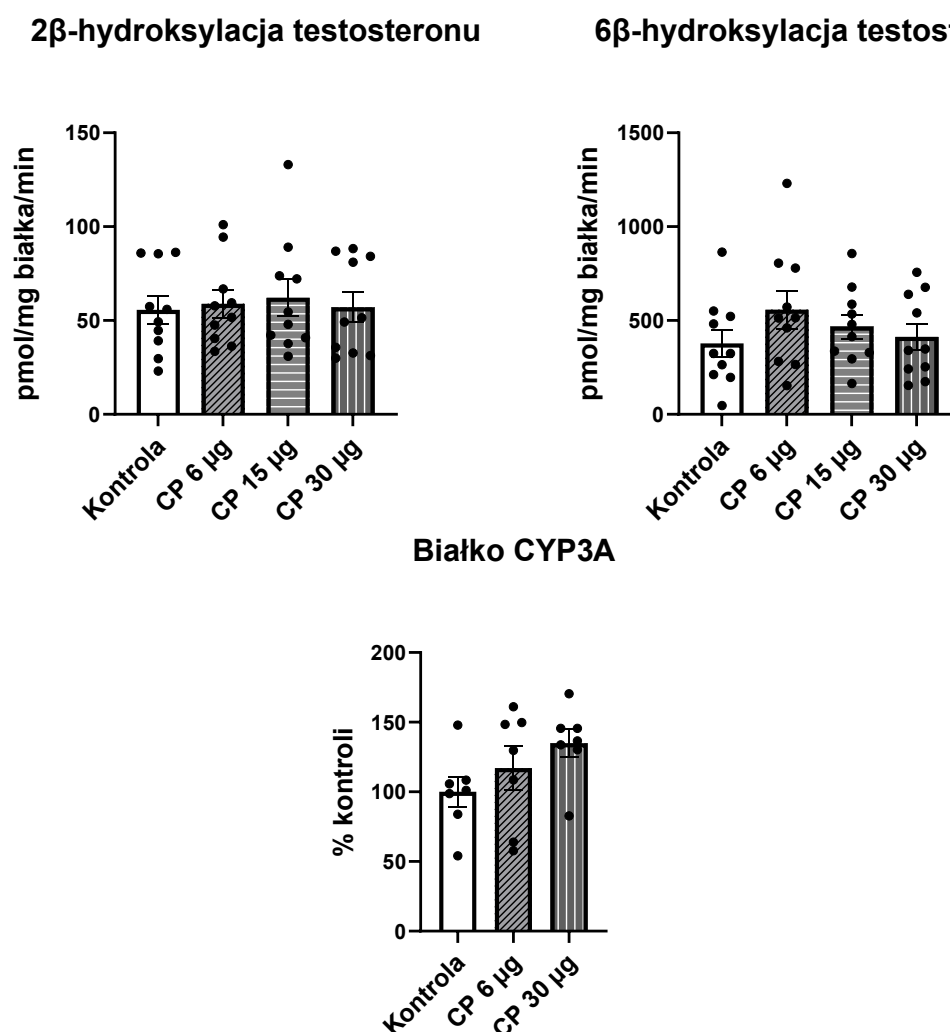
Rycina 11. Wpływ 5-dniowego podawania związku CP-101,606 (6, 15 lub 30 μ g/mózg – aktywność, 6 lub 30 μ g/mózg – poziom białka i mRNA) do komór bocznych mózgu szczura na aktywność enzymu CYP2C11 oraz poziom białka i mRNA. Aktywność CYP2C11 mierzono na podstawie szybkości 2 α - oraz 16 α -hydroksylacji testosteronu. Wartości przedstawiono jako

(ANOVA) z testem *post hoc* Tukeya. Istotność statystyczna została oznaczona następująco:
* $p < 0,05$. CP — CP-101,606.

Stwierdzono wyższy poziom aktywności CYP2D po dawce 6 μg w stosunku do dawki 30 μg . Wartości procentowe względem grupy kontrolnej wyniosły kolejno: 6 μg – 122%, 15 μg – 93%, 30 μg – 85%. Ponieważ nie stwierdzono zmian w poziomie białka (rycina 7 i 12), nie przeprowadzono dalszej analizy mRNA.

1.7 Wpływ podawania CP-101,606 do komór bocznych na aktywność i ekspresję CYP3A

Na podstawie reakcji 2 β - oraz 6 β -hydroksylacji testosteronu oceniono aktywność podrodziny CYP3A, nie stwierdzając istotnych zmian pod wpływem badanego związku (rycina 13). Nie obserwowano również istotnych zmian w poziomie białka enzymu (rycina 7 i 13).



Rycina 13. Wpływ 5-dniowego podawania związku CP-101,606 (6, 15 lub 30 $\mu\text{g}/\text{mózg}$ – aktywność, 6 lub 30 $\mu\text{g}/\text{mózg}$ – poziom białka i mRNA) do komór bocznych mózgu szczura na

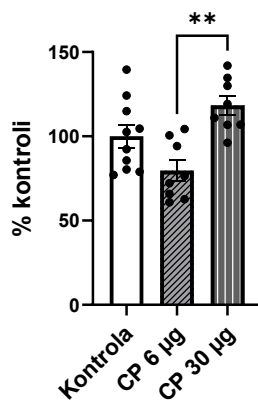
aktywność enzymu CYP3A oraz poziom białka. Aktywność CYP3A mierzono na podstawie szybkości 2 β - oraz 6 β -hydroksylacji testosteronu. Wartości przedstawiono jako średnią \pm SEM (n = 8–10). Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z testem *post hoc* Tukeya. CP — CP-101,606.

1.8 Wpływ podawania CP-101,606 do komór bocznych na poziom hormonów

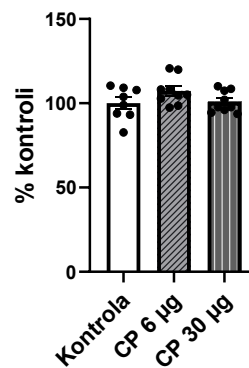
Zmiany w poziomie hormonów po 5-dniowym podawaniu związku CP-101,606 do komór bocznych mózgu szczura przedstawiono na rycinie 14. Poziom somatostatyny oraz GHRH zmierzono w przysadce mózgowej. Zaobserwowano, iż dawka 6 μ g antagonisty powodowała istotne statystycznie obniżenie poziomu somatostatyny względem dawki 30 μ g, a względem kontroli nieistotną statystycznie tendencję spadkową. Wartości procentowe względem grupy kontrolnej wyniosły kolejno: 6 μ g – 80%, 30 μ g – 118%. Nie stwierdzono istotnych zmian w poziomie GHRH.

W surowicy krwi zbadano poziom hormonu wzrostu, kortykosteronu oraz hormonów tarczycy. W przypadku hormonu wzrostu zauważono istotnie wyższy poziom GH po najniższej dawce antagonisty względem dawki najwyższej, oraz tendencję wzrostową względem grupy kontrolnej. Wartości procentowe względem grupy kontrolnej wyniosły kolejno: 6 μ g – 127%, 30 μ g – 78%. Zmiany te były odwrotne do tych, obserwowanych w przypadku somatostatyny, która negatywnie reguluje wydzielanie GH. Poziom kortykosteronu w surowicy krwi był obniżony po obu dawkach CP-101,606 względem kontroli, kolejno 6 μ g – 84%, 30 μ g – 77%, jednocześnie nie stwierdzono zmian poziomu hormonów T₃ i T₄.

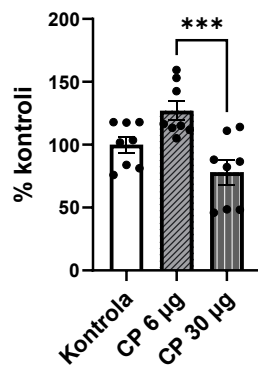
Poziom somatostatyny (SRIH)



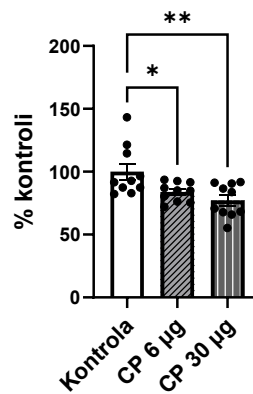
Poziom hormonu uwalniającego hormon wzrostu (GHRH)



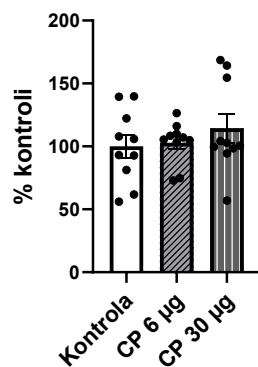
Poziom hormonu wzrostu (GH)



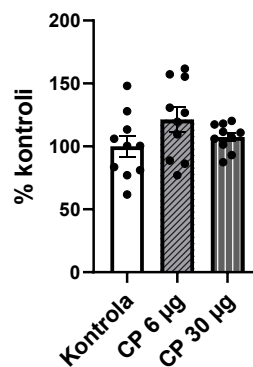
Poziom kortykosteronu (CRT)



Poziom trójdotyroniny (T₃)



Poziom tyroksyny (T₄)



Rycina 14. Wpływ 5-dniowego, dokomorowego podawania związku CP-101,606, w dwóch wybranych dawkach (6 lub 30 µg/mózg) na poziomy hormonów przysadkowych (Pit): SRIH i GHRH, oraz hormonów w surowicy krwi: GH, CRT, T₃, T₄. Dane przedstawiono jako średnią ± SEM (n = 8–10). Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z testem *post hoc* Tukeya. Istotność statystyczną oznaczono następująco: * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001. Bezwzględne wartości kontrolne wynosiły odpowiednio:

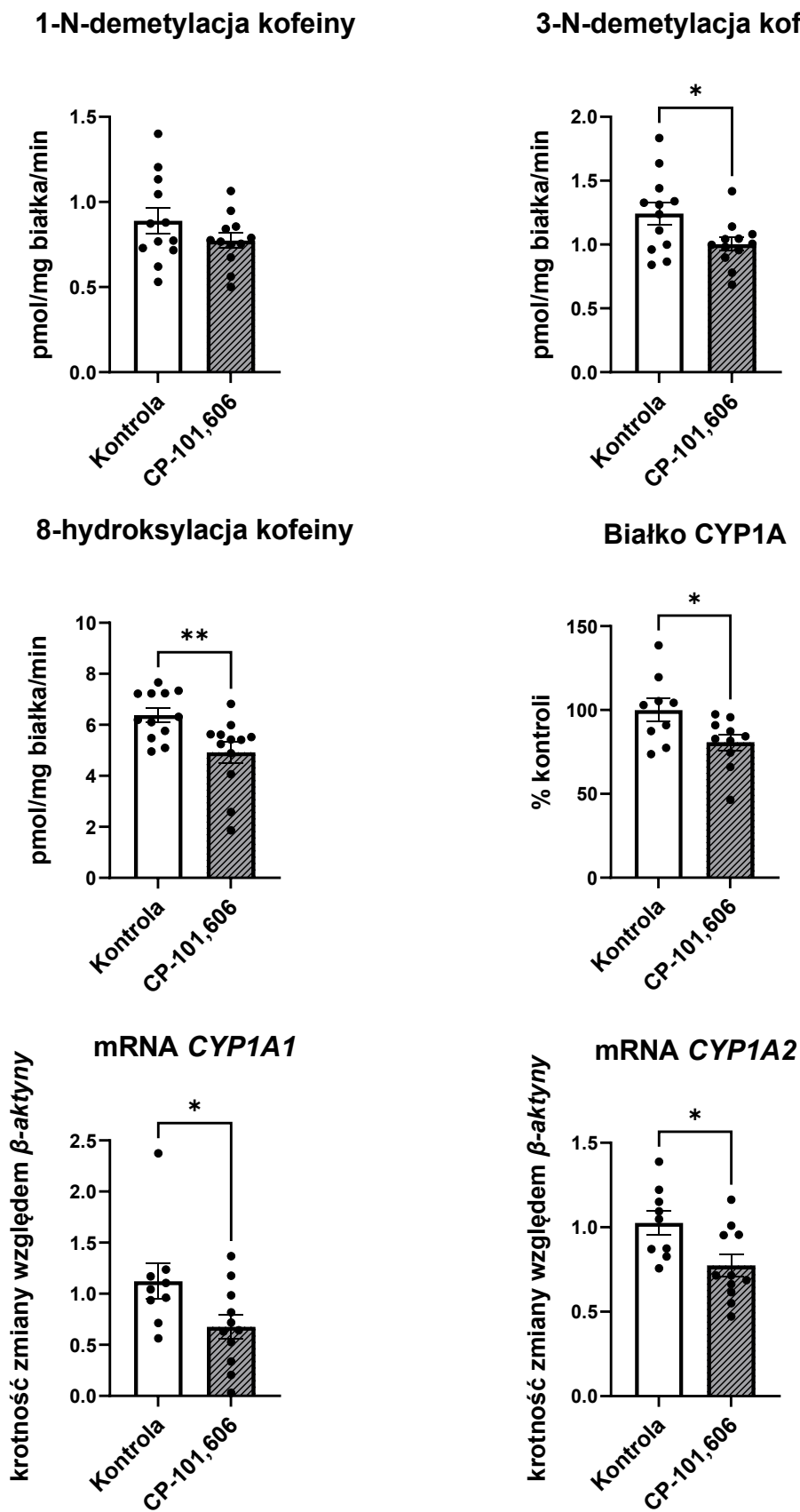
1,8 ± 0,1 ng/g (SRIH – Pit), 15,0 ± 0,9 ng/g (GHRH – Pit), 214,7 ± 13,3 pg/mL (GH), 460 ± 29 ng/mL (CRT), 0,74 ± 0,06 ng/mL (T₃), 63,2 ± 4,6 ng/mL (T₄). CP — CP-101,606.

2. Wpływ wielokrotnego podawania związku CP-101,606 do jąder przykomorowych podwzgórza na aktywność i ekspresję cytochromu P450 w wątrobie

Po 5-dniowym podawaniu związku CP-101,606 do jąder przykomorowych podwzgórza w dawce 3 µg/mózg, podobnie jak w przypadku podań do komórek bocznych mózgu szczura, zbadano aktywność oraz poziom białka wybranych enzymów cytochromu P450 w szczurzych mikrosomach wątrobowych. W oparciu o zmiany uzyskane w aktywności i poziomie białka enzymów CYP, do dalszego etapu badań wybrano geny *CYP*, dla których zmierzono poziomy mRNA.

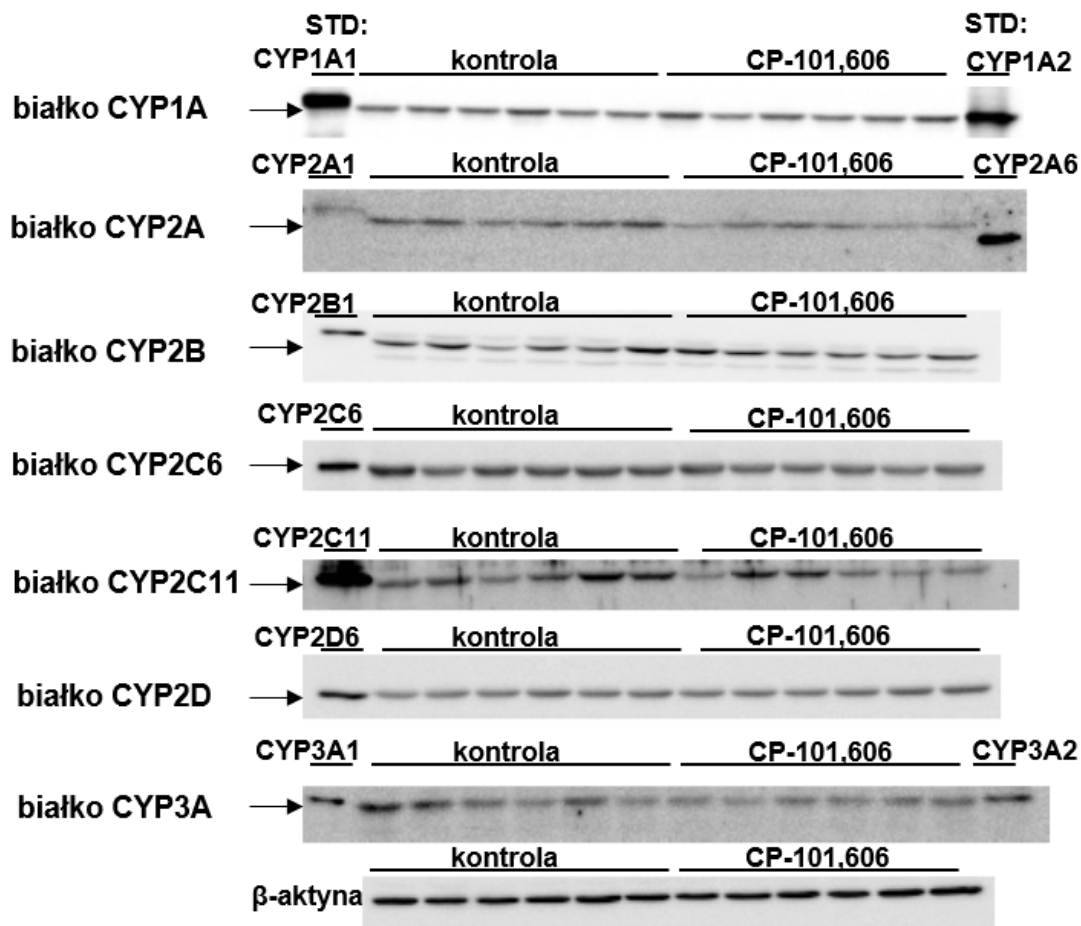
2.1 Wpływ podawania CP-101,606 do jąder przykomorowych na aktywność i ekspresję CYP1A

5-dniowe podawanie związku CP-101,606 w dawce 3 µg do jąder przykomorowych podwzgórza spowodowało istotne statystycznie obniżenie poziomu aktywności CYP1A, mierzonej szybkością reakcji 8-hydroksylacji (81% kontroli) i 3-N-demetylacji (77% kontroli), bez istotnych zmian w przypadku reakcji 1-N-demetylacji kofeiny (87%), co przedstawiono na rycinie 15. Jednocześnie zaobserwowano istotne obniżenie poziomu białka (81%) i mRNA *CYP1A1* (60%) oraz *CYP1A2* (75%) względem grupy kontrolnej (rycina 15 i 16).



Rycina 15. Wpływ 5-dniowego podawania związku CP-101,606 do jąder przykomorowych podwzgórza na aktywność enzymu CYP1A1/2 oraz poziom białka i mRNA. Aktywność CYP1A1/2 mierzono na podstawie szybkości 1-N-demetylacji, 3-N-demetylacji

i 8-hydroksylacji kofeiny. Wartości przedstawiono jako średnią \pm SEM (n = 9–12). Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą testu t-Studenta. Istotność statystyczna została oznaczona następująco: * p < 0,05; ** p < 0,01.

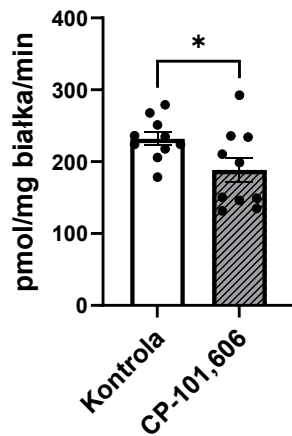


Rycina 16. Wpływ 5-dniowego podawania związku CP-101,606 do jąder przykomorowych podwzgórza na intensywność prążków białek cytochromu P450 (CYP1A, CYP2A, CYP2B, CYP2C6, CYP2C11, CYP2D, CYP3A) w mikrosomach wątrobowych, uzyskanych techniką Western blotting. Na rycinie przedstawiono reprezentatywne prążki białek CYP; jako standardy wykorzystano szczurze lub ludzkie (CYP2A6, CYP2D6) supersomy. Średnie wartości poziomów poszczególnych białek CYP \pm SEM (n = 9–12) zaprezentowano na rycinach 15 oraz 17–22. STD — standard.

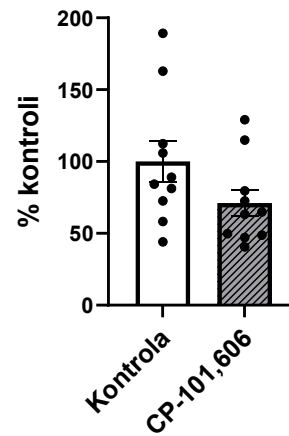
2.2 Wpływ podawania CP-101,606 do jąder przykomorowych na aktywność i ekspresję CYP2A

5-dniowe podawanie związku CP-101,606 w dawce 3 μ g do jąder przykomorowych podwzgórza doprowadziło do obniżenia aktywności CYP2A (81% kontroli), którą zmierzono reakcją 7 α -hydroksylacji testosteronu (rycina 17).

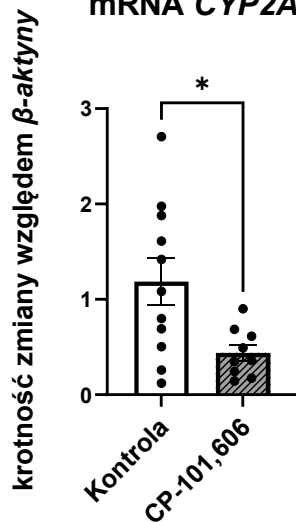
7 α -hydroksylacja testosteronu



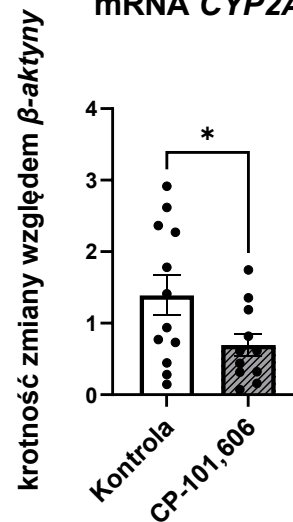
Białko CYP2A



mRNA CYP2A1



mRNA CYP2A2

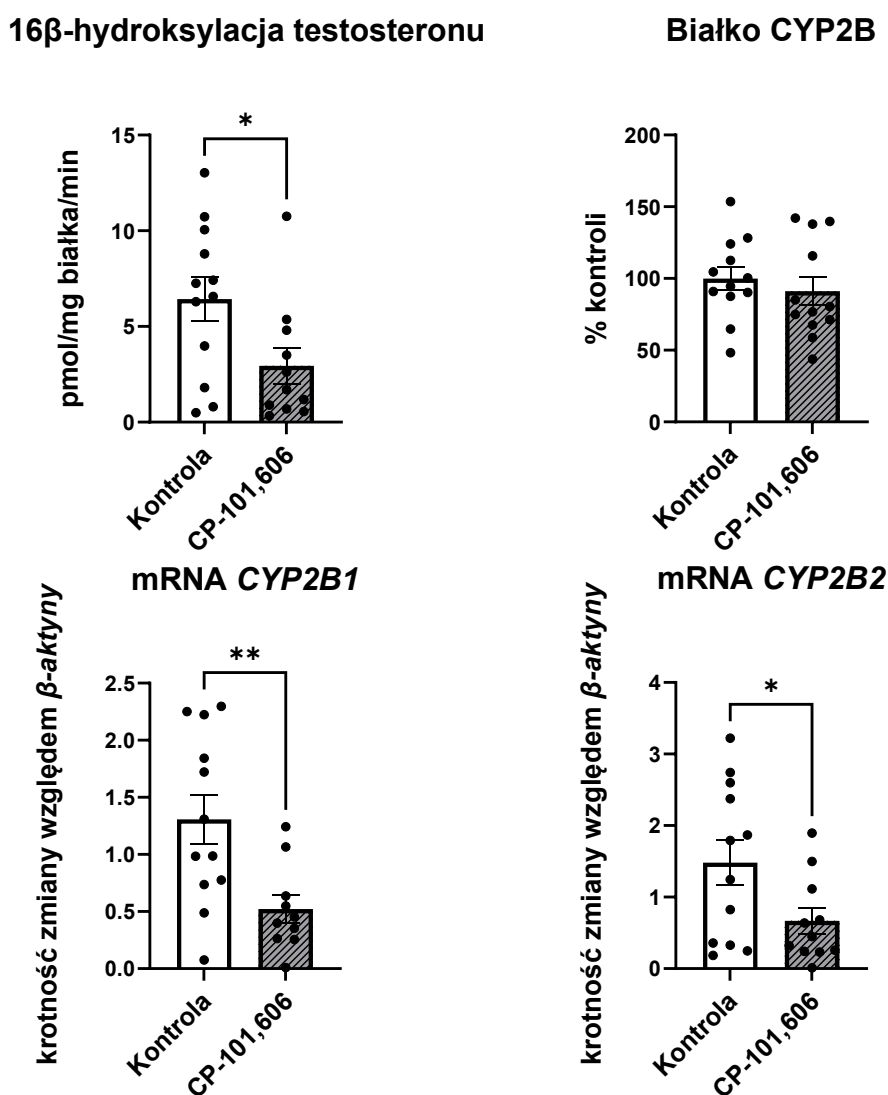


Rycina 17. Wpływ 5-dniowego podawania związku CP-101,606 do jąder przykomorowych podwzgórza na aktywność enzymu CYP2A oraz poziom białka i mRNA. Aktywność CYP2A mierzono na podstawie szybkości 7 α -hydroksylacji testosteronu. Wartości przedstawiono jako średnią \pm SEM (n = 9–12). Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą testu t-Studenta. Istotność statystyczna została oznaczona następująco: * p < 0,05.

Jednocześnie obserwowano tendencję spadkową w poziomie białka (71%) oraz istotne statystycznie obniżenie poziomu mRNA *CYP2A1* (37%) i *CYP2A2* (50%) względem grupy kontrolnej (rycina 16 i 17).

2.3 Wpływ podawania CP-101,606 do jąder przykomorowych na aktywność i ekspresję CYP2B

Podobnie jak w przypadku CYP2A, również dla CYP2B stwierdzono obniżenie aktywności (46% kontroli) mierzonej reakcją 16 β -hydroksylacji testosteronu po zastosowaniu antagonisty podjednostki GluN2B receptora NMDA (rycina 18).



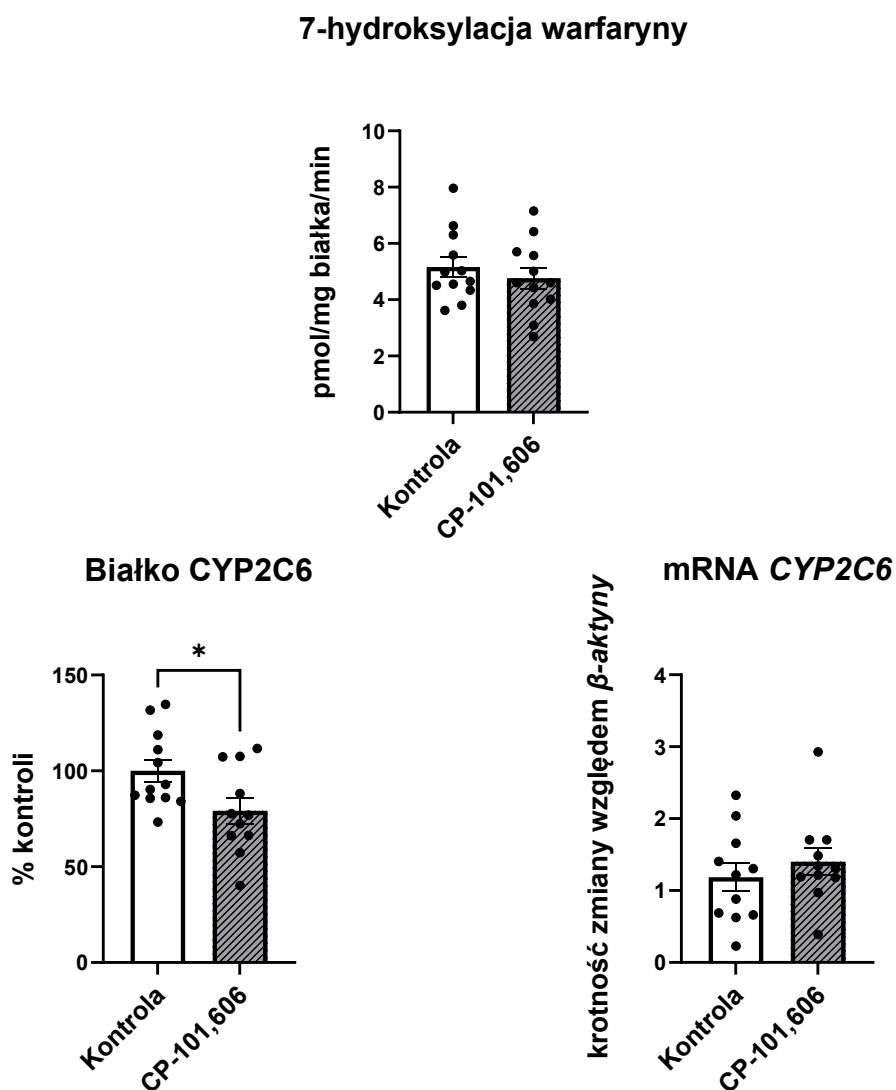
Rycina 18. Wpływ 5-dniowego podawania związku CP-101,606 do jąder przykomorowych podwzgórza na aktywność enzymu CYP2B oraz poziom białka i mRNA. Aktywność CYP2B mierzono na podstawie szybkości 16 β -hydroksylacji testosteronu. Wartości przedstawiono jako średnią \pm SEM (n = 9–12). Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą testu t-Studenta. Istotność statystyczna została oznaczona następująco: * p < 0,05; ** p < 0,01.

Nie zaobserwowano istotnej zmiany w poziomie białka (91% kontroli), jednakże poziom mRNA *CYP2B1* (40%) oraz *CYP2B2* (45%) w grupie otrzymującej CP-101,606

do jąder przykomorowych podwzgórza był istotnie statystycznie obniżony względem grupy kontrolnej (rycina 16 i 18).

2.4 Wpływ podawania CP-101,606 do jąder przykomorowych na aktywność i ekspresję CYP2C6

Po podaniach CP-101,606 nie stwierdzono istotnej zmiany poziomu aktywności enzymu CYP2C6 (92% kontroli), mierzonej szybkością reakcji 7-hydroksylacji warfaryny (rycina 19).



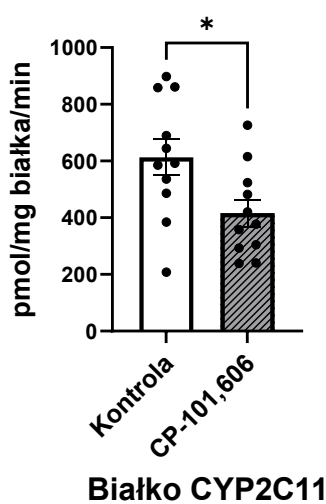
Rycina 19. Wpływ 5-dniowego podawania związku CP-101,606 do jąder przykomorowych podwzgórza na aktywność enzymu CYP2C6 oraz poziom białka i mRNA. Aktywność CYP2C6 mierzono na podstawie szybkości 7-hydroksylacji warfaryny. Wartości przedstawiono jako średnią \pm SEM (n = 9–12). Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą testu t-Studenta. Istotność statystyczna została oznaczona następująco: * p < 0,05.

Nie zaobserwowano również zmian w poziomie mRNA *CYP2C6* (118%), natomiast stwierdzono obniżenie poziomu białka w grupie, której podawano antagonistę do jąder przykomorowych (79%), względem grupy kontrolnej (rycina 16 i 19).

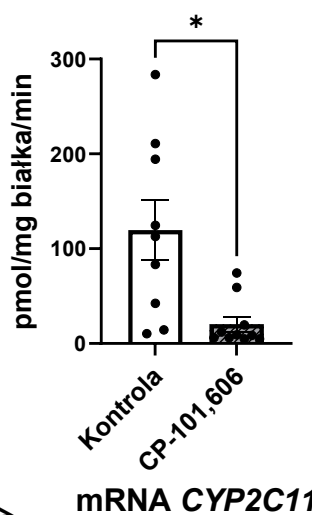
2.5 Wpływ podawania CP-101,606 do jąder przykomorowych na aktywność i ekspresję *CYP2C11*

Podawanie związku CP-101,606 spowodowało obniżenie aktywności enzymu *CYP2C11*, którą zmierzono szybkością reakcji 2 α - i 16 α -hydroksylacji testosteronu, kolejno: 68% i 17% względem grupy kontrolnej (rycina 20).

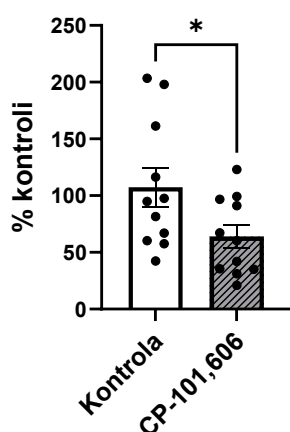
2 α -hydroksylacja testosteronu



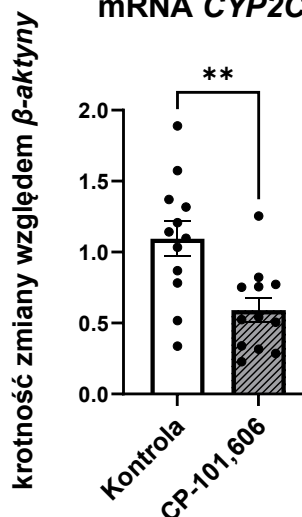
16 α -hydroksylacja testosteronu



Białko *CYP2C11*



mRNA *CYP2C11*



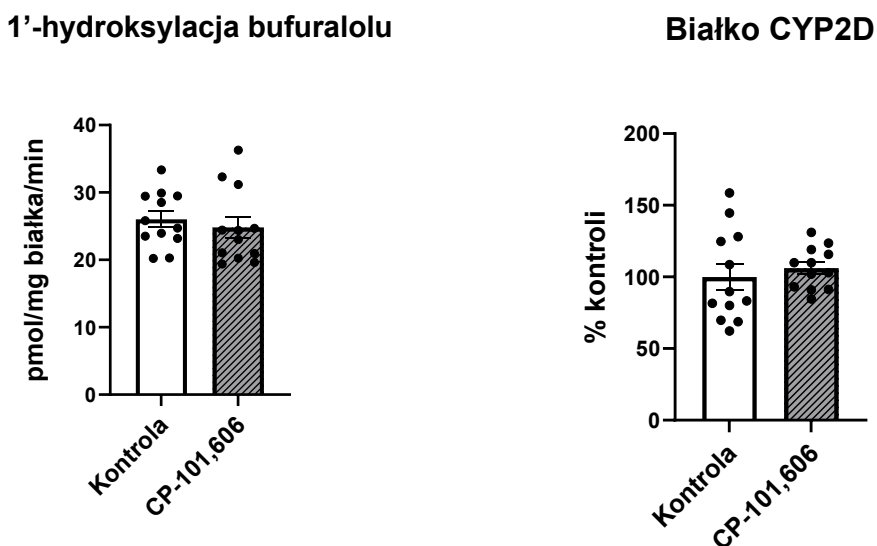
Rycina 20. Wpływ 5-dniowego podawania związku CP-101,606 do jąder przykomorowych podwzgórza na aktywność enzymu *CYP2C11* oraz poziom białka i mRNA. Aktywność *CYP2C11* mierzono na podstawie szybkości 2 α - oraz 16 α -hydroksylacji testosteronu. Wartości przedstawiono jako średnią \pm SEM ($n = 9-12$). Analizę statystyczną przeprowadzono za

pomocą testu t-Studenta. Istotność statystyczna została oznaczona następująco: * $p < 0,05$; * $p < 0,01$.

Analogiczne zmiany zaobserwowano również w poziomie białka (60% kontroli) oraz mRNA *CYP2C11* (54% kontroli) w grupie, która otrzymywała antagonistę podjednostki GluN2B receptora NMDA do jąder przykomorowych podwzgórza (rycina 16 i 20).

2.6 Wpływ podawania CP-101,606 do jąder przykomorowych na aktywność i ekspresję CYP2D6

Nie stwierdzono zmian w aktywności (95%) oraz poziomie białka (106%) (rycina 16 i 21) podrodziny CYP2D, po 5-dniowych podaniach związku CP-101,606 do jąder przykomorowych.

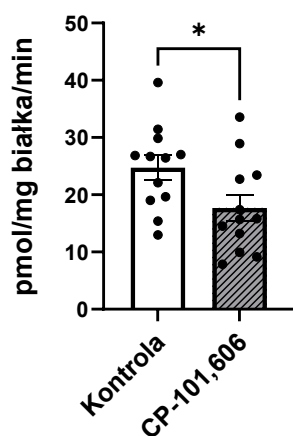


Rycina 21. Wpływ 5-dniowego podawania związku CP-101,606 do jąder przykomorowych podwzgórza na aktywność enzymu CYP2D6 oraz poziom białka. Aktywność CYP2D6 mierzono na podstawie szybkości 1'-hydroksylacji bufuralolu. Wartości przedstawiono jako średnią \pm SEM ($n = 12$). Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą testu t-Studenta.

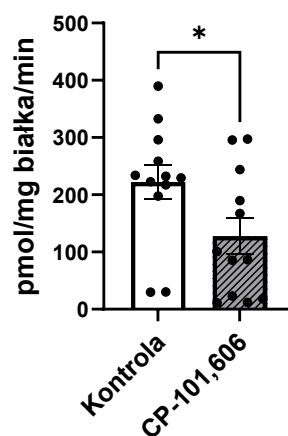
2.7 Wpływ podawania CP-101,606 do jąder przykomorowych na aktywność i ekspresję CYP3A

W grupie zwierząt, której podawano związek CP-101,606 obserwowano obniżenie aktywności enzymu CYP3A, mierzonej szybkością reakcji 2 β - oraz 6 β -hydroksylacji testosteronu (rycina 22), kolejno: 72% i 57% względem grupy kontrolnej.

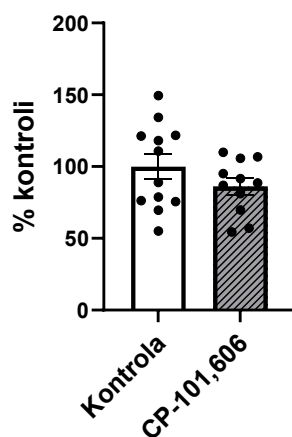
2 β -hydroksylacja testosteronu



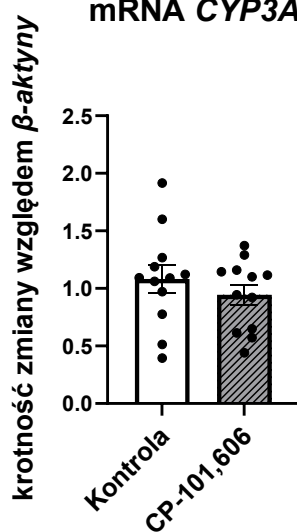
6 β -hydroksylacja testosteronu



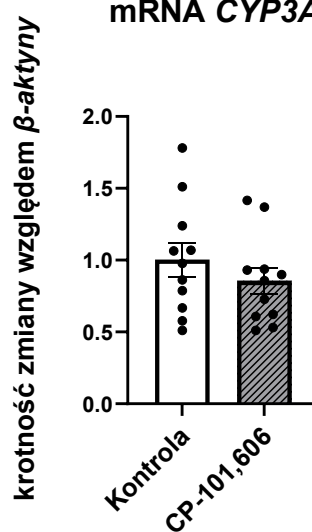
Białko CYP3A



mRNA CYP3A1



mRNA CYP3A2



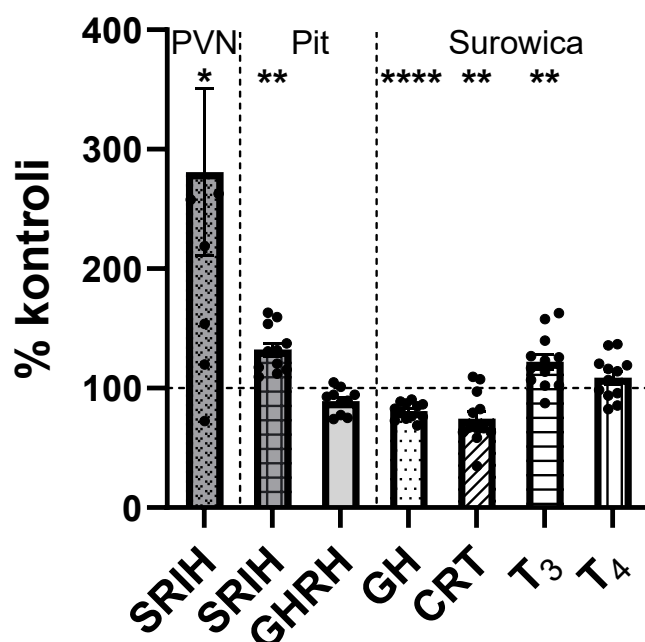
Rycina 22. Wpływ 5-dniowego podawania związku CP-101,606 do jąder przykomorowych podwzgórza na aktywność enzymu CYP3A oraz poziom białka i mRNA. Aktywność CYP3A mierzono na podstawie szybkości 2 β - oraz 6 β -hydroksylacji testosteronu. Wartości

przedstawiono jako średnią \pm SEM (n = 9–12). Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą testu t-Studenta. Istotność statystyczna została oznaczona następująco: * p < 0,05.

Jednocześnie nie stwierdzono zmian w poziomie białka (86%) oraz mRNA dla *CYP3A1* (87% kontroli) i *CYP3A2* (85% kontroli) (rycina 16 i 22).

2.8 Wpływ podawania CP-101,606 do jąder przykomorowych na poziom hormonów

Zmiany poziomu hormonów po 5-dniowym podawaniu związku CP-101,606 do jąder przykomorowych podwzgórza przedstawiono na rycinie 23.



Rycina 23. Wpływ 5-dniowego podawania związku CP-101,606 do jąder przykomorowych na poziomy hormonów w podwzgórzu, przysadce mózgowej (Pit) i surowicy krwi. Wszystkie wartości przedstawiono jako średnie \pm SEM (n = 8–12). Istotność statystyczną oceniano za pomocą testu t-Studenta i oznaczono jako: * p < 0,05; ** p < 0,01; **** p < 0,0001 – względem grupy kontrolnej. Bezwzględne wartości kontrolne dla PVN wynosiły odpowiednio: 78 \pm 16 pg/g (SRIH – PVN), 590 \pm 38 pg/g (SRIH – Pit), 1,02 \pm 0,07 μ g/g (GHRH – Pit), 139,6 \pm 3,8 pg/mL (GH), 479 \pm 28 ng/mL (CRT), 1,19 \pm 0,05 ng/mL (T₃), 45,3 \pm 1,9 ng/mL (T₄).

Poziom somatostatyny został zmierzony w obszarze podwzgórza zawierającym jądro przykomorowe (PVN) oraz w przysadce mózgowej (Pit). Zarówno w jądrze przykomorowym, jak i w przysadce dawka antagonisty 3 μ g podawana przez 5 dni do

jąder przykomorowych podwzgórza spowodowała istotny statystycznie wzrost poziomu somatostatyny względem grupy kontrolnej, kolejno – 281% i 132%. Ponadto w przysadce mózgowej zmierzono również poziom hormonu GHRH, dla którego nie stwierdzono zmian (89% kontroli). W surowicy krwi zbadano stężenie hormonu wzrostu, kortykosteronu oraz hormonów tarczycy. Obserwowano spadek stężenia GH (81% kontroli), który odpowiadał zmianom obserwowanym w przypadku somatostatyny, która negatywnie reguluje wydzielanie GH. Poziom kortykosteronu w surowicy krwi był obniżony w grupie, której podawano CP-101,606 (75%) względem grupy kontrolnej. Ponadto obserwowano istotnie podwyższony poziom T₃ (122% kontroli), bez zmian w poziomie T₄ (109% kontroli).

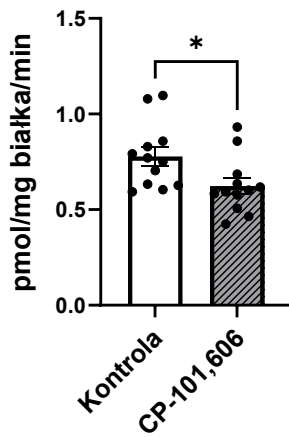
3. Wpływ wielokrotnego podawania związku CP-101,606 do jąder łukowatych podwzgórza na aktywność i ekspresję cytochromu P450 w wątrobie

Po 5-dniowym podawaniu związku CP-101,606 do jąder łukowatych podwzgórza w dawce 3 µg/mózg, podobnie jak w przypadku podań do komór bocznych mózgu szczura oraz do jąder przykomorowych podwzgórza, zbadano aktywność oraz poziom białka wybranych enzymów cytochromu P450 w szczurzych mikrosomach wątrobowych. W oparciu o zmiany uzyskane w aktywności i poziomie białka enzymów CYP, do dalszego etapu badań wybrano geny *CYP*, dla których zmierzono poziomy mRNA.

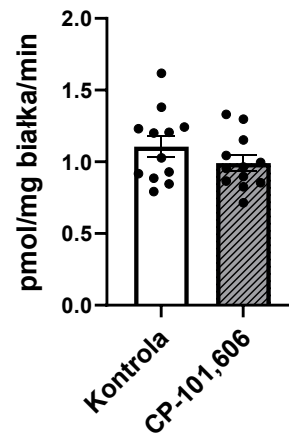
3.1 Wpływ podawania CP-101,606 do jąder łukowatych na aktywność i ekspresję CYP1A

5-dniowe podawanie związku CP-101,606 w dawce 3 µg do jąder łukowatych podwzgórza spowodowało istotne statystycznie obniżenie poziomu aktywności enzymu CYP1A, mierzonej szybkością reakcji 1-N-demetylacji kofeiny (80% kontroli), bez zmian szybkości reakcji 3-N-demetylacji (90% kontroli) i 8-hydroksylacji kofeiny (94% kontroli) (rycina 23). Podobnie jak w przypadku podań do jąder przykomorowych, również po podaniach do jąder łukowatych podwzgórza zaobserwowano istotne obniżenie poziomu białka enzymu (65%) i mRNA *CYP1A1* (45%) oraz *CYP1A2* (63%) względem grupy kontrolnej (rycina 24 i 25).

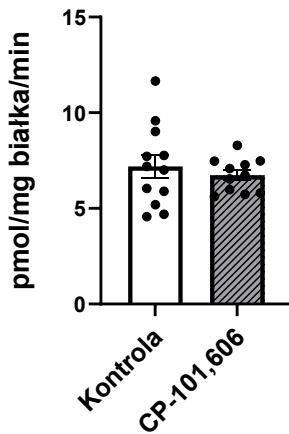
1-N-demetylacja kofeiny



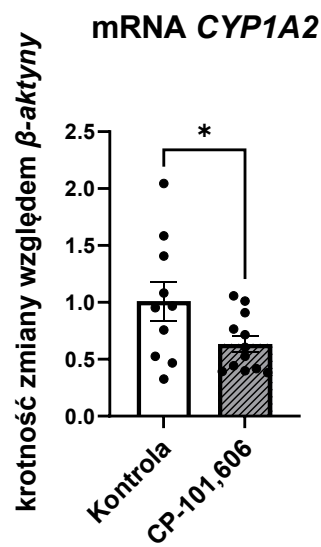
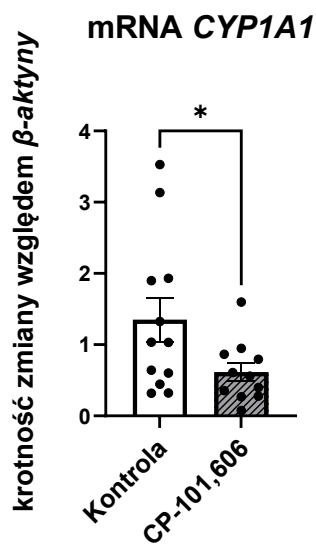
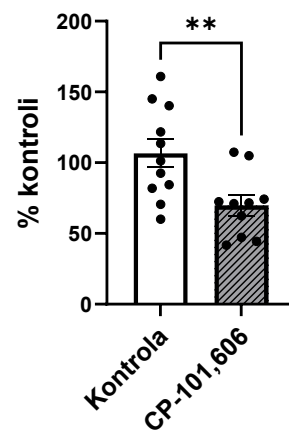
3-N-demetylacja kofeiny



8-hydroksylacja kofeiny

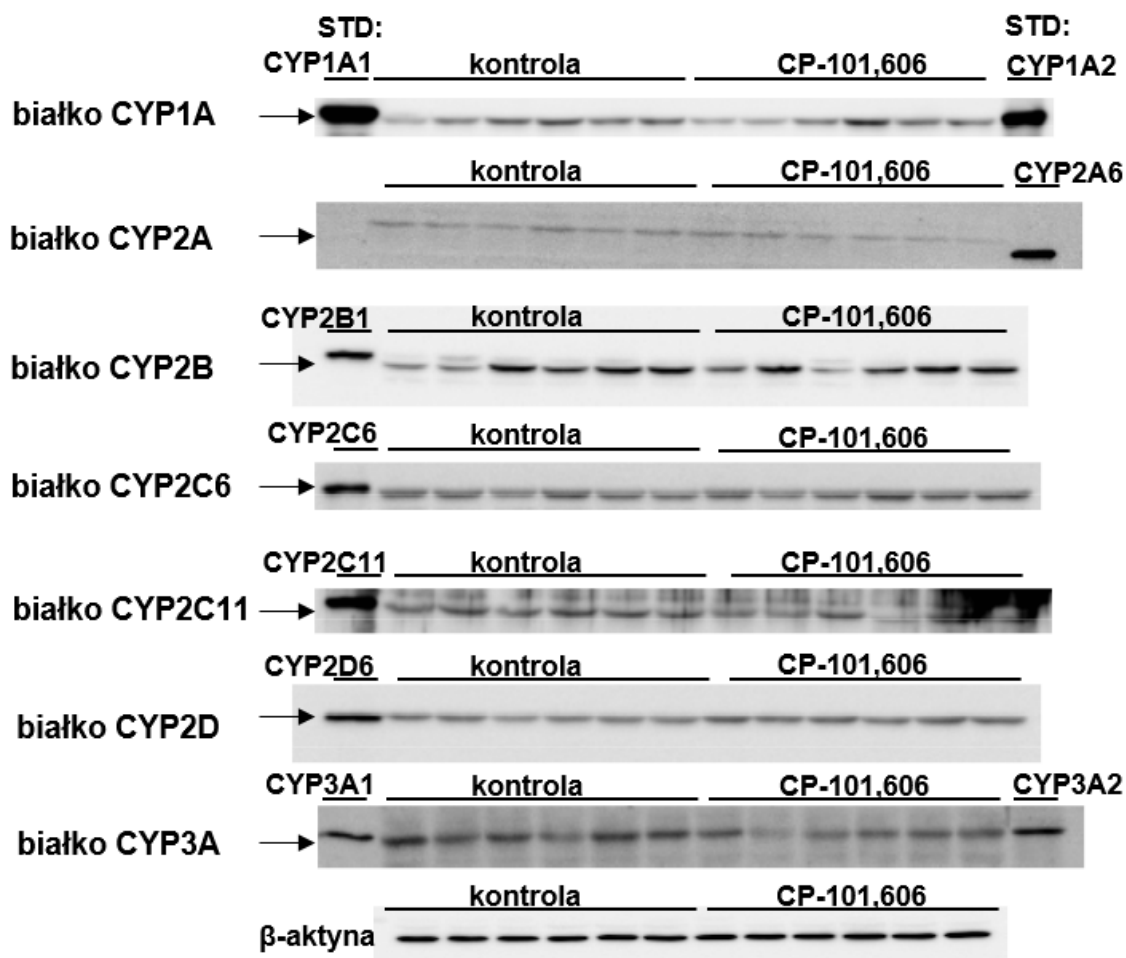


Białko CYP1A



Rycina 24. Wpływ 5-dniowego podawania związku CP-101,606 do jąder łukowatych podwzgórza na aktywność enzymu CYP1A1/2 oraz poziom białka i mRNA. Aktywność CYP1A1/2 mierzono na podstawie szybkości 1-N-demetylacji, 3-N-demetylacji

i 8-hydroksylacji kofeiny. Wartości przedstawiono jako średnią \pm SEM (n = 9–12). Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą testu t-Studenta. Istotność statystyczna została oznaczona następująco: * p < 0,05; ** p < 0,01.



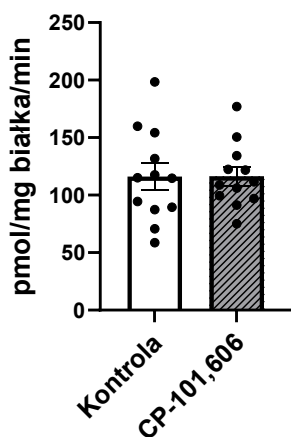
Rycina 25. Wpływ 5-dniowego podawania związku CP-101,606 do jąder łukowatych podwzgórza na intensywność prążków białek cytochromu P450 (CYP1A, CYP2A, CYP2B, CYP2C6, CYP2C11, CYP2D, CYP3A) w mikrosomach wątrobowych, uzyskanych techniką Western blotting. Na rycinie przedstawiono reprezentatywne prążki białek CYP; jako standardy wykorzystano szczurze lub ludzkie (CYP2A6, CYP2D6) supersomy. Średnie wartości poziomów poszczególnych białek CYP \pm SEM (n = 9–12) zaprezentowano na rycinach 24 oraz 26–31. STD — standard.

3.2 Wpływ podawania CP-101,606 do jąder łukowatych na aktywność i ekspresję CYP2A

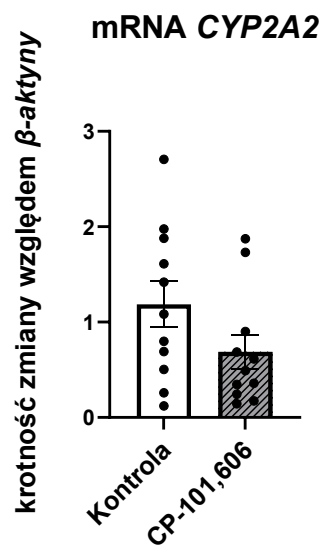
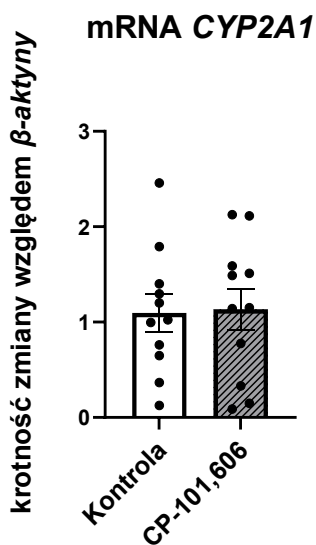
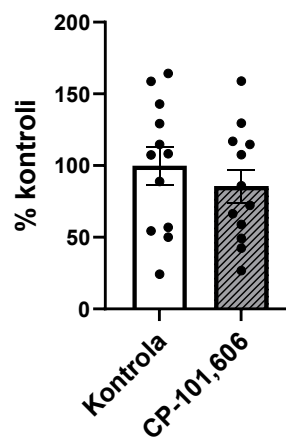
Inaczej niż w przypadku podań do jąder przykomorowych podwzgórza, 5-dniowe podawanie związku CP-101,606 w dawce 3 μ g do jąder łukowatych nie spowodowało zmian w aktywności CYP2A (100% kontroli), którą zmierzono

szybkością reakcji 7 α -hydroksylacji testosteronu (rycina 26). Nie obserwowano również zmian w poziomie białka enzymu (86% kontroli) oraz mRNA *CYP2A1* (103% kontroli) i *CYP2A2* (58% kontroli) (rycina 25 i 26).

7 α -hydroksylacja testosteronu



Białko CYP2A



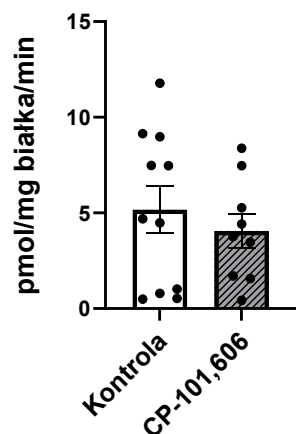
Rycina 26. Wpływ 5-dniowego podawania związku CP-101,606 do jąder łukowatych podwzgórza na aktywność enzymu CYP2A oraz poziom białka i mRNA. Aktywność CYP2A mierzono na podstawie szybkości 7 α -hydroksylacji testosteronu. Wartości przedstawiono jako średnią \pm SEM (n = 9–12). Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą testu t-Studenta.

3.3 Wpływ podawania CP-101,606 do jąder łukowatych na aktywność i ekspresję CYP2B

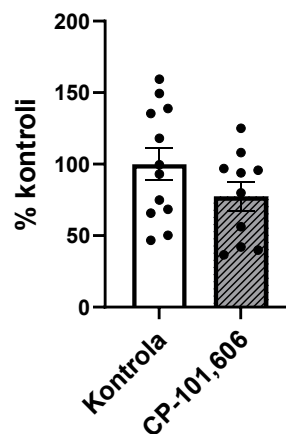
Podobnie jak w przypadku CYP2A, również dla CYP2B nie zaobserwowano istotnych zmian w aktywności enzymu (78% kontroli), mierzonej szybkością reakcji

16 β -hydroksylacji testosteronu, po podaniach związku CP-101,606 do jąder łukowatych podwzgórza (rycina 27). Nie stwierdzono również zmian w poziomie białka enzymu (78% kontroli) oraz mRNA *CYP2B1* (91% kontroli) i *CYP2B2* (92% kontroli) (rycina 25 i 27).

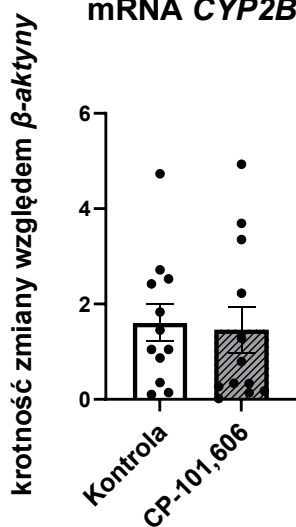
16 β -hydroksylacja testosteronu



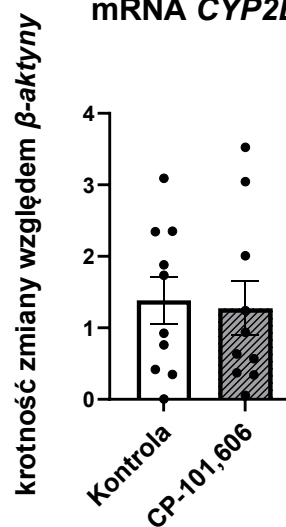
Białko CYP2B



mRNA *CYP2B1*



mRNA *CYP2B2*

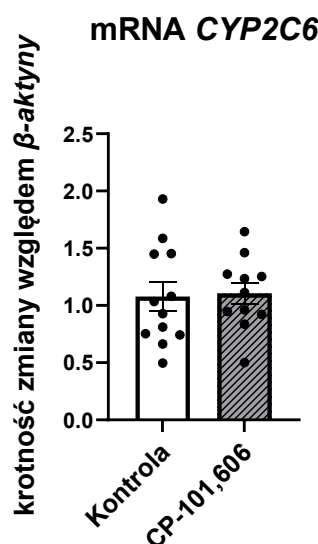
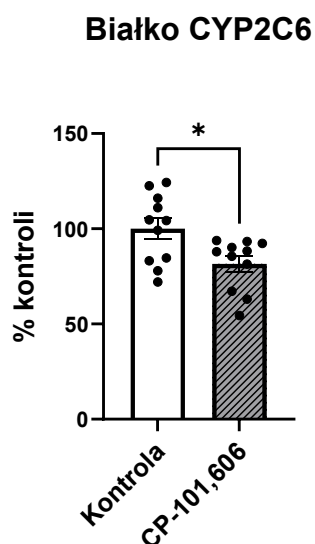
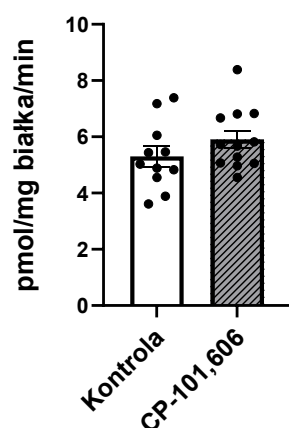


Rycina 27. Wpływ 5-dniowego podawania związku CP-101,606 do jąder łukowatych podwzgórza na aktywność enzymu CYP2B oraz poziom białka i mRNA. Aktywność CYP2B mierzono na podstawie szybkości 16 β -hydroksylacji testosteronu. Wartości przedstawiono jako średnią \pm SEM (n = 9–12). Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą testu t-Studenta.

3.4 Wpływ podawania CP-101,606 do jąder łukowatych na aktywność i ekspresję CYP2C6

5-dniowe podania selektywnego antagonisty podjednostki GluN2B receptora NMDA do jąder łukowatych podwzgórza nie spowodowały zmian w poziomie aktywności enzymu CYP2C6, mierzonej szybkością reakcji 7-hydroksylacji warfaryny (111% kontroli) oraz w poziomie mRNA *CYP2C6* (103% kontroli) (rycina 28). Jednakże stwierdzono obniżony poziom białka enzymu w grupie, której podawano CP-101,606 (82%), względem grupy kontrolnej (rycina 25 i 28).

7-hydroksylacja warfaryny



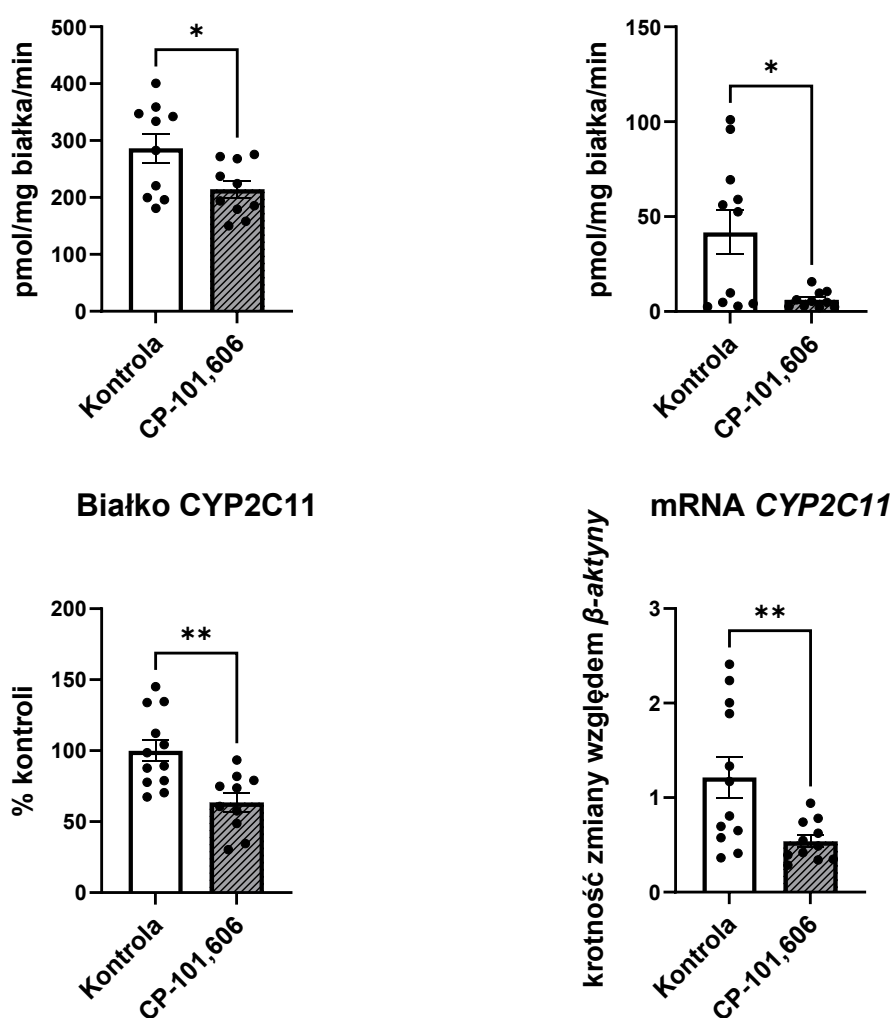
Rycina 28. Wpływ 5-dniowego podawania związku CP-101,606 do jąder łukowatych podwzgórza na aktywność enzymu CYP2C6 oraz poziom białka i mRNA. Aktywność CYP2C6 mierzono na podstawie szybkości 7-hydroksylacji warfaryny. Wartości przedstawiono jako średnią ± SEM (n = 9–12). Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą testu t-Studenta. Istotność statystyczna została oznaczona następująco: * p < 0,05.

3.5 Wpływ podawania CP-101,606 do jąder łukowatych na aktywność i ekspresję CYP2C11

Tak jak w przypadku podań do jąder przykomorowych podwzgórza, również podania związku CP-101,606 do jąder łukowatych spowodowały zmiany enzymu CYP2C11. Obserwowano obniżenie aktywności mierzonej szybkością reakcji 2 α - i 16 α -hydroksylacji testosteronu, kolejno do 75% i 15% kontroli. Stwierdzono także obniżony poziom białka enzymu (64% kontroli) i mRNA *CYP2C11* (44% kontroli) w grupie, której podawano antagonistę podjednostki GluN2B (rycina 25 i 29).

2 α -hydroksylacja testosteronu

16 α -hydroksylacja testosteronu

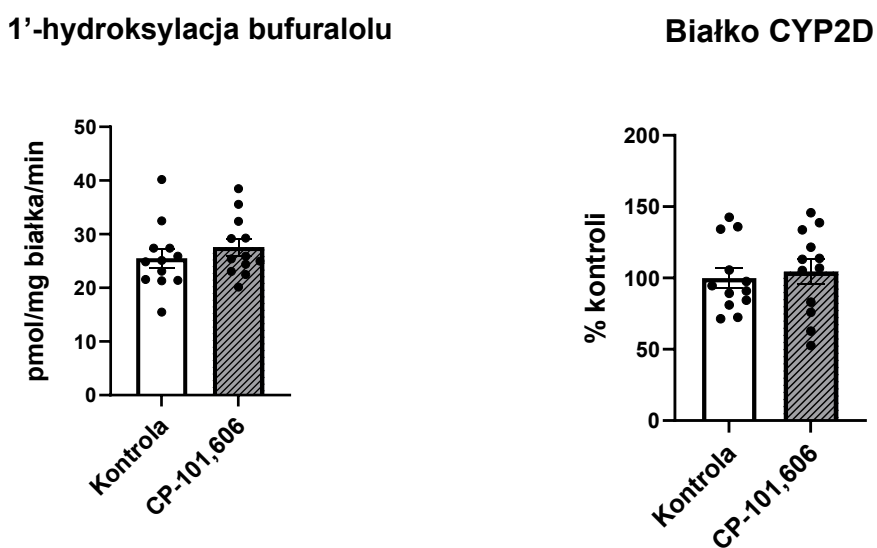


Rycina 29. Wpływ 5-dniowego podawania związku CP-101,606 do jąder łukowatych podwzgórza na aktywność enzymu CYP2C11 oraz poziom białka i mRNA. Aktywność CYP2C11 mierzono na podstawie szybkości 2 α - oraz 16 α -hydroksylacji testosteronu. Wartości przedstawiono jako średnią \pm SEM (n = 9–12). Analizę statystyczną przeprowadzono za

pomocą testu t-Studenta. Istotność statystyczna została oznaczona następująco: * $p < 0,05$; * $p < 0,01$.

3.6 Wpływ podawania CP-101,606 do jąder łukowatych na aktywność i ekspresję CYP2D6

Nie stwierdzono istotnych zmian aktywności, mierzonej szybkością reakcji 1'-hydroksylacji bufuralolu (108% kontroli) oraz poziomu białka enzymu CYP2D (104% kontroli), po podaniach związku CP-101,606 do jąder łukowatych podwzgórza, podobnie jak w przypadku podań do jąder przykomorowych (rycina 25 i 30).

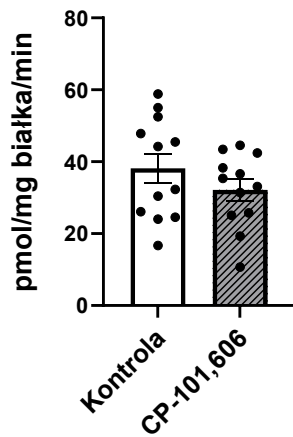


Rycina 30. Wpływ 5-dniowego podawania związku CP-101,606 do jąder łukowatych podwzgórza na aktywność enzymu CYP2D6 oraz poziom białka. Aktywność CYP2D6 mierzono na podstawie szybkości 1'-hydroksylacji bufuralolu. Wartości przedstawiono jako średnią \pm SEM ($n = 12$). Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą testu t-Studenta.

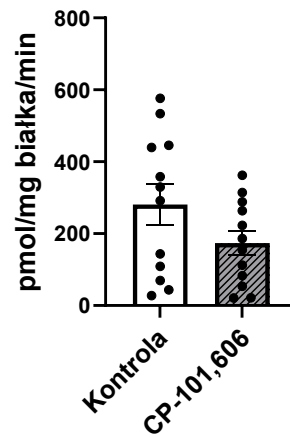
3.7 Wpływ podawania CP-101,606 do jąder łukowatych na aktywność i ekspresję CYP3A

Po 5-dniowych podaniach związku CP-101,606 do jąder łukowatych podwzgórza obserwowano tendencję spadkową, ale bez istotności statystycznej w aktywności enzymu CYP3A, mierzonej szybkością reakcji 2 β - oraz 6 β -hydroksylacji testosteronu, kolejno do 84% i 62%. Nie stwierdzono również istotnych zmian w poziomie białka enzymu (90% kontroli). W przypadku mRNA, nie obserwowano zmian w poziomie ekspresji *CYP3A1* (89% kontroli), natomiast poziom ekspresji *CYP3A2* był istotnie obniżony (57% kontroli) w grupie, której podawano antagonistę podjednostki GluN2B receptora NMDA (rycina 25 i 31).

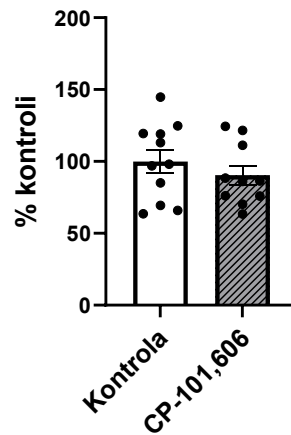
2 β -hydroksylacja testosteronu



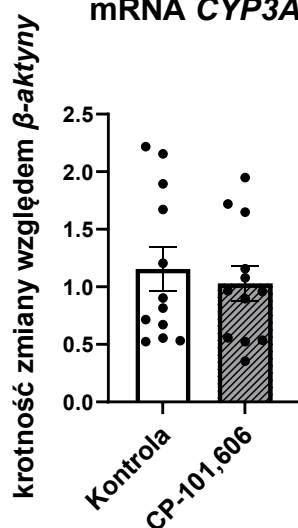
6 β -hydroksylacja testosteronu



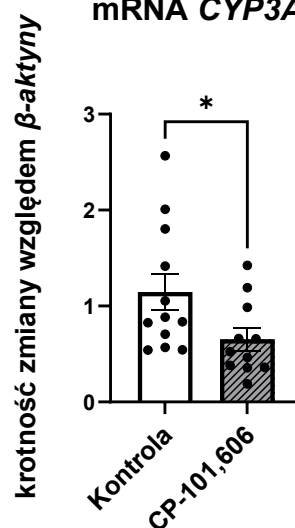
Białko CYP3A



mRNA CYP3A1



mRNA CYP3A2

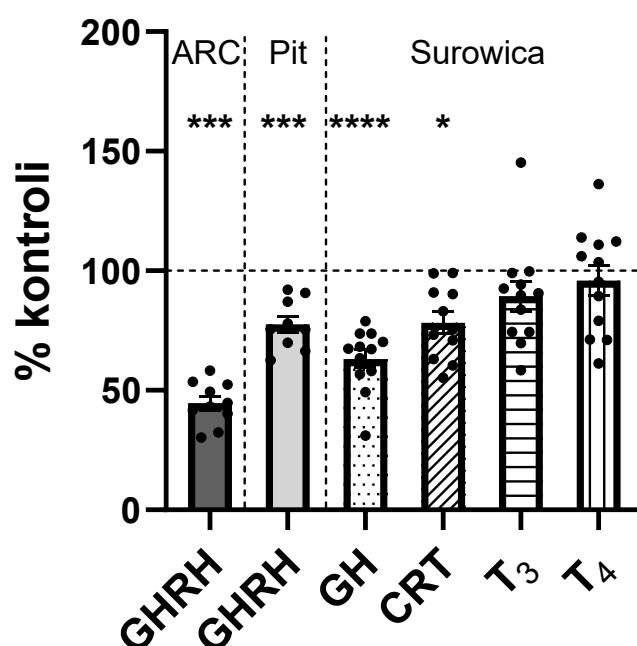


Rycina 31. Wpływ 5-dniowego podawania związku CP-101,606 do jąder łukowatych podwzgórza na aktywność enzymu CYP3A oraz poziom białka i mRNA. Aktywność CYP3A mierzono na podstawie szybkości 2 β - oraz 6 β -hydroksylacji testosteronu. Wartości

przedstawiono jako średnią \pm SEM ($n = 9-12$). Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą testu t-Studenta. Istotność statystyczna została oznaczona następująco: * $p < 0,05$.

3.8 Wpływ podawania CP-101,606 do jąder łukowatych na poziom hormonów

Zmiany w poziomie hormonów po 5-dniowym podawaniu związku CP-101,606 do jąder łukowatych podwzgórza przedstawiono na rycinie 32. Poziom GHRH został zmierzony w obszarze podwzgórza zawierającym jądro łukowate (ARC) oraz w przysadce mózgowej (Pit). Zarówno w jądrze łukowatym, jak i w przysadce dawka 3 μg antagonisty spowodowała istotne statystycznie obniżenie poziomu GHRH względem grupy kontrolnej, kolejno do 45% i 78%. W surowicy krwi zbadano poziom hormonu wzrostu, kortykosteronu oraz hormonów tarczycy. W przypadku hormonu wzrostu obserwowano istotny spadek stężenia GH w surowicy (63% kontroli), który odpowiadał obniżeniu poziomu GHRH, który pozytywnie reguluje wydzielanie GH. Poziom kortykosteronu w surowicy krwi był także obniżony (78% kontroli). Nie obserwowano istotnych zmian stężenia T_3 (89% kontroli) oraz T_4 (96% kontroli).

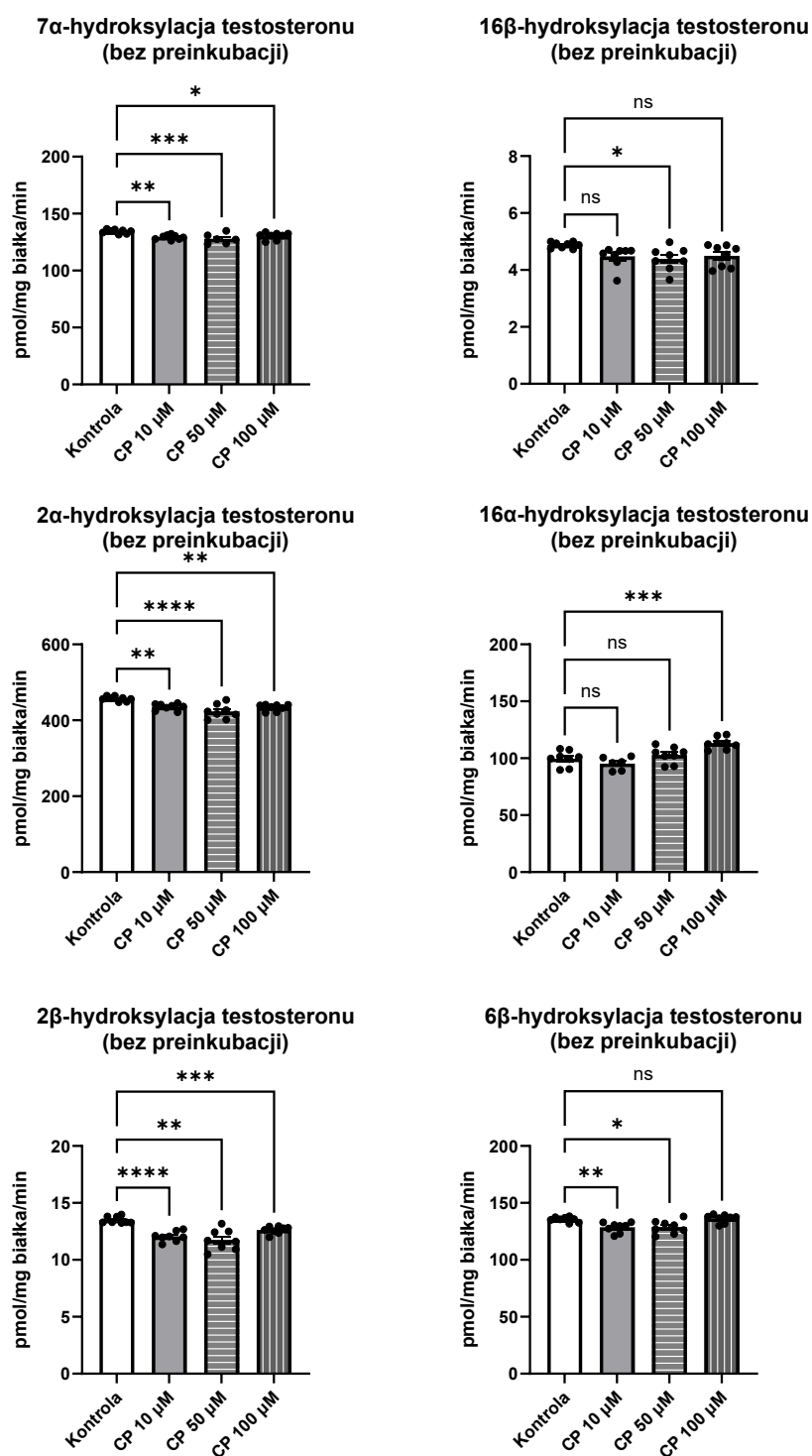


Rycina 32. Wpływ 5-dniowego podawania związku CP-101,606 do jąder łukowatych na poziomy hormonów w podwzgórzu, przysadce mózgowej (Pit) i surowicy krwi. Wszystkie wartości przedstawiono jako średnie \pm SEM ($n = 8-12$). Istotność statystyczną oceniano za pomocą testu t-Studenta i oznaczono jako: * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ – względem grupy kontrolnej. Bezwzględne wartości kontrolne dla ARC wynosiły odpowiednio:

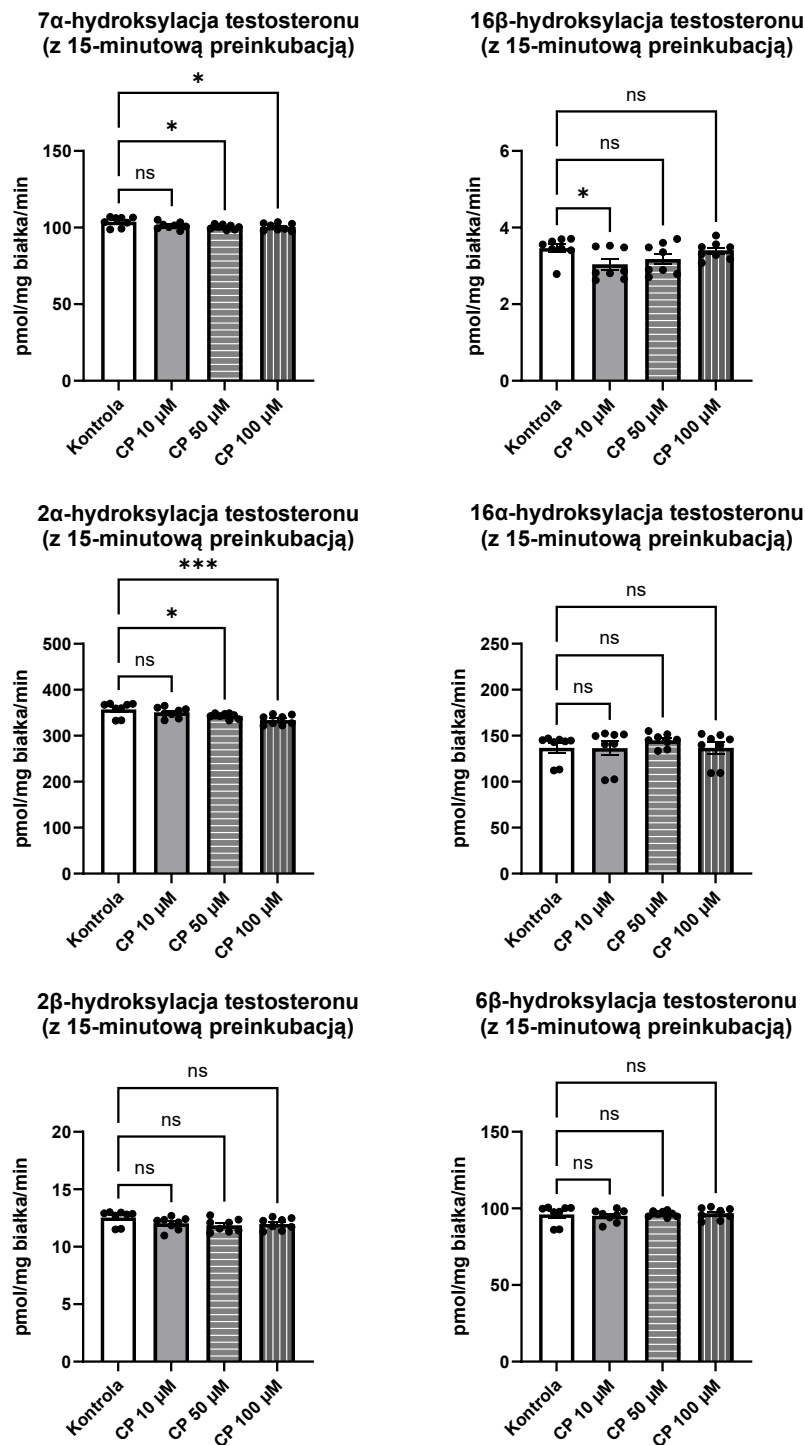
$39,8 \pm 3,6$ ng/g (GHRH – ARC), $1,0 \pm 0,1$ μ g/g (GHRH – Pit), $128,8 \pm 3,8$ pg/mL (GH), 413 ± 34 ng/mL (CRT), $1,84 \pm 0,18$ ng/mL (T_3), $71,4 \pm 5,6$ ng/mL (T_4).

4. Bezpośredni wpływ związku CP-101,606 na aktywność enzymów CYP w mikrosomach wątrobowych szczura – badania *in vitro*

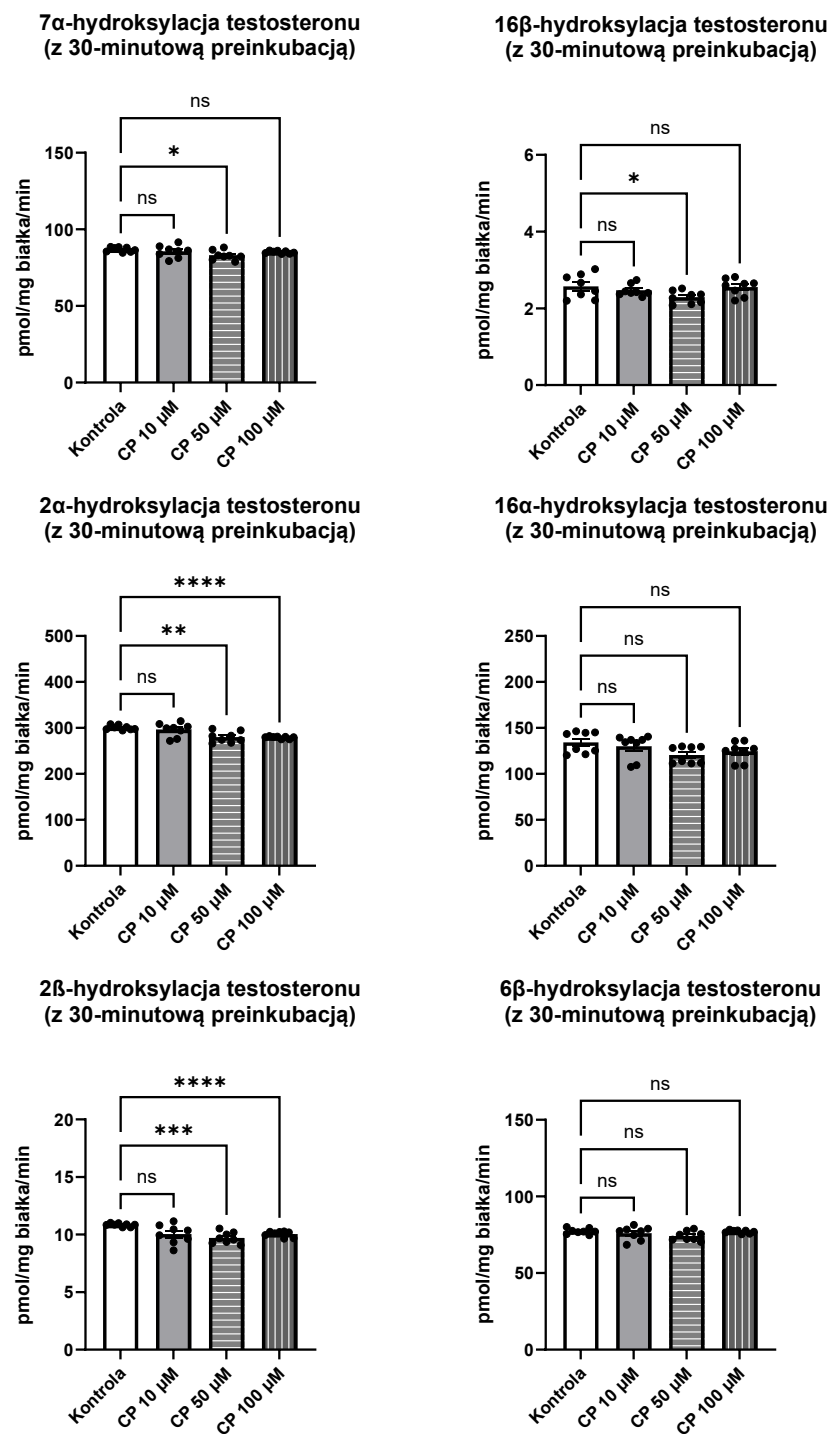
Zbadano bezpośredni wpływ związku CP-101,606 na wybrane enzymy cytochromu P450 w warunkach *in vitro*, w trzech stężeniach: 10 μ M, 50 μ M i 100 μ M. Zmierzono szybkość specyficznych reakcji: 7 α -hydroksylacji (CYP2A), 16 β -hydroksylacji (CYP2B), 2 α - i 16 α -hydroksylacji (CYP2C11) oraz 2 β - i 6 β -hydroksylacji testosteronu (CYP3A) w nieobecności i obecności antagonisty. Jednocześnie sprawdzono wpływ czasu preinkubacji: 0 minut (rycina 33), 15 minut (rycina 34) i 30 minut (rycina 35), na szybkość powyższych reakcji. Uzyskane wyniki pozwoliły na stwierdzenie, iż szybkość reakcji katalizowanych przez wybrane enzymy CYP pozostała praktycznie niezmienną, zarówno w warunkach bez preinkubacji, jak i z preinkubacją z CP-101,606 przez 15 i 30 minut. Mimo, że w niektórych przypadkach uzyskane wyniki były statystycznie istotne, zaobserwowane spadki szybkości reakcji wywołane przez związek CP-101,606 były ilościowo bardzo niewielkie i stanowiły mniej niż 10% wartości kontrolnej.



Rycina 33. Metabolizm testosteronu *in vitro* w mikrosomach wątrobowych szczura bez preinkubacji w warunkach kontrolnych (bez CP-101,606) oraz w obecności CP-101,606 (10 μ M, 50 μ M, 100 μ M). Wszystkie wartości przedstawiono jako średnie \pm SEM (n = 6–8). Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA), z testem *post hoc* Dunnetta. Istotność statystyczną oznaczono następująco: ns – brak istotności; * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001.



Rycina 34. Metabolizm testosteronu *in vitro* w mikrosomach wątrobowych szczura po 15-minutowej preinkubacji w warunkach kontrolnych (bez CP-101,606) oraz w obecności CP-101,606 (10 μ M, 50 μ M, 100 μ M). Wszystkie wartości przedstawiono jako średnie \pm SEM (n = 6–8). Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA), z testem *post hoc* Dunnetta. Istotność statystyczną oznaczono następująco: ns – brak istotności; * p < 0,05; *** p < 0,001.



Rycina 35. Metabolizm testosteronu *in vitro* w mikrosomach wątrobowych szczura po 30-minutowej preinkubacji w warunkach kontrolnych (bez CP-101,606) oraz w obecności CP-101,606 (10 μ M, 50 μ M, 100 μ M). Wszystkie wartości przedstawiono jako średnie \pm SEM (n = 6–8). Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA), z testem *post hoc* Dunnetta. Istotność statystyczną oznaczono następująco: ns – brak istotności; * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001.

VI. DYSKUSJA

Jak opisano we wstępie niniejszej pracy, zaangażowanie układów monoaminergicznych mózgu – dopaminergicznego (Wójcikowski i wsp. 2007, 2008), noradrenergicznego (Kot i Daniel 2011; Bromek i wsp. 2013; Sadakierska-Chudy i wsp. 2013; Kot i wsp. 2015) i serotonergicznego (Rysz i wsp. 2015, 2016a, 2016b) w neuroendokrynnej regulacji wątrobowego cytochromu P450 zostało już dobrze zbadane, a wyniki badań uzyskane na poszczególnych etapach badań opracowano zbiorczo w pracach przeglądowych (Wójcikowski i Daniel 2009; Bromek i Daniel 2021; Daniel i wsp. 2022). Natomiast znaczenie układu glutaminianergicznego w tym kontekście nie zostało jak dotąd poznane. W badaniach wstępnych, przeprowadzonych po wielokrotnych dootrzewnowych podaniach związku CP-101,606, selektywnego antagonisty podjednostki GluN2B receptora NMDA, stwierdzono zmiany w aktywności i/lub ekspresji enzymów CYP1A, CYP2A, CYP2B, CYP2C11, CYP2D i CYP3A (Bromek i wsp. 2021; Haduch i wsp. 2022). Zmianom tym towarzyszył obniżony poziom GHRH w przysadce mózgowej oraz obniżony poziom hormonu wzrostu i kortykosteronu w surowicy krwi. Jednakże obserwowane efekty w przypadku podań dootrzewnowych związku mogły wynikać zarówno z wpływu badanego związku na poziome wątroby, jak i być konsekwencją pośrednich interakcji między związkiem a enzymami cytochromu P450. Dlatego stwierdzenie, w jakim stopniu zmiany obserwowane po podaniu obwodowym wynikały z mechanizmu neuroendokrynnego jest stosunkowo trudne.

Celem szczegółowego wyjaśnienia mechanizmów efektów obserwowanych po podaniach obwodowych związku CP-101,606, zaplanowano i przeprowadzono wielokrotne podania selektywnego antagonisty podjednostki GluN2B receptora NMDA do komór bocznych mózgu szczura, a następnie do jąder przykomorowych i łukowatych podwzgórza, które regulują wydzielanie hormonów regulujących enzymy cytochromu P450. Ze względu na fakt, iż zastosowane domózgowe dawki CP-101,606 były znacznie niższe, aniżeli dawki stosowane przy podaniach obwodowych, założono, iż domózgowe podania CP-101,606 nie powinny wywierać znaczącego działania na obwodzie.

Efekty obserwowane po wielokrotnych podaniach CP-101,606 do komór bocznych mózgu szczura były zależne od zastosowanej dawki (6, 15, lub 30 $\mu\text{g}/\text{mózg}$);

wyniki uzyskane dla dawek 6 $\mu\text{g}/\text{m}\ddot{\text{o}}\text{z}\text{g}$ i 30 $\mu\text{g}/\text{m}\ddot{\text{o}}\text{z}\text{g}$ względem kontroli, oraz dawki 6 $\mu\text{g}/\text{m}\ddot{\text{o}}\text{z}\text{g}$ względem dawki 30 $\mu\text{g}/\text{m}\ddot{\text{o}}\text{z}\text{g}$ zebrano w tabeli 4 i porównano je z wynikami badań wstępnych po dootrzewnowych podaniach antagonisty. Przeprowadzone badania wykazały, iż dawka 6 μg antagonisty podjednostki GluN2B receptora NMDA doprowadziła do wzrostu ekspresji (mRNA i białka) i aktywności enzymów CYP2C11 oraz CYP2B, w porównaniu z grupą kontrolną. Obserwowano również wyższy poziom mRNA, bez zmian w poziomie białka i aktywności po zastosowaniu dawki 30 μg antagonisty, dla obu tych enzymów. Jednocześnie stwierdzono wyższy poziom ekspresji, ale bez zmian w aktywności enzymatycznej dla CYP1A, zarówno dla dawki 6 μg , jak i 30 μg , co sugeruje udział innych mechanizmów, takich jak modyfikacje potranslacyjne. Obserwowano również istotne statystyczne zmiany między grupami, które otrzymały antagonistę w dawkach 6 μg i 30 μg . Dotyczyły one aktywności enzymów CYP2A, CYP2B, CYP2C11, CYP2C6 oraz CYP2D, a także ekspresji CYP2B oraz CYP2C11. Generalnie, poziomy aktywności i ekspresji były wyższe w grupie, która otrzymywała najniższą dawkę antagonisty względem grupy, która otrzymywała dawkę najwyższą. Co ciekawe, nie obserwowano zmian w przypadku CYP3A, choć wiadomo, iż enzymy z tej podrodziny podlegają podobnym mechanizmom regulacyjnym co wymienione wcześniej enzymy CYP. Powyższym efektom wpływu badanego związku na cytochrom P450 towarzyszyły zmiany w poziomach hormonów: obniżenie poziomu kortykosteronu, zarówno po dawce 6 μg , jak i 30 μg , jak również obniżenie poziomu przysadkowej somatostatyny i odpowiadający temu wzrost poziomu hormonu wzrostu w surowicy krwi po najniższej dawce CP-101,606, a także podwyższony poziom przysadkowej somatostatyny i odpowiadający temu obniżony poziom hormonu wzrostu w surowicy krwi po najwyższej dawce CP-101,606. Zmiany w poziomach somatostatyny oraz hormonu wzrostu względem grupy kontrolnej nie były istotne statystycznie, obserwowano tylko tendencje, jednakże wykazano statystycznie istotne zmiany w poziomach tychże hormonów pomiędzy grupami, którym podawano antagonistę w dawkach 6 μg i 30 μg . I tak, poziom przysadkowej somatostatyny był istotnie niższy w grupie, której podawano CP-101,606 w dawce 6 μg względem grupy, której podawano CP-101,606 w dawce 30 μg , i odpowiadał temu istotnie wyższy poziom hormonu wzrostu w surowicy krwi po dawce 6 μg względem grupy, której podawano antagonistę w dawce 30 μg . Nie obserwowano zmian w poziomie GHRH, który pozytywnie reguluje wydzielanie hormonu wzrostu.

Tabela 4. Podsumowanie wyników uzyskanych po 5-dniowym podawaniu związku CP-101,606 do komór bocznych mózgu na ekspresję i aktywność enzymów cytochromu P450 w wątrobie (A) oraz na wydzielanie hormonów (B). Porównanie z 5-dniowym podawaniem CP-101,606 dootrzewnowo.

A.

Droga podania CP-101,606	Podania dokomorowe									Podania dootrzewnowe*		
	6 µg vs. kontrola			30 µg vs. kontrola			6 µg vs. 30 µg			20 mg/kg		
	Poziom mRNA	Poziom białka	Aktywność	Poziom mRNA	Poziom białka	Aktywność	Poziom mRNA	Poziom białka	Aktywność	Poziom mRNA	Poziom białka	Aktywność
1A1	↑ (148%)	–	– (C8-kof 117%)	↑ (209%)	↑ (180%)	– (C8-kof 99%)	↓	–	–	↑	↓	↓
1A2	↑ (175%)	(128%)	(3N-kof 124%) (1N-kof 96%)	↑ (175%)		(3N-kof 90%) (1N-kof 96%)	–			↑		
2A1	n.t.	–	–	n.t.	–	–	n.t.	–	↑	–	–	↓
2A2	n.t.	(129%)	(116%)	n.t.	(127%)	(80%)	n.t.			–		
2B1	↑ (223%)	(↑) (147%)	(↑) (164%)	↑ (125%)	– (82%)	– (99%)	↑	↑	(↑)	–	–	↓
2B2	↑ (200%)			– (128%)			↑			–		
2C6	n.t.	– (92%)	– (122%)	n.t.	– (93%)	– (85%)	n.t.	–	↑	n.t.	n.t.	–
2C11	↑ (199%)	↑ (230%)	↑ (2α-OH-T 208%) (16α-OH-T 266%)	↑ (169%)	– (134%)	– (2α-OH-T 105%) (16α-OH-T 92%)	↑	↑	↑	↓	↓	↓
2D	n.t.	– (98%)	– (131%)	n.t.	– (89%)	– (95%)	n.t.	–	↑	–	–	↓

Droga podania CP-101,606	Podania dokomorowe									Podania dootrzewnowe*		
	6 µg vs. kontrola			30 µg vs. kontrola			CYP			6 µg vs. kontrola		
CYP	Poziom mRNA	Poziom białka	Aktywność	Poziom mRNA	Poziom białka	Aktywność	Poziom mRNA	Poziom białka	Aktywność	Poziom mRNA	Poziom białka	Aktywność
3A1	n.t.	–	–	n.t.	–	–	n.t.	–	–	↓	↓	↓
3A2	n.t.	(117%)	(2β-OH-T 106%) (6β-OH-T 147%)	n.t.	(135%)	(2β-OH-T 102%) (6β-OH-T 109%)	n.t.	–	–	↓	↓	↓

B.

Droga podania CP-101,606	Podania dokomorowe			Podania dootrzewnowe*
	6 µg vs. kontrola	30 µg vs. kontrola	6 µg vs. 30 µg	20 mg/kg
Poziom hormonów				
Hormon uwalniający hormon wzrostu	– (107%)	– (101%)	–	↓
Somatostatyna	(↓) (80%)	(↑) (118%)	↓	n.t.
Hormon wzrostu	(↑) (127%)	(↓) (78%)	↑	↓
Kortykosteron	↓ (84%)	↓ (77%)	–	↓
Trójiodotyronina (T ₃)	– (103%)	– (114%)	–	–
Tyroksyna (T ₄)	– (121%)	– (107%)	–	–

↑ wzrost; ↓ spadek; (↑) tendencja wzrostowa; (↓) tendencja spadkowa; – bez zmian; n.t. nie testowano; C8-kof, C8-hydroksykofeina; 3N-kof, 3-N-demetylokofeina; 1N-kof, 1-N-demetylokofeina; T, testosteron; * na podstawie (Bromek i wsp. 2021; Haduch i wsp. 2022).

Enzymy cytochromu P450 podlegają regulacji przez hormon wzrostu i kortykosteron, jak również przez hormony tarczycy, dla których nie obserwowano istotnych zmian po dokomorowym podaniu związku CP-101,606. Wymienione hormony aktywują odpowiednie receptory błonowe, cytoplazmatyczne lub jądrowe, wpływając tym samym na transkrypcję genów *CYP* w sposób pozytywny poprzez kortykosteron – regulując CYP1A, CYP2A, CYP2B, CYP2C11 i CYP3A oraz poprzez hormon wzrostu – regulując CYP2C11 i CYP3A, a także w sposób negatywny poprzez hormony tarczycy – regulując CYP1A, CYP2A, CYP2B, CYP2C6, CYP2C11 i CYP3A (Waxman i O'Connor 2006; Waxman i Holloway 2009; Dvorak i Pavek 2010; Brtko i Dvorak 2011; Monostory i Dvorak 2011; Wójcikowski i Daniel 2011; Daniel i wsp. 2022). Nie stwierdzono zmian ekspresji enzymów CYP2C6 oraz CYP2D, które nie są podatne na wpływ powyższych hormonów.

Porównując wyniki uzyskane po wielokrotnym podawaniu CP-101,606 do komórek bocznych mózgu szczura względem wyników podań dootrzewnowych, stwierdzono przeciwstawne efekty, co sugerowało odmienną dystrybucję antagonisty w mózgu po tych dwóch różnych drogach podania i/lub udział mechanizmów obwodowych po podaniu dootrzewnowym. Jednocześnie obserwowano różnice w działaniu dawek 6 µg i 30 µg antagonisty, co mogło być konsekwencją odmiennej dystrybucji związku w obrębie narządów okołokomorowych, wynikającej z położenia jąder podwzgórza zaangażowanych w regulację sekrecji hormonów przysadkowych i aspektów farmakokinetycznych. Wydaje się, iż po podaniach do komórek bocznych mózgu związek CP-101,606 mógł silniej oddziaływać na jądro przykomorowe, które wydziela somatostatynę, aniżeli na jądro łukowate uwalniające GHRH (brak zmian w przeciwieństwie do spadku po podaniach dootrzewnowych związku).

Celem wyjaśnienia różnic zaobserwowanych pomiędzy wynikami badań po podaniu dootrzewnowym i dokomorowym antagonisty podjednostki GluN2B receptora NMDA, związek CP-101,606 podano lokalnie do jąder przykomorowych lub łukowatych podwzgórza. Pięciodniowe podawanie badanego związku do jąder przykomorowych lub łukowatych w dawce 3 µg/mózg doprowadziło do szeregu zmian w ekspresji i aktywności enzymów CYP oraz w poziomie hormonów, co podsumowano w tabeli 5. Zarówno 5-dniowe podawanie CP-101,606 do jąder przykomorowych, jak i łukowatych spowodowało obniżenie poziomu aktywności i ekspresji CYP1A, który

jest pozytywnie regulowany przez kortykosteron oraz negatywnie przez hormony tarczycy (Monostory i wsp. 2009; Brtko i Dvorak 2011). Zgodnie z tym, obserwowano obniżone stężenie kortykosteronu w surowicy krwi po podaniach CP-101,606 do PVN i ARC oraz podwyższone stężenie T_3 po podaniach do PVN. Jednocześnie stwierdzono pewne rozbieżności w wynikach aktywności dla CYP1A po podaniach do PVN i ARC, gdzie po podaniu CP-101,606 do PVN obserwowano istotne zmiany w szybkości reakcji 8-hydroksylacji i 3-N-demetylacji kofeiny. Natomiast po podaniach do ARC stwierdzono istotną zmianę tylko w szybkości reakcji 1-N-demetylacji kofeiny, jednakże nie odnotowano zmian w szybkości reakcji 8-hydroksylacji kofeiny, która jest specyficzną reakcją dla CYP1A u szczura (Kot i Daniel 2008). Powyższe nieścisłości mogły wynikać z modyfikacji potranskrypcyjnych lub potranslacyjnych, w wyniku oddziaływania hormonów, jak również z udziału innych enzymów CYP w metabolizmie kofeiny, co zostało opisane w literaturze dla reakcji 1-N-demetylacji kofeiny, regulowanej zarówno przez CYP1A oraz inne enzymy CYP (Kot i Daniel 2008). Podawanie antagonisty NMDA do jąder przykomorowych (ale nie do łukowatych) spowodowało obniżenie ekspresji oraz aktywności enzymów CYP2A i CYP2B, co można powiązać z niższym stężeniem kortykosteronu oraz wyższym stężeniem T_3 w surowicy krwi, regulujących enzymy z powyższych podrodzin, kolejno w sposób pozytywny i negatywny (Brtko i Dvorak 2011; Wójcikowski i Daniel 2011). Najbardziej zauważalne rezultaty stwierdzono dla enzymu CYP2C11, zarówno po podaniach CP-101,606 do PVN, jaki i do ARC, obserwując obniżoną ekspresję oraz aktywność. Enzym CYP2C11 jest głównym szczurzym enzymem CYP u samców (u samic jest to CYP2C12), który podlega silnej regulacji przez hormon wzrostu (Waxman i O'Connor 2006; Waxman i Holloway 2009; Kot i wsp. 2015). Uzyskane wyniki zmian ekspresji oraz aktywności CYP2C11 były zgodne ze zmianami w poziomach hormonów, gdzie podanie antagonisty do PVN prowadziło do zwiększenia stężenia somatostatyny, negatywnie regulującej wydzielanie hormonu wzrostu z przysadki, zarówno w obszarze podwzgórza zawierającym jądro przykomorowe jak i w samej przysadce, co skutkowało obniżeniem poziomu hormonu wzrostu w surowicy krwi. Podobnie, podawanie CP-101,606 do ARC skutkowało niższym stężeniem hormonu wzrostu w surowicy krwi, które wynikało z obniżonego poziomu GHRH, pozytywnie regulującego wydzielanie hormonu wzrostu z przysadki, zarówno w obszarze podwzgórza zawierającym jądro łukowate jak i w samej przysadce. Co ciekawe, dotychczasowe badania nad zaangażowaniem układów

monoaminergicznych w neuroendokrynną regulację cytochromu P450 w wątrobie wykazywały przeciwstawną rolę jąder przykomorowych i łukowatych podwzgórza w tychże mechanizmach (Bromek i wsp. 2013; Rysz i wsp. 2016b). Tymczasem kierunek działania po lokalnej iniekcji antagonisty receptora NMDA do jąder PVN lub ARC był taki sam, co wskazuje, iż w przypadku obwodowych podań CP-101,606 wypadkowy efekt oddziaływania związku na cytochrom P450 przez wymienione jądra podwzgórza powinien ulec wzmocnieniu.

W przypadku enzymu CYP3A obserwowano obniżenie aktywności CYP3A po podaniach antagonisty do PVN, natomiast po podaniach do ARC stwierdzono niższy poziom mRNA *CYP3A2* oraz tendencje spadkowe w poziomie aktywności. Słaba zależność pomiędzy mierzonymi parametrami biochemicznymi sugeruje złożony udział innych mechanizmów wpływających na ekspresję i aktywność enzymów z podrodziny CYP3A, takich jak zmiany potranskrypcyjne lub potranslacyjne (Aguiar i wsp. 2005). Enzymy CYP3A podlegają regulacji poprzez kortykosteron oraz częściowo przez hormon wzrostu (Waxman i wsp. 1995; Dvorak i Pavek 2010; Monostory i Dvorak 2011). Pomimo wspomnianych wyżej słabych zależności, kierunek zmian pomiędzy aktywnością i ekspresją enzymów podrodziny CYP3A a zmianami w poziomach hormonów miał spójny charakter. Nie wykazano zmian w ekspresji i aktywności CYP2C6 oraz CYP2D, dla których nie obserwowano wcześniej podatności na regulację neuroendokrynną, również w badaniach skupiających się na układach monoaminergicznych: dopaminergicznym, noradrenergicznym i serotonergicznym (Wójcikowski i wsp. 2007; Kot i Daniel 2011; Sadakierska-Chudy i wsp. 2013; Rysz i wsp. 2015). Za metabolizm związku CP-101,606 w wątrobie odpowiada CYP2D (Johnson i wsp. 2003; Taylor i wsp. 2006), którego ekspresja i aktywność nie uległa zmianie po lokalnych podaniach antagonisty do jąder podwzgórza, zaangażowanych w regulację hormonalną wątrobowych enzymów CYP.

Tabela 5. Podsumowanie wyników uzyskanych po 5-dniowym podawaniu związku CP-101,606 do jąder przykomorowych (PVN) lub łukowatych (ARC) podwzgórza na ekspresję i aktywność enzymów cytochromu P450 w wątrobie (A) oraz na wydzielanie hormonów (B).

A.

Droga podania CP-101,606	Podanie do PVN			Podanie do ARC		
	Poziom mRNA	Poziom białka	Aktywność	Poziom mRNA	Poziom białka	Aktywność
1A1	↓ (60%)	↓ (81%)	↓ (C8-kof 77%) (3N-kof 81%) (1N-kof 87%)	↓ (45%)	↓ (65%)	↓ (C8-kof 94%) (3N-kof 90%) (1N-kof 80%)
1A2	↓ (75%)			↓ (63%)		
2A1	↓ (37%)	– (71%)	↓ (81%)	– (103%)	– (86%)	– (100%)
2A2	↓ (50%)			– (58%)		
2B1	↓ (40%)	– (91%)	↓ (46%)	– (91%)	– (78%)	– (78%)
2B2	↓ (45%)			– (92%)		
2C6	– (118%)	↓ (79%)	– (92%)	– (103%)	↓ (82%)	– (111%)
2C11	↓ (54%)	↓ (60%)	↓ (2α-OH-T 68%) (16α-OH-T 17%)	↓ (44%)	↓ (64%)	↓ (2α-OH-T 75%) (16α-OH-T 15%)
2D	n.t.	– (106%)	– (95%)	n.t.	– (104%)	– (108%)
3A1	– (87%)	– (86%)	↓ (2β-OH-T 72%) (6β-OH-T 57%)	– (89%)	– (90%)	(↓) (2β-OH-T 84%) (6β-OH-T 62%)
3A2	– (85%)			↓ (57%)		

B.

Poziom hormonów	Podanie do PVN		Podanie do ARC	
	PVN	Przysadka	ARC	Przysadka
Hormon uwalniający hormon wzrostu	n.t.	– (89%)	↓ (45%)	↓ (78%)
Somatostatyna	↑ (281%)	↑ (132%)	n.t.	n.t.
	Surowica		Surowica	
Hormon wzrostu	↓ (81%)		↓ (63%)	
Kortykosteron	↓ (75%)		↓ (78%)	
Trójjodotyronina (T ₃)	↑ (122%)		– (89%)	
Tyrosyna (T ₄)	– (109%)		– (96%)	

↑ wzrost; ↓ spadek; (↑) tendencja wzrostowa; (↓) tendencja spadkowa; – bez zmian; n.t. nie testowano;
C8-kof, C8-hydroksykofeina; 3N-kof, 3-N-demetylokofeina; 1N-kof, 1-N-demetylokofeina; T, testosteron.

Wyniki uzyskane po 5-dniowym podawaniu selektywnego antagonisty podjednostki GluN2B receptora NMDA do jąder przykomorowych lub łukowatych podwzgórza wykazały zgodność z efektami obserwowanymi po 5-dniowym podawaniu tego związku drogą dootrzewnową (Bromek i wsp. 2021), natomiast odmienne rezultaty uzyskano po podaniach CP-101,606 do komór bocznych mózgu szczura (Pukło i wsp. 2023). Można przypuszczać, iż obwodowe podania antagonisty prowadzą do dystrybucji związku w całym mózgu (drogą układu krążenia), również w podwzgórzu, wywierając tym samym wpływ na badane jądra przykomorowe i łukowate, podczas gdy iniekcje CP-101,606 do komór bocznych mózgu szczura mogą mieć ograniczone oddziaływanie na niektóre struktury. W takich warunkach istotne znaczenie może mieć oddziaływanie z neuronami monoaminergicznymi w pniu mózgu zlokalizowanymi w pniu mózgu, które projektują do podwzgórza.

Związek CP-101,606 przenika przez barierę krew-mózg i wywołuje działanie przeciwdepresyjne u ludzi oraz działanie podobne do przeciwdepresyjnego u zwierząt (Preskorn i wsp. 2008; Poleszak i wsp. 2016). Badania dystrybucji CP-101,606 w mózgu wskazują na obecność CP-101,606 w całym organie po podaniu ogólnoustrojowym, szczególnie w przodomózgowiu (Menniti i wsp. 1997; Guscott i wsp. 2003; Ahmed i wsp. 2021). Dawki zastosowane w niniejszej pracy w podaniach domózgowych dobrano na podstawie dostępnej literatury naukowej. Podano lokalnie domózgowo małą dawkę CP-101,606 (1,5 μg /jądro; ok. 9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ w przeliczeniu na masę ciała), która spowodowała niskie stężenia związku w PVN i ARC, jak po podaniu dootrzewnowym (10–20 mg/kg) myszom lub szczurom (Stasiuk i wsp. 2017; Bromek i wsp. 2021), prawdopodobnie zbliżone do stężeń spodziewanych w mózgu człowieka po testowanych dawkach 50–300 mg doustnie lub 50–100 mg dożylnie (Bullock i wsp. 1999; Johnson i wsp. 2003; Taylor i wsp. 2006). Naszym zamiarem było rozróżnienie ośrodkowych efektów neuroendokrynych leku od jego ewentualnego wpływu na cytochrom P450 na poziomie wątroby, które mogą wystąpić po ogólnoustrojowym podaniu leku.

Dodatkowo przeprowadzono badania *in vitro*, w których CP-101,606 inkubowano ze szczurzymi mikrosomami wątrobowymi wykazały, iż antagonistą NMDA nie wykazuje bezpośredniego wpływu na regulowane hormonalnie białka enzymów CYP2A, CYP2B, CYP2C11 oraz CYP3A. Ponadto, badania wstępne

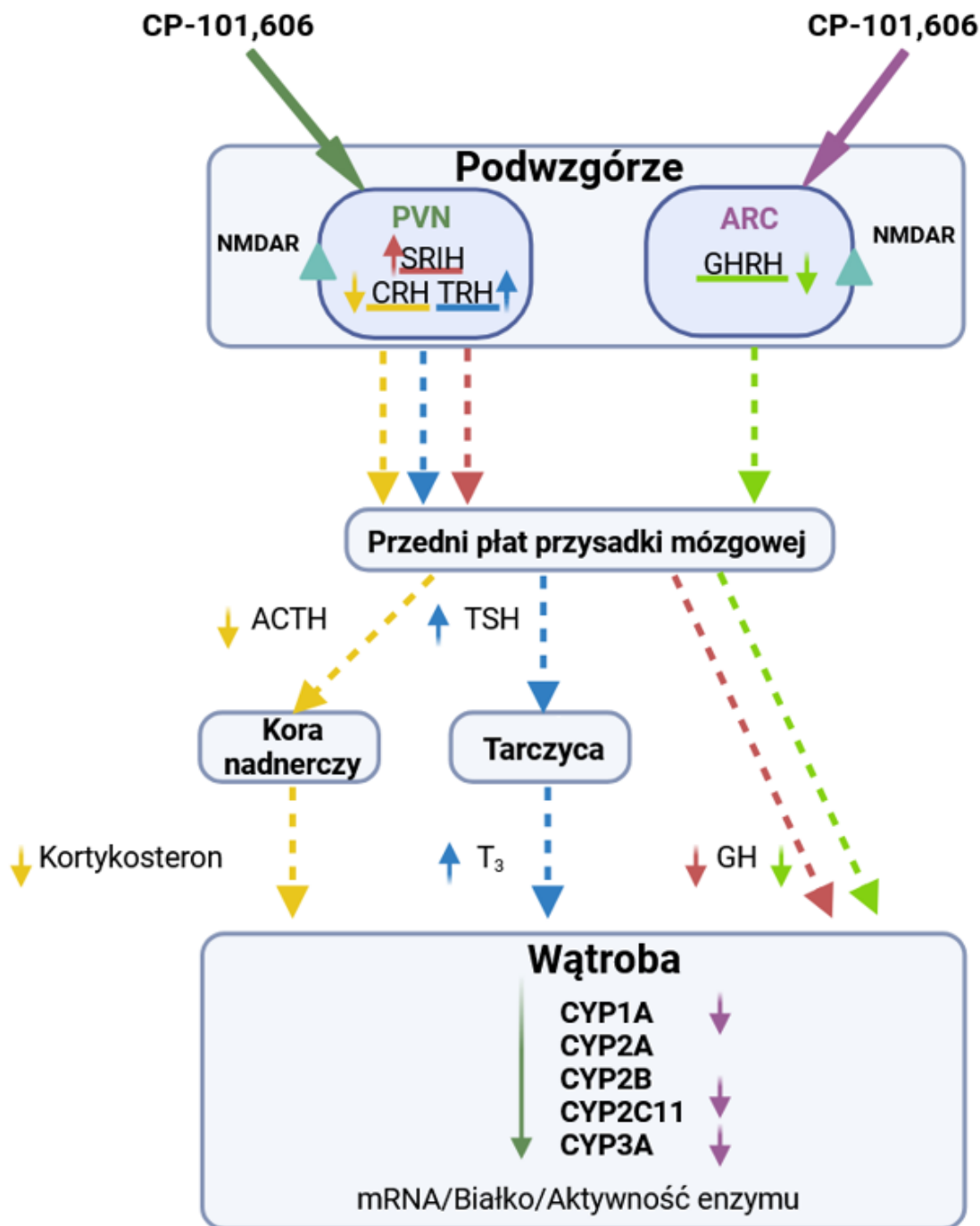
przeprowadzone w naszym Zakładzie z użyciem trójwymiarowych kultur komórkowych HepaRG wskazują, że 1-tygodniowa ekspozycja na działanie CP-101,606 nie wpływa istotnie na ekspresję i aktywność enzymów CYP, co pośrednio również wspiera wyniki badań *in vivo*, wskazujące na dominujący mechanizm neuroendokryny w oddziaływaniu badanego związku na wątrobowy cytochrom P450.

Biorąc pod uwagę powyższe wyniki badań, można założyć, iż wpływ obwodowego podania antagonisty na wątrobowy cytochrom P450 pochodzi głównie z oddziaływania związku na poziomie układu nerwowego mózgu. Dokładny mechanizm wpływu układu glutaminianergicznego poprzez receptory NMDA na komórki syntetyzujące i wydzielające hormony w jądrach przykomorowych i łukowatych podwzgórza nie jest znany, choć wiadomo, że receptory NMDA występują w całym mózgu, również w podwzgórzu oraz w strukturach wysyłających projekcje do jąder podwzgórza. Są to głównie receptory postsynaptyczne, ale także presynaptyczne (zarówno autoreceptory, jak i heteroreceptory) oraz pozasynaptyczne (Menniti i wsp. 1997; Ahmed i wsp. 2021; Rischka i wsp. 2022; Beaurain i wsp. 2024). Wykazano, iż receptory NMDA wpływają na działanie centralnego układu endokryny (Brann 1995; Arufe i wsp. 2002; Zhou i wsp. 2018).

Zgromadzone dane umożliwiają zaproponowanie mechanizmu centralnej regulacji neuroendokryny, za pośrednictwem którego badany antagonist NMDA może wpływać na ekspresję i aktywność wątrobowego cytochromu P450 (schemat ilustrujący proponowany mechanizm przedstawiono na rycinie 36). Zastosowanie selektywnego antagonisty podjednostki GluN2B receptora NMDA prowadzi do blokady receptorów NMDA w podwzgórzu, a następnie do:

- stymulacji osi PVN–somatostatyna → przysadka–hormon wzrostu
- stymulacji osi PVN–TRH → przysadka–TSH → tarczyca
- zahamowania osi PVN–CRH → przysadka–ACTH → nadnercza
- zahamowania osi ARC–GHRH → przysadka–hormon wzrostu,

czego konsekwencją jest spadek ekspresji i aktywności wątrobowych enzymów cytochromu P450.



Rycina 36. Schemat proponowanego mechanizmu wpływu blokady podjednostki GluN2B receptora NMDA na neuroendokrynną regulację wątrobowego cytochromu P450 u szczura, opracowany na podstawie działania związku CP-101,606 podawanego miejscowo do jąder przykomorowych (PVN) lub jąder łukowatych (ARC) podwzgórza. Blokada podjednostki GluN2B w jądrze przykomorowym (PVN) zwiększa wydzielanie somatostatyny (SRIH), co prowadzi do zahamowania wydzielania hormonu wzrostu (GH) przez przedni płat przysadki mózgowej i obniżenia ekspresji oraz aktywności CYP2C11 w wątrobie. Jednocześnie obserwuje się spadek stężenia kortykosteronu w surowicy krwi (wskazujący na hamowanie osi

CRH–ACTH–nadnercza) oraz wzrost poziomu trijodotyroniny (T_3), wynikający z aktywacji osi TRH–TSH–tarczyca. Zmiany te skutkują obniżeniem ekspresji i/lub aktywności enzymów wątrobowych z rodzin CYP1A, CYP2A, CYP2B i CYP3A. Blokada podjednostki GluN2B receptora NMDA w jądrze łukowatym (ARC) prowadzi do zmniejszenia wydzielania hormonu uwalniającego hormon wzrostu (GHRH), co skutkuje spadkiem wydzielania GH przez przysadkę oraz obniżeniem ekspresji i aktywności CYP2C11 w wątrobie. Równocześnie dochodzi do spadku poziomu kortykosteronu (wynikającego z obniżonego wydzielania ACTH przez przysadkę), co prowadzi do obniżenia ekspresji enzymów CYP1A i CYP3A w wątrobie.

Podsumowując, w niniejszej pracy przeprowadzono badania na temat roli receptora NMDA w centralnej regulacji neuroendokrynnej wątrobowego cytochromu P450 oraz znaczenia tej regulacji dla funkcjonowania enzymu po obwodowym podaniu antagonisty podjednostki GluN2B receptora NMDA. Jako narzędzie farmakologiczne zastosowano związek CP-101,606 o właściwościach przeciwdepresyjnych (Preskorn i wsp. 2008; Poleszak i wsp. 2016), jednakże prowadzone są badania nad innymi związkami tej klasy, również o potencjalnym zastosowaniu przeciwdepresyjnym (Bristow i wsp. 2017; Marcin i wsp. 2018; Freudenberg i wsp. 2024). Uzyskane wyniki wskazują, że receptory NMDA zawierające podjednostkę GluN2B uczestniczą w regulacji enzymów cytochromu P450 w wątrobie szczura. Szczególnie istotną rolę w tych mechanizmach pełnią podwzgórzowe jądra przykomorowe i łukowate, regulujące poziomy hormonu wzrostu, kortykosteronu i hormonów tarczycy w surowicy krwi, które są regulatorami ekspresji enzymów cytochromu P450 w wątrobie szczura. Zebrany materiał badawczy umożliwił pomiar poziomu hormonu wzrostu, hormonów tarczycy i kortykosteronu w surowicy krwi (które bezpośrednio regulują ekspresję cytochromu P450), oraz zbadanie poziomu hormonów regulujących wydzielanie hormonu wzrostu z przysadki w samej przysadce oraz w obszarach zawierających podwzgórzowe jądra przykomorowe i łukowate. Jednakże ze względu na ograniczenia techniczne i niską masę badanych struktur (około 8 mg), nie zmierzono jednocześnie (u tych samych zwierząt) poziomu hormonów uwalniających CRH i TRH oraz stymulujących ACTH i TSH.

Wskazane są dalsze badania, które pomogłyby szczegółowo wyjaśnić oddziaływanie związku CP-101,606 na podwzgórzowe jądra przykomorowe i łukowate, jak również potencjalne interakcje pomiędzy układem glutaminianergicznym a innymi układami neuroprzebieżnikowymi, w tym dopaminergicznym, noradrenergicznym

i serotonergicznym, w aspekcie regulacji hormonalnej i ekspresji wątrobowego cytochromu P450. Nie można wykluczyć, iż obwodowe podania antagonisty wpływają na aktywność układu glutaminianergicznego, który z kolei może modulować funkcję zlokalizowanych w pniu mózgu neuronów układu noradrenergicznego i serotonergicznego, pośrednio zmieniając profil wydzielania hormonów. Kolejnym etapem badań mogłaby być ocena innych związków blokujących podjednostkę GluN2B receptora NMDA lub innych podjednostek tego receptora na aktywność wątrobowych enzymów cytochromu P450, a następnie przeprowadzenie odpowiednich badań klinicznych w celu zweryfikowania, czy obserwowany w warunkach doświadczalnych wpływ antagonistów receptora NMDA na ekspresję cytochromu P450 ma również miejsce u ludzi, co może mieć istotne znaczenie kliniczne w kontekście metabolizmu endogennego oraz potencjalnych interakcji farmakokinetycznych podczas jednoczesnego stosowania antagonistów receptora NMDA z lekami ulegającymi metabolizmowi przez enzymy CYP.

VII. WNIOSKI

Badania przeprowadzone w ramach niniejszej pracy pozwoliły na następujące stwierdzenia:

1. Wyniki uzyskane po 5-dniowych podawaniach związku CP-101,606, selektywnego antagonisty podjednostki GluN2B receptora NMDA, do komórek bocznych mózgu szczura wywołały efekty odwrotne aniżeli po podaniach obwodowych (wzrost i spadek), co mogło wynikać z odmiennej dystrybucji badanego związku w mózgu po tych dwóch różnych drogach podania i/lub udział mechanizmów obwodowych po podaniu dootrzewnowym.
2. Różnice obserwowane po podaniu różnych dawek związku CP-101,606 do komórek bocznych mózgu szczura mogły być z kolei pochodną odmiennej dystrybucji związku w obrębie narządów okołokomorowych, związanej z położeniem anatomicznym jąder podwzgórza zaangażowanych w regulację sekrecji hormonów przysadkowych oraz aspektem farmakokinetycznym. Wydaje się, iż związek CP-101,606 mógł silniej oddziaływać na jądro przykomorowe, które wydziela somatostatynę, aniżeli na jądro łukowate uwalniające GHRH.
3. Pięciodniowe podawanie związku CP-101,606 do jąder przykomorowych lub łukowatych podwzgórza wywołało szereg zmian w ekspresji i aktywności wątrobowych enzymów CYP (spadek) oraz w poziomie hormonów. Kierunek tych zmian był zgodny z efektami obserwowanymi po 5-dniowym podawaniu antagonisty drogą dootrzewnową.
4. Mechanizm centralnej regulacji neuroendokrynnej, za pośrednictwem którego badany antagonist NMDA może wpływać na obniżenie ekspresji i aktywności wątrobowych enzymów CYP1A, CYP2A, CYP2B, CYP2C11 i CYP3A przebiega poprzez stymulację wydzielania somatostatyny oraz zahamowanie wydzielania GHRH z podwzgórza, regulujących kolejno negatywnie i pozytywnie wydzielanie hormonu wzrostu z przysadki mózgowej, jak również poprzez stymulację osi podwzgórze–przysadka–tarczyca, i zahamowanie osi podwzgórze–przysadka–nadnercza.

5. Kierunek działania antagonisty receptora NMDA podanego lokalnie do jąder przykomorowych lub łukowatych podwzgórza na wątrobowy cytochrom P450 był podobny, co wskazuje, iż w przypadku obwodowych podań CP-101,606 wypadkowy efekt oddziaływania związku na enzym poprzez wymienione jądra podwzgórza powinien ulegać wzmocnieniu, w przeciwieństwie do opisanych w literaturze naukowej układów monoaminergicznym, które wykazywały przeciwną rolę jąder przykomorowych i łukowatych podwzgórza w neuroendokrynej regulacji cytochromu P450.
6. Badania *in vitro* z użyciem szczurzych mikrosomów wątrobowych wykazały, iż związek CP-101,606 nie wpływa bezpośrednio na regulowane hormonalnie enzymy CYP2A, CYP2B, CYP2C11 oraz CYP3A.
7. Związek CP-101,606 nie wpływał na enzymy CYP2C6 i CYP2D, które nie są podatne na regulację hormonalną. Można zatem przypuszczać, że szybkość metabolizmu tego związku (ulegającego biotransformacji przez CYP2D) nie ulegnie zmianie podczas wielokrotnego podawania.
8. Wyniki badań otrzymane w niniejszej pracy wskazują, że wpływ obwodowego podania związku CP-101,606 na wątrobowy cytochrom P450 pochodzi głównie z oddziaływania związku na poziomie układu nerwowego mózgu.
9. Receptory NMDA zawierające podjednostkę GluN2B, obecne w jądrach przykomorowych i łukowatych podwzgórza, mają istotne znaczenie w mechanizmach regulacyjnych cytochromu P450 przez układ glutaminianergiczny.
10. Obserwowane zmiany w ekspresji i aktywności enzymów cytochromu P450 pod wpływem blokady receptora NMDA (przez nowe leki) mogą mieć znaczenie medyczne, zarówno dla metabolizmu substancji endogennych (np. sterydów), jak i biotransformacji jednocześnie podawanych innych leków, co może prowadzić do interakcji farmakokinetycznych.

VIII. STRESZCZENIE

Większość leków obecnie wydawanych na receptę jest metabolizowana przez enzymy z rodzin CYP1–3, które obok biotransformacji ksenobiotyków są zaangażowane również w metabolizm związków endogennych, takich jak kwas arachidonowy, hormony steroidowe czy przekaźniki monoaminergiczne. Różnice w poziomie ekspresji oraz funkcjonalności poszczególnych enzymów CYP mogą znacząco determinować metabolizm leków i innych substancji chemicznych prowadząc do interakcji farmakokinetycznych. Zróżnicowana ekspresja enzymów cytochromu P450 zależy od takich czynników jak płeć, rodzaj tkanki czy stadium rozwoju, a kontrola regulacyjna odbywa się za pośrednictwem hormonów, aktywujących odpowiednie receptory błonowe, jądrowe czy cytoplazmatyczne zależne od ligandu. Wydzielanie hormonów kontrolowane jest przez podwzgórze, unerwione przez różne układy neuroprzekaźnikowe, takie jak badane już wcześniej w kontekście cytochromu układy noradrenergiczny, dopaminergiczny czy serotonergiczny.

Celem niniejszej pracy było zbadanie wpływu związku CP-101,606, selektywnego antagonisty podjednostki GluN2B receptora NMDA, wykorzystywanego jako narzędzie farmakologiczne, na neuroendokrynną regulację cytochromu P450 w wątrobie przez układ glutaminianergiczny, a w szczególności identyfikację struktur mózgowych i hormonów pośredniczących w tym procesie. Receptor NMDA staje się atrakcyjnym celem dla poszukiwania nowych kandydatów na leki w zakresie chorób neurodegeneracyjnych czy depresji. Jak dotąd potencjalni kandydaci na leki oddziałujący poprzez receptor NMDA napotkali licznie trudności, takie jak problemy z przenikaniem przez barierę krew–mózg oraz skutki uboczne. Jednakże ze względu na ich potencjał terapeutyczny rozwijane są nowe związki tej klasy. Wstępne badania po dootrzewnowych podaniach związku CP-101,606 samcom szczurów rasy Wistar Han wykazały potencjalne zaangażowanie układu glutaminianergicznego w neuroendokrynną regulację wątrobowych enzymów cytochromu P450. Jednakże w przypadku podań obwodowych uzyskane efekty mogą być konsekwencją różnych bezpośrednich i pośrednich interakcji pomiędzy związkiem a enzymem, dlatego trudno jednoznacznie stwierdzić, czy mechanizm neuroendokrynnny jest w nim dominujący. Celem szczegółowego wyjaśnienia obserwowanych efektów po podaniach związku CP-101,606 zaplanowano i przeprowadzono wielokrotne podania selektywnego

antagonisty podjednostki GluN2B receptora NMDA do komórek bocznych mózgu szczura, a następnie do jąder przykomorowych i łukowatych podwzgórza, które wpływają na wydzielanie hormonów regulujących wątrobowe enzymy cytochromu P450. Sprawdzono również bezpośredni wpływ związku CP-101,606 na hormonalnie regulowane enzymy cytochromu P450.

Pięciodniowe podawanie CP-101,606 do komórek bocznych mózgu szczura (w dawkach 6, 15 lub 30 $\mu\text{g}/\text{mózg}$) wywierało zależny od dawki wpływ na enzymy cytochromu P450 w wątrobie oraz na hormony podwzgórza i przysadki. Najniższa dawka antagonisty prowadziła do zwiększenia aktywności, poziomu białka oraz mRNA izoformy CYP2C11 w porównaniu z grupą kontrolną. Aktywność enzymów CYP2A, CYP2B, CYP2C11, CYP2C6 i CYP2D, a także poziom białka CYP2B i CYP2C11, były wyższe po podaniu najniższej dawki w porównaniu z dawką najwyższą. Ponadto CP-101,606 zwiększał poziom białka CYP1A oraz poziom mRNA *CYP1A1* i *CYP1A2*, nie wpływając jednak na aktywność enzymatyczną tych enzymów. Badany antagonist obniżał poziom somatostatyny w przysadce mózgowej i zwiększał stężenie hormonu wzrostu w surowicy po zastosowaniu najniższej dawki, a jednocześnie, niezależnie od dawki, zmniejszał stężenie kortykosteronu w surowicy.

Pięciodniowe podawanie CP-101,606 do jądra przykomorowego podwzgórza zwiększało poziom somatostatyny zarówno w tym jądrze, jak i w przysadce mózgowej, obniżało stężenie hormonu wzrostu oraz kortykosteronu w surowicy, a jednocześnie podwyższało stężenie trójiodotyroniny. Zaobserwowano również spadek ekspresji (na poziomie mRNA i białka) oraz aktywności CYP1A1/2, CYP2A1/2, CYP2B1/2, CYP2C11 i CYP3A w wątrobie. Z kolei wielokrotne podawanie CP-101,606 do jądra łukowatego podwzgórza prowadziło do obniżenia poziomu hormonu uwalniającego hormon wzrostu w jądrze łukowatym i przysadce mózgowej oraz do spadku stężeń GH i kortykosteronu w surowicy, bez istotnych zmian w poziomie hormonów tarczycy. Stwierdzono również obniżenie ekspresji i aktywności wątrobowych enzymów CYP1A1/2 i CYP2C11, a także spadek poziomu mRNA *CYP3A2*.

Wyniki uzyskane po 5-dniowym podawaniu selektywnego antagonisty podjednostki GluN2B receptora NMDA do jąder przykomorowych lub łukowatych podwzgórza wykazały zgodność z efektami obserwowanymi po 5-dniowym podawaniu tego związku drogą dootrzewnową, natomiast odmienne rezultaty uzyskano po

podaniach CP-101,606 do komórek bocznych mózgu szczura. Dodatkowo, badania przeprowadzone *in vitro*, w których CP-101,606 inkubowano ze szczurzymi mikrosomami wątrobowymi wykazały, iż antagonistą NMDA nie wykazuje bezpośredniego wpływu na regulowane hormonalnie enzymy CYP2A, CYP2B, CYP2C11 oraz CYP3A. Zatem wydaje się, iż wpływ obwodowego podania antagonisty na wątrobowy cytochrom P450 pochodzi głównie z oddziaływania związku na poziomie ośrodkowego układu nerwowego, na drodze neuroendokrynej.

Uzyskane wyniki wskazują na istotną rolę receptorów NMDA zawierających podjednostkę GluN2B, obecnych w jądrach przykomorowych i łukowatych podwzgórza, w centralnej regulacji neuroendokrynej ekspresji i aktywności cytochromu P450 w wątrobie szczura. Obserwowane zmiany w ekspresji i aktywności enzymów cytochromu P450 pod wpływem blokady receptora NMDA (przez nowe leki) mogą mieć znaczenie medyczne, zarówno dla metabolizmu substancji endogennych (sterydów), jak i biotransformacji jednocześnie podawanych innych leków.

IX. SUMMARY

The majority of currently prescribed drugs are metabolized by enzymes belonging to the CYP1–3 families, which, in addition to their role in xenobiotic biotransformation, are also involved in the metabolism of endogenous compounds such as arachidonic acid, steroid hormones, and monoaminergic neurotransmitters. Variations in the expression levels and functional activity of individual CYP enzymes can significantly influence the metabolism of drugs and other chemical substances, thereby leading to pharmacokinetic interactions. The expression of cytochrome P450 enzymes is influenced by factors such as sex, tissue type, and developmental stage. Their regulatory control is mediated by hormones that activate specific ligand-dependent membrane, nuclear, or cytoplasmic receptors. Hormone secretion itself is regulated by the hypothalamus, which is innervated by various neurotransmitter systems – such as the noradrenergic, dopaminergic, and serotonergic pathways – that have already been studied in the context of cytochrome P450 regulation.

The aim of the present study was to investigate the effect of CP-101,606 – a pharmacological tool compound that acts as a selective antagonist of the GluN2B subunit of the NMDA receptor – on the neuroendocrine regulation of hepatic cytochrome P450 enzymes *via* the glutamatergic system, with particular emphasis on identifying the brain structures and hormones involved in this process. The NMDA receptor has emerged as a promising target in the search for novel therapeutic agents for neurodegenerative diseases and depression. However, candidate drugs targeting the NMDA receptor have encountered several challenges, including poor blood–brain barrier permeability and adverse side effects. Nevertheless, due to their therapeutic potential, new compounds of this class continue to be developed. Preliminary studies involving intraperitoneal administration of CP-101,606 to male Wistar Han rats indicated a possible involvement of the glutamatergic system in the neuroendocrine regulation of hepatic cytochrome P450 enzymes. However, in the case of peripheral administration, the observed effects may result from various direct or indirect interactions between the compound and the enzyme, making it difficult to determine whether a neuroendocrine mechanism is predominant. To clarify the nature of these effects, repeated administrations of the selective GluN2B subunit antagonist were performed into the lateral ventricles of the rat brain, followed by targeted injections into

the paraventricular and arcuate nuclei of the hypothalamus – structures involved in the control of hormone secretion that modulates hepatic CYP enzyme expression. Additionally, the direct effects of CP-101,606 on hormonally regulated cytochrome P450 enzymes were also examined.

Five-day administration of CP-101,606 into the lateral ventricles of the rat brain (at doses of 6, 15, or 30 µg/brain) exerted a dose-dependent effect on hepatic cytochrome P450 enzymes as well as on hypothalamic and pituitary hormones. The lowest dose of the antagonist resulted in increased activity, protein level, and mRNA expression of the CYP2C11 compared to the control group. The enzymatic activity of CYP2A, CYP2B, CYP2C11, CYP2C6, and CYP2D, as well as the protein levels of CYP2B and CYP2C11, were elevated at the lowest dose relative to the highest dose. Additionally, CP-101,606 increased CYP1A protein levels and upregulated mRNA expression of *CYP1A1* and *CYP1A2*, without affecting their enzymatic activity. The antagonist reduced somatostatin levels in the pituitary and elevated serum growth hormone concentrations at the lowest dose, while consistently decreasing serum corticosterone levels regardless of the dose applied.

Five-day administration of CP-101,606 into the paraventricular nucleus of the hypothalamus increased somatostatin levels both in this nucleus and in the pituitary gland, decreased serum concentrations of GH and corticosterone, and elevated triiodothyronine levels. A reduction in the expression (mRNA and protein) and activity of hepatic CYP1A1/2, CYP2A1/2, CYP2B1/2, CYP2C11, and CYP3A enzymes was also observed. In turn, repeated administration of CP-101,606 into the arcuate nucleus of the hypothalamus led to a decrease in growth hormone–releasing hormone levels in the arcuate nucleus and the pituitary gland, as well as reduced serum GH and corticosterone concentrations, without affecting thyroid hormone levels. Furthermore, a decrease in expression and activity of hepatic CYP1A1/2 and CYP2C11, as well as a reduction in *CYP3A2* mRNA levels, was noted.

The results obtained after five-day administration of the selective GluN2B subunit antagonist into the paraventricular or arcuate nuclei of the hypothalamus were consistent with the effects previously observed following intraperitoneal administration of the compound, whereas divergent results were obtained after administration into the lateral ventricles. Additionally, *in vitro* studies involving incubation of CP-101,606 with

rat liver microsomes demonstrated that the NMDA receptor antagonist does not exert a direct effect on hormonally regulated CYP enzymes, including CYP2A, CYP2B, CYP2C11, and CYP3A. Therefore, it appears that the effects of peripheral administration of the antagonist on hepatic cytochrome P450 are primarily mediated through its action at the level of the central nervous system and neuroendocrine pathway.

The obtained results indicate a significant role of NMDA receptors containing the GluN2B subunit, located in the paraventricular and arcuate nuclei of the hypothalamus, in the central neuroendocrine regulation of cytochrome P450 expression and activity in the rat liver. The observed changes in the expression and activity of cytochrome P450 enzymes following NMDA receptor blockade (e.g., by novel pharmacological agents) may be of medical importance, both for the metabolism of endogenous compounds (such as steroid hormones) and the biotransformation of concurrently administered drugs.

X. LITERATURA

1. Abdel-Razzak Z, Loyer P, Fautrel A, Gautier JC, Corcos L, Turlin B, Beaune P, Guillouzo A (1993) Cytokines down-regulate expression of major cytochrome P-450 enzymes in adult human hepatocytes in primary culture. *Mol Pharmacol* **44**:707–715.
2. Abdulla D, Goralski KB, Del Busto Cano EG, Renton KW (2005) The signal transduction pathways involved in hepatic cytochrome P450 regulation in the rat during a lipopolysaccharide-induced model of central nervous system inflammation. *Drug Metab Dispos* **33**:1521–1531.
3. Adell A (2020) Brain NMDA Receptors in Schizophrenia and Depression. *Biomolecules* **10**:947.
4. Agrawal AK, Shapiro BH (2000) Differential expression of gender-dependent hepatic isoforms of cytochrome P-450 by pulse signals in the circulating masculine episodic growth hormone profile of the rat. *J Pharmacol Exp Ther* **292**:228–237.
5. Aguiar M, Masse R, Gibbs BF (2005) Regulation of Cytochrome P450 by Posttranslational Modification. *Drug Metab Rev* **37**:379–404.
6. Aguilar E, Tena-Sempere M, Pinilla L (2005) Role of excitatory amino acids in the control of growth hormone secretion. *Endocr* **28**:295–301.
7. Ahmed H, Haider A, Varisco J, Stanković M, Wallimann R, Gruber S, Iten I, Häne S, Müller Herde A, Keller C, Schibli R, Schepmann D, Mu L, Wünsch B, Ametamey SM (2019) Structure-Affinity Relationships of 2,3,4,5-Tetrahydro-1H-3-benzazepine and 6,7,8,9-Tetrahydro-5H-benzo[7]annulen-7-amine Analogues and the Discovery of a Radiofluorinated 2,3,4,5-Tetrahydro-1H-3-benzazepine Congener for Imaging GluN2B Subunit-Containing N-Methyl-d-aspartate Receptors. *J Med Chem* **62**:9450–9470.
8. Ahmed H, Wallimann R, Haider A, Hosseini V, Gruber S, Robledo M, Nguyen TAN, Herde AM, Iten I, Keller C, Vogel V, Schibli R, Wünsch B, Mu L,

- Ametamey SM (2021) Preclinical Development of 18F-OF-NB1 for Imaging GluN2B-Containing N-Methyl-d-Aspartate Receptors and Its Utility as a Biomarker for Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J Nucl Med* **62**:259–265.
9. Ahmed H, Zheng M-Q, Smart K, Fang H, Zhang L, Emery PR, Gao H, Ropchan J, Haider A, Tamagnan G, Carson RE, Ametamey SM, Huang Y (2022) Evaluation of (rac)-, (R)-, and (S)-18F-OF-NB1 for Imaging GluN2B Subunit-Containing N-Methyl-d-Aspartate Receptors in Nonhuman Primates. *J Nucl Med* **63**:1912–1918.
 10. Alfonso M, Durán R, Arufe MC (2000) Effect of Excitatory Amino Acids on Serum TSH and Thyroid Hormone Levels in Freely Moving Rats. *Horm Res* **54**:78–83.
 11. Andersson U, Yang YZ, Björkhem I, Einarsson C, Eggertsen G, Gåfväls M (1999) Thyroid hormone suppresses hepatic sterol 12alpha-hydroxylase (CYP8B1) activity and messenger ribonucleic acid in rat liver: failure to define known thyroid hormone response elements in the gene. *Biochim Biophys Acta* **1438**:167–174.
 12. Arufe MC, Durán R, Perez-Vences D, Alfonso M (2002) Endogenous excitatory amino acid neurotransmission regulates thyroid-stimulating hormone and thyroid hormone secretion in conscious freely moving male rats. *Endocr* **17**:193–197.
 13. Auvin S, Dozières-Puyravel B, Avbersek A, Sciberras D, Collier J, Leclercq K, Mares P, Kaminski RM, Muglia P (2020) Radiprodil, a NR2B negative allosteric modulator, from bench to bedside in infantile spasm syndrome. *Ann Clin Transl Neurol* **7**:343–352.
 14. Bahman F, Choudhry K, Al-Rashed F, Al-Mulla F, Sindhu S, Ahmad R (2024) Aryl hydrocarbon receptor: current perspectives on key signaling partners and immunoregulatory role in inflammatory diseases. *Front Immunol* **15**:1421346.
 15. Barros-Oliveira M da C, Costa-Silva DR, dos Santos AR, Pereira RO, Soares-Júnior JM, Silva BB da (2021) Influence of *CYP19A1* gene expression levels in women with breast cancer: a systematic review of the literature. *Clinics* **76**:e2846.

16. Basińska-Ziobroń A, Danek PJ, Daniel WA (2025) The effect of prolonged treatment with antipsychotic drugs on cytochrome P450 - drug metabolizing enzymes. Mechanisms of action and significance for pharmacotherapy. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **21**:921–937.
17. Beaurain M, Salabert A-S, Payoux P, Gras E, Talmont F (2024) NMDA Receptors: Distribution, Role, and Insights into Neuropsychiatric Disorders. *Pharmaceuticals* **17**:1265.
18. Belousov AB, van den Pol AN (1997) Local synaptic release of glutamate from neurons in the rat hypothalamic arcuate nucleus. *J Physiol* **499**:747–761.
19. Ben-Eltriki M, Gayle EJ, Paras JM, Nyame-Addo L, Chhabra M, Deb S (2024) Vitamin D in Melanoma: Potential Role of Cytochrome P450 Enzymes. *Life* **14**:510.
20. Bertocchi I, Cifarelli L, Oberto A, Eva CE, Sprengel R, Mirza NR, Muglia P (2024) Radiprodil, a selective GluN2B negative allosteric modulator, rescues audiogenic seizures in mice carrying the GluN2A(N615S) mutation. *Br J Pharmacol* **181**:1886–1894.
21. Boobis AR, Sesardic D, Murray BP, Edwards RJ, Singleton AM, Rich KJ, Murray S, de la Torre R, Segura J, Pelkonen O (1990) Species variation in the response of the cytochrome P-450-dependent monooxygenase system to inducers and inhibitors. *Xenobiotica* **20**:1139–1161.
22. Borza I, Domány G (2006) NR2B selective NMDA antagonists: the evolution of the ifenprodil-type pharmacophore. *Curr Top Med Chem* **6**:687–695.
23. Brann DW (1995) Glutamate: a major excitatory transmitter in neuroendocrine regulation. *Neuroendocrinology* **61**:213–225.
24. Brann DW, Mahesh VB (1997) Excitatory amino acids: evidence for a role in the control of reproduction and anterior pituitary hormone secretion. *Endocr Rev* **18**:678–700.

25. Brigelius-Flohé R (2019) Metabolism of Vitamin E. *Food Chemistry, Function and Analysis* **14**:189–207.
26. Bristow LJ, Gulia J, Weed MR, Srikumar BN, Li Y-W, Graef JD, Naidu PS, Sanmathi C, Aher J, Bastia T, Paschapur M, Kalidindi N, Kumar KV, Molski T, Pieschl R, Fernandes A, Brown JM, Sivarao DV, Newberry K, Bookbinder M, Polino J, Keavy D, Newton A, Shields E, Simmermacher J, Kempson J, Li J, Zhang H, Mathur A, Kallem RR, Sinha M, Ramarao M, Vikramadithyan RK, Thangathirupathy S, Warriar J, Islam I, Bronson JJ, Olson RE, Macor JE, Albright CF, King D, Thompson LA, Marcin LR, Sinz M (2017) Preclinical Characterization of (*R*)-3-((3*S*,4*S*)-3-fluoro-4-(4-hydroxyphenyl)piperidin-1-yl)-1-(4-methylbenzyl)pyrrolidin-2-one (BMS-986169), a Novel, Intravenous, Glutamate *N*-Methyl-D-Aspartate 2B Receptor Negative Allosteric Modulator with Potential in Major Depressive Disorder. *J Pharmacol Exp Ther* **363**: 377–393.
27. Bromek E, Daniel WA (2021) The regulation of liver cytochrome P450 expression and activity by the brain serotonergic system in different experimental models. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **17**:413–424.
28. Bromek E, Haduch A, Rysz M, Jastrzębska J, Pukło R, Wójcikowska O, Danek PJ, Daniel WA (2021) The Selective NMDA Receptor GluN2B Subunit Antagonist CP-101,606 with Antidepressant Properties Modulates Cytochrome P450 Expression in the Liver. *Pharmaceutics* **13**:1643.
29. Bromek E, Wójcikowski J, Daniel WA (2013) Involvement of the paraventricular (PVN) and arcuate (ARC) nuclei of the hypothalamus in the central noradrenergic regulation of liver cytochrome P450. *Biochem Pharmacol* **86**:1614–1620.
30. Brøsen K, Skjelbo E, Rasmussen BB, Poulsen HE, Loft S (1993) Fluvoxamine is a potent inhibitor of cytochrome P4501A2. *Biochem Pharmacol* **45**:1211–1214.
31. Brtko J, Dvorak Z (2011) Role of retinoids, rexinoids and thyroid hormone in the expression of cytochrome p450 enzymes. *Curr Drug Metab* **12**:71–88.
32. Bu H-Z (2006) A Literature Review of Enzyme Kinetic Parameters for CYP3A4-Mediated Metabolic Reactions of 113 Drugs in Human Liver

- Microsomes: Structure- Kinetics Relationship Assessment. *Curr Drug Metab* 7:231–249.
33. Bullock MR, Merchant RE, Carmack CA, Doppenberg E, Shah AK, Wilner KD, Ko G, Williams SA (1999) An open-label study of CP-101,606 in subjects with a severe traumatic head injury or spontaneous intracerebral hemorrhage. *Ann N Y Acad Sci* **890**:51–58.
 34. Burford NG, Webster NA, Cruz-Topete D (2017) Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Modulation of Glucocorticoids in the Cardiovascular System. *Int J Mol Sci* **18**:2150.
 35. Chan S, Debono M (2010) Replication of cortisol circadian rhythm: new advances in hydrocortisone replacement therapy. *Ther Adv Endocrinol Metab* **1**:129–138.
 36. Chatuphonprasert W, Jarukamjorn K, Ellinger I (2018) Physiology and Pathophysiology of Steroid Biosynthesis, Transport and Metabolism in the Human Placenta. *Front Pharmacol* **9**:1027.
 37. Chen X, Xu C, Wang X, Yao Y, Wu G, Wu D (2022) CYP19A1 Is Regulated by BRD4 and Suppresses Castration-resistant Prostate Cancer Cell Invasion and Proliferation by Decreasing AR Expression. *Am J Cancer Res* **13**:4003–4020.
 38. Chiaro CR, Patel RD, Marcus CB, Perdew GH (2007) Evidence for an aryl hydrocarbon receptor-mediated cytochrome p450 autoregulatory pathway. *Mol Pharmacol* **72**:1369–1379.
 39. Choi HK, Waxman DJ (2000) Plasma Growth Hormone Pulse Activation of Hepatic JAK-STAT5 Signaling: Developmental Regulation and Role in Male-Specific Liver Gene Expression. *Endocrinology* **141**:3245–3255.
 40. Cieślik P, Wierońska JM (2020) Regulation of Glutamatergic Activity via Bidirectional Activation of Two Select Receptors as a Novel Approach in Antipsychotic Drug Discovery. *Int J Mol Sci* **21**:8811.
 41. Clark RG, Carlsson LM, Robinson IC (1987) Growth hormone secretory profiles in conscious female rats. *J Endocrinol* **114**:399–407.

42. Clarke SE, Ayrton AD, Chenery RJ (1994) Characterization of the inhibition of P4501A2 by furafylline. *Xenobiotica* **24**:517–526.
43. Daniel WA, Bromek E, Danek PJ, Haduch A (2022) The mechanisms of interactions of psychotropic drugs with liver and brain cytochrome P450 and their significance for drug effect and drug-drug interactions. *Biochem Pharmacol* **199**:115006.
44. Daniel WA, Haduch A, Syrek M, Boksa J (2006) Direct and indirect interactions between antidepressant drugs and CYP2C6 in the rat liver during long-term treatment. *Eur Neuropsychopharmacol* **16**:580–587.
45. Devesa J, Barros MG, Gondar M, Tresguerres JAF, Arce V (1995) Regulation of hypothalamic somatostatin by glucocorticoids. *J Steroid Biochem Mol Biol* **53**:277–282.
46. Dhir RN, Dworakowski W, Thangavel C, Shapiro BH (2006) Sexually Dimorphic Regulation of Hepatic Isoforms of Human Cytochrome P450 by Growth Hormone. *J Pharmacol Exp Ther* **316**:87–94.
47. Dhir RN, Shapiro BH (2003) Interpulse growth hormone secretion in the episodic plasma profile causes the sex reversal of cytochrome P450s in senescent male rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:15224–15228.
48. Díaz-Mardomingo M del C, Utrera L, Baliyan S, García-Herranz S, Suárez-Falcón JC, Rodríguez-Fernández R, Sampedro-Piquero P, Valencia A, Venero C (2023) Sex-related differences in the associations between diurnal cortisol pattern and social and emotional loneliness in older adults. *Front Psychol* **14**:1199405.
49. Djelti F, Braudeau J, Hudry E, Dhenain M, Varin J, Bièche I, Marquer C, Chali F, Ayciriex S, Auzeil N, Alves S, Langui D, Potier M-C, Laprevote O, Vidaud M, Duyckaerts C, Miles R, Aubourg P, Cartier N (2015) CYP46A1 inhibition, brain cholesterol accumulation and neurodegeneration pave the way for Alzheimer's disease. *Brain* **138**:2383–2398.
50. Du J, Li XH, Li YJ (2016) Glutamate in peripheral organs: Biology and pharmacology. *Eur J Pharmacol* **784**:42–48.

51. Dvorak Z, Pavek P (2010) Regulation of drug-metabolizing cytochrome P450 enzymes by glucocorticoids. *Drug Metab Rev* **42**:621–635.
52. Eap *Chin B, Ranjbar S, Gamma F, Von Plessen K, Von Gunten A, Conus P, Gras C, Piras M (2025) CYP2D6 GENOTYPES AND TREATMENT FAILURE WITH RISPERIDONE OR ARIPIPRAZOLE: RESULTS FROM A ONE-YEAR LONGITUDINAL STUDY. *Int J Neuropsychopharmacol* **28**:i88–i89.
53. Egunlusi AO, Joubert J (2024) NMDA Receptor Antagonists: Emerging Insights into Molecular Mechanisms and Clinical Applications in Neurological Disorders. *Pharmaceuticals* **17**:639.
54. Evanson NK, Herman JP (2015) Role of Paraventricular Nucleus Glutamate Signaling in Regulation of HPA Axis Stress Responses. *Interdiscip Inf Sci* **21**: 253–260.
55. Evanson NK, Van Hooren DC, Herman JP (2009) GluR5-mediated glutamate signaling regulates hypothalamo–pituitary–adrenocortical stress responses at the paraventricular nucleus and median eminence. *Psychoneuroendocrinology* **34**:1370–1379.
56. Faber MS, Jetter A, Fuhr U (2005) Assessment of CYP1A2 Activity in Clinical Practice: Why, How, and When? *Basic Clin Pharmacol Toxicol* **97**:125–134.
57. Farhy LS, Bowers CY, Veldhuis JD (2007) Model-projected mechanistic bases for sex differences in growth hormone regulation in humans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **292**:R1577–1593.
58. Fisher DA (1996) Physiological variations in thyroid hormones: physiological and pathophysiological considerations. *Clin Chem* **42**:135–139.
59. Frederiksen T (2023) Using population pharmacokinetic analyses of drugs metabolized by CYP2D6 to study the genotype–phenotype translation. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* **133**:113–123.

60. Freudenberg F, Reif-Leonhard C, Reif A (2024) Advancing past ketamine: emerging glutamatergic compounds for the treatment of depression. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*.
61. Fuchigami T, Fujimoto N, Haradahira T, Nojiri Y, Okauchi T, Maeda J, Suhara T, Yamamoto F, Nakayama M, Maeda M, Mukai T (2018) Synthesis and characterization of ¹¹C-labeled benzyl amidine derivatives as PET radioligands for GluN2B subunit of the NMDA receptors. *J Labelled Comp Radiopharm* **61**: 1095–1105.
62. Funae Y, Kishimoto W, Cho T, Niwa T, Hiroi T (2003) CYP2D in the Brain. *Drug Metab Pharmacokinet* **18**:337–349.
63. Garner R, Gopalakrishnan S, McCauley JA, Bednar RA, Gaul SL, Mosser SD, Kiss L, Lynch JJ, Patel S, Fandozzi C, Lagrutta A, Briscoe R, Liverton NJ, Paterson BM, Vornov JJ, Mazhari R (2015) Preclinical pharmacology and pharmacokinetics of CERC-301, a GluN2B-selective N-methyl-D-aspartate receptor antagonist. *Pharmacol Res Perspect* **3**:e00198.
64. Gerges SH, El-Kadi AOS (2023) Sexual Dimorphism in the Expression of Cytochrome P450 Enzymes in Rat Heart, Liver, Kidney, Lung, Brain, and Small Intestine. *Drug Metab Dispos* **51**:81–94.
65. Gibson GG, Plant NJ, Swales KE, Ayrton A, El-Sankary W (2002) Receptor-dependent transcriptional activation of cytochrome P4503A genes: induction mechanisms, species differences and interindividual variation in man. *Xenobiotica* **32**:165–206.
66. Gogas KR (2006) Glutamate-based therapeutic approaches: NR2B receptor antagonists. *Curr Opin Pharmacol* **6**:68–74.
67. Gonzalez FJ, Lee Y-H (1996) Constitutive expression of hepatic cytochrome P450 genes. *FASEB J* **10**:1112–1117.
68. Guengerich FP (2021) A history of the roles of cytochrome P450 enzymes in the toxicity of drugs. *Toxicol Res* **37**:1–23.

69. Guengerich FP (2018) Mechanisms of Cytochrome P450-Catalyzed Oxidations. *ACS Catal* **8**:10964–10976.
70. Guo Z, Zeng Q, Li Qiqi, Shan B, Huo Y, Shi X, Li Qifa, Du X (2024) LncRNA NORFA promotes the synthesis of estradiol and inhibits the apoptosis of sow ovarian granulosa cells through SF-1/CYP11A1 axis. *Biology Direct* **19**:107.
71. Guscott MR, Clarke HF, Murray F, Grimwood S, Bristow LJ, Hutson PH (2003) The effect of (+/-)-CP-101,606, an NMDA receptor NR2B subunit selective antagonist, in the Morris watermaze. *Eur J Pharmacol* **476**:193–199.
72. Haduch A, Bromek E, Pukło R, Jastrzębska J, Danek PJ, Daniel WA (2022) The Effect of the Selective N-methyl-D-aspartate (NMDA) Receptor GluN2B Subunit Antagonist CP-101,606 on Cytochrome P450 2D (CYP2D) Expression and Activity in the Rat Liver and Brain. *Int J Mol Sci* **23**:13746.
73. Haduch A, Wójcikowski J, Daniel WA (2008) Effect of selected antidepressant drugs on cytochrome P450 2B (CYP2B) in rat liver. An in vitro and in vivo study. *Pharmacol Rep* **60**:957–965.
74. Haduch A, Wójcikowski J, Daniel WA (2006) The effect of tricyclic antidepressants, selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) and newer antidepressant drugs on the activity and level of rat CYP3A. *Eur Neuropsychopharmacol* **16**:178–186.
75. Hankinson O (1995) The aryl hydrocarbon receptor complex. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **35**:307–340.
76. Hanson JE, Yuan H, Perszyk RE, Banke TG, Xing H, Tsai MC, Menniti FS, Traynelis SF (2024) Therapeutic potential of N-methyl-D-aspartate receptor modulators in psychiatry. *Neuropsychopharmacol* **49**:51–66.
77. Hargrove TY, Wawrzak Z, Guengerich FP, Lepesheva GI (2020) A requirement for an active proton delivery network supports a compound I-mediated C–C bond cleavage in CYP51 catalysis. *J Biol Chem* **295**:9998–10007.

78. Haufroid V, Hantson P (2015) CYP2D6 genetic polymorphisms and their relevance for poisoning due to amfetamines, opioid analgesics and antidepressants. *Clin Toxicol* **53**:501–510.
79. Henter ID, de Sousa RT, Zarate CAJ (2018) Glutamatergic Modulators in Depression. *Harv Rev Psychiatry* **26**:307.
80. Hertz L, Chen Y (2017) Integration between Glycolysis and Glutamate-Glutamine Cycle Flux May Explain Preferential Glycolytic Increase during Brain Activation, Requiring Glutamate. *Front Integr Neurosci* **11**:18.
81. Hiroi T, Chow T, Imaoka S, Funae Y (2002) Catalytic Specificity of CYP2D Isoforms in Rat and Human. *Drug Metab Dispos* **30**:970–976.
82. Hiroi T, Imaoka S, Funae Y (1998) Dopamine formation from tyramine by CYP2D6. *Biochem Biophys Res Commun* **249**:838–843.
83. Hiroi T, Kishimoto W, Chow T, Imaoka S, Igarashi T, Funae Y (2001) Progesterone oxidation by cytochrome P450 2D isoforms in the brain. *Endocrinology* **142**:3901–3908.
84. Honkakoski P, Negishi M (2000) Regulation of cytochrome P450 (CYP) genes by nuclear receptors. *Biochem J* **347**:321–337.
85. Hrabovszky E, Liposits Z (2008) Novel Aspects of Glutamatergic Signalling in the Neuroendocrine System. *J Neuroendocrinol* **20**:743–751.
86. Hu M-C, Hsu H-J, Guo I-C, Chung B (2004) Function of *Cyp11a1* in animal models. *Mol Cell Endocrinol* **215**:95–100.
87. Huang X-T, Yang J-X, Wang Z, Zhang C-Y, Luo Z-Q, Liu W, Tang S-Y (2021) Activation of N-methyl-D-aspartate receptor regulates insulin sensitivity and lipid metabolism. *Theranostics* **11**:2247–2262.
88. Iber H, Chen Q, Sewer M, Morgan ET (1997) Regulation of hepatic cytochrome P450 2C11 by glucocorticoids. *Arch Biochem Biophys* **345**:305–310.

89. Jaffe CA, Turgeon DK, Friberg RD, Watkins PB, Barkan AL (1995) Nocturnal augmentation of growth hormone (GH) secretion is preserved during repetitive bolus administration of GH-releasing hormone: potential involvement of endogenous somatostatin--a clinical research center study. *J Clin Endocrinol Metab* **80**:3321–3326.
90. Johnson K, Shah A, Jaw-Tsai S, Baxter J, Prakash C (2003) Metabolism, pharmacokinetics, and excretion of a highly selective N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, traxoprodil, in human cytochrome P450 2D6 extensive and poor metabolizers. *Drug Metab Dispos* **31**:76–87.
91. Kadono K, Koakutsu A, Naritomi Y, Terashita S, Tabata K, Teramura T (2014) Comparison of intestinal metabolism of CYP3A substrates between rats and humans: application of portal–systemic concentration difference method. *Xenobiotica* **44**:511–521.
92. Kehinde O, Ramsey LB, Gaedigk A, Oni-Orisan A (2023) Advancing CYP2D6 Pharmacogenetics through a Pharmaco-equity Lens. *Clin Pharmacol Ther* **114**: 69–76.
93. Kelly SL, Lamb DC, Jackson CJ, Warrilow AG, Kelly DE (2003) The biodiversity of microbial cytochromes P450. *Adv Microb Physiol* **47**:131–86.
94. Kirschbaum C, Wüst S, Hellhammer D (1992) Consistent sex differences in cortisol responses to psychological stress. *Psychosom Med* **54**:648–657.
95. Kiss J, Csaba Z, Csáki Á, Halász B (2006) Glutamatergic innervation of growth hormone-releasing hormone-containing neurons in the hypothalamic arcuate nucleus and somatostatin-containing neurons in the anterior periventricular nucleus of the rat. *Brain Res Bull* **70**:263–484.
96. Kliewer SA, Goodwin B, Willson TM (2002) The nuclear pregnane X receptor: a key regulator of xenobiotic metabolism. *Endocr Rev* **23**:687–702.
97. Korff M, Chaudhary A, Li Y, Zhou X, Zhao C, Rong J, Chen J, Xiao Z, Elghazawy NH, Sippl W, Davenport AT, Daunais JB, Wang L, Abate C, Ahmed H, Crowe R, Schmidt TJ, Liang SH, Ametamey SM, Wunsch B, Haider A (2023)

- Synthesis and Biological Evaluation of Enantiomerically Pure (R)- and (S)-[18F]OF-NB1 for Imaging the GluN2B Subunit-Containing NMDA Receptors. *J Med Chem* **66**:16018–16031.
98. Kot M, Daniel WA (2011) Cytochrome P450 is regulated by noradrenergic and serotonergic systems. *Pharmacol Res* **64**:371–380.
 99. Kot M, Daniel WA (2008) Relative contribution of rat cytochrome P450 isoforms to the metabolism of caffeine: The pathway and concentration dependence. *Biochem Pharmacol* **75**:1538–1549.
 100. Kot M, Sadakierska-Chudy A, Haduch A, Rysz M, Bromek E, Gołombiowska K, Daniel WA (2015) The role of the dorsal noradrenergic pathway of the brain (locus coeruleus) in the regulation of liver cytochrome P450 activity. *Eur J Pharmacol* **751**:34–41.
 101. Kou Z, Dai W (2021) Aryl Hydrocarbon Receptor: Its Roles in Physiology. *Biochem Pharmacol* **185**:114428.
 102. Ladagu AD, Olopade FE, Adejare A, Olopade JO (2023) GluN2A and GluN2B N-Methyl-D-Aspartate Receptor (NMDARs) Subunits: Their Roles and Therapeutic Antagonists in Neurological Diseases. *Pharmaceuticals* **16**:1535.
 103. Lamba V, Lamba J, Yasuda K, Strom S, Davila J, Hancock ML, Fackenthal JD, Rogan PK, Ring B, Wrighton SA, Schuetz EG (2003) Hepatic CYP2B6 Expression: Gender and Ethnic Differences and Relationship to CYP2B6 Genotype and CAR (Constitutive Androstane Receptor) Expression. *J Pharmacol Exp Ther* **307**:906–922.
 104. Larigot L, Juricek L, Dairou J, Coumoul X (2018) AhR signaling pathways and regulatory functions. *Biochim Open* **7**:1–9.
 105. Laz EV, Sugathan A, Waxman DJ (2009) Dynamic in vivo binding of STAT5 to growth hormone-regulated genes in intact rat liver. Sex-specific binding at low-but not high-affinity STAT5 sites. *Mol Endocrinol* **23**:1242–1254.

106. Lechan RM, Toni R (2000) Functional Anatomy of the Hypothalamus and Pituitary. W: *Endotext* (Feingold KR, Ahmed SF, Anawalt B, Blackman MR, Boyce A, Chrousos G, Corpas E, de Herder WW, Dhatariya K, Dungan K, Hofland J, Kalra S, Kaltsas G, Kapoor N, Koch C, Kopp P, Korbonits M, Kovacs CS, Kuohung W, Laferrère B, Levy M, McGee EA, McLachlan R, Muzumdar R, Purnell J, Rey R, Sahay R, Shah AS, Singer F, Sperling MA, Stratakis CA, Trencé DL, Wilson DP) South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000-. [Aktualizacja 28.11.2016]. Dostępne: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279126/>
107. Legrum W, Stuehmeier G, Netter KJ (1979) Cobalt as a modifier of microsomal monooxygenases in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology* **48**:195–204.
108. Lener MS, Kadriu B, Zarate CA (2017) Ketamine and Beyond: Investigations into the Potential of Glutamatergic Agents to Treat Depression. *Drugs* **77**:381–401.
109. Li AP, Kaminski DL, Rasmussen A (1995) Substrates of human hepatic cytochrome P450 3A4. *Toxicology* **104**:1–8.
110. Li J, Wan Y, Na S, Liu X, Dong G, Yang Z, Yang J, Yue J (2015) Sex-dependent regulation of hepatic CYP3A by growth hormone: Roles of HNF6, C/EBP α , and RXR α . *Biochem Pharmacol* **93**:92–103.
111. Liddle C, Goodwin BJ, George J, Tapner M, Farrell GC (1998) Separate and Interactive Regulation of Cytochrome P450 3A4 by Triiodothyronine, Dexamethasone, and Growth Hormone in Cultured Hepatocytes¹. *J Clin Endocrinol Metab* **83**:2411–2416.
112. Liddle C, Mode A, Legraverend C, Gustafsson JA (1992) Constitutive expression and hormonal regulation of male sexually differentiated cytochromes P450 in primary cultured rat hepatocytes. *Arch Biochem Biophys* **298**:159–166.
113. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**: 402–408.

114. Lorbek G, Lewinska M, Rozman D (2012) Cytochrome P450s in the synthesis of cholesterol and bile acids--from mouse models to human diseases. *FEBS J* **279**:1516–1533.
115. Lu J, Shang X, Zhong W, Xu Y, Shi R, Wang X (2020) New insights of CYP1A in endogenous metabolism: a focus on single nucleotide polymorphisms and diseases. *Acta Pharm Sin B* **10**:91–104.
116. Lynch C, Pan Y, Li L, Ferguson SS, Xia M, Swaan PW, Wang H (2013) Identification of Novel Activators of Constitutive Androstane Receptor from FDA-approved Drugs by Integrated Computational and Biological Approaches. *Pharm Res* **30**:489–501.
117. Ma Q, Lu AYH (2007) CYP1A induction and human risk assessment: an evolving tale of in vitro and in vivo studies. *Drug Metab Dispos* **35**:1009–1016.
118. Ma X, Idle JR, Gonzalez FJ (2008) The Pregnane X Receptor: From Bench to Bedside. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **4**:895–908.
119. Makrygianni EA, Chrousos GP (2023) Neural Progenitor Cells and the Hypothalamus. *Cells* **12**:1822.
120. Marcin LR, Warriar J, Thangathirupathy S, Shi J, Karageorge GN, Pearce BC, Ng A, Park H, Kempson J, Li J, Zhang H, Mathur A, Reddy AB, Nagaraju G, Tonukunuru G, Gupta GVRKM, Kamble M, Mannoori R, Cheruku S, Jogi S, Gulia J, Bastia T, Sanmathi C, Aher J, Kallem R, Srikumar BN, Vijaya KK, Naidu PS, Paschapur M, Kalidindi N, Vikramadithyan R, Ramarao M, Denton R, Molski T, Shields E, Subramanian M, Zhuo X, Nophsker M, Simmermacher J, Sinz M, Albright C, Bristow LJ, Islam I, Bronson JJ, Olson RE, King D, Thompson LA, Macor JE (2018) BMS-986163, a Negative Allosteric Modulator of GluN2B with Potential Utility in Major Depressive Disorder. *ACS Med Chem Lett* **9**:472–477.
121. Martignoni M, Groothuis GMM, de Kanter R (2006) Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **2**:875–894.

122. Matsumoto Y, Buemio A, Chu R, Vafae M, Crews D (2013) Epigenetic Control of Gonadal Aromatase (*cyp19a1*) in Temperature-Dependent Sex Determination of Red-Eared Slider Turtles. *PLoS One* **8**:e63599.
123. McMahon CD, Radcliff RP, Lookingland KJ, Tucker HA (2001) Neuroregulation of growth hormone secretion in domestic animals. *Domest Anim Endocrinol* **20**: 65–87.
124. Mejdrová I, Dušek J, Škach K, Stefela A, Skoda J, Chalupský K, Dohnalová K, Pavkova I, Kronenberger T, Rashidian A, Smutná L, Duchoslav V, Smutny T, Pávek P, Nencka R (2023) Discovery of Novel Human Constitutive Androstane Receptor Agonists with the Imidazo[1,2-a]pyridine Structure. *J Med Chem* **66**:2422–2456.
125. Menniti F, Chenard B, Collins M, Ducat M, Shalaby I, White F (1997) CP-101,606, a potent neuroprotectant selective for forebrain neurons. *Eur J Pharmacol* **331**:117–126.
126. Miller TL, Mayo KE (1997) Glucocorticoids Regulate Pituitary Growth Hormone-Releasing Hormone Receptor Messenger Ribonucleic Acid Expression. *Endocrinology* **138**:2458–2465.
127. Mohawk JA, Pargament JM, Lee TM (2007) Circadian Dependence of Corticosterone Release to Light Exposure in the Rat. *Physiol Behav* **92**:800–806.
128. Mohd Azmi NAS, Juliana N, Azmani S, Mohd Effendy N, Abu IF, Mohd Fahmi Teng NI, Das S (2021) Cortisol on Circadian Rhythm and Its Effect on Cardiovascular System. *Int J Environ Res Public Health* **18**:676.
129. Monostory K, Dvorak Z (2011) Steroid Regulation of Drug-Metabolizing Cytochromes P450. *Curr Drug Metab* **12**:154–172.
130. Monostory K, Kőhalmy K, Prough RA, Kőbori L, Vereczkey L (2005) The effect of synthetic glucocorticoid, dexamethasone on CYP1A1 inducibility in adult rat and human hepatocytes. *FEBS Lett* **579**:229–235.

131. Monostory K, Pascussi JM, Kóbori L, Dvorak Z (2009) Hormonal regulation of CYP1A expression. *Drug Metab Rev* **41**:547–572.
132. Müller EE (1989) Some aspects of the neurotransmitter control of anterior pituitary function. *Pharmacol Res* **21**:75–85.
133. Murayama N, Shimada M, Yamazoe Y, Kato R (1991) Difference in the susceptibility of two phenobarbital-inducible forms, P450IIB1 and P450IIB2, to thyroid hormone- and growth hormone-induced suppression in rat liver: phenobarbital-inducible P450IIB2 suppression by thyroid hormone acting directly, but not through the pituitary system. *Mol Pharmacol* **39**:811–817.
134. Nakamura M (2010) The mechanism of sex determination in vertebrates—are sex steroids the key-factor? *J Exp Zool A Ecol Genet Physiol* **313A**:381–398.
135. Nebert DW, Nelson DR, Coon MJ, Estabrook RW, Feyereisen R, Fujii-Kuriyama Y, Gonzalez FJ, Guengerich FP, Gunsalus IC, Johnson EF, Loper JC, Sato R, Waterman MR, Waxman DJ (1991) The P450 Superfamily: Update on New Sequences, Gene Mapping, and Recommended Nomenclature. *DNA and Cell Biol* **10**:1–14.
136. Nebert DW, Russell DW (2002) Clinical importance of the cytochromes P450. *Lancet* **360**:1155–1162.
137. Nelson DR (2006) Cytochrome P450 nomenclature, 2004. *Methods Mol Biol* **320**:1–10.
138. Netter KJ (1960) A Method for the Direct Measurement of O-Demethylation in Liver Microsomes and Its Use in Studying Microsome Inhibition by SKF-525-A. *Naunyn Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmacol* **238**:292–300.
139. Niciu MJ, Kelmendi B, Sanacora G (2012) Overview of Glutamatergic Neurotransmission in the Nervous System. *Pharmacol Biochem Behav* **100**:656–664.

140. Nishimuta H, Nakagawa T, Nomura N, Yabuki M (2013) Species differences in hepatic and intestinal metabolic activities for 43 human cytochrome P450 substrates between humans and rats or dogs. *Xenobiotica* **43**:948–955.
141. Niwa T, Murayama N, Imagawa Y, Yamazaki H (2015) Regioselective hydroxylation of steroid hormones by human cytochromes P450. *Drug Metab Rev* **47**:89–110.
142. Omura T, Sato R (1962) A New Cytochrome in Liver Microsomes. *J Biol Chem* **237**:1375–1376.
143. Omura T, Sato R (1964) The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. *J Biol Chem* **239**:2370–2385.
144. Onaolapo AY, Onaolapo OJ (2020) Dietary glutamate and the brain: In the footprints of a Jekyll and Hyde molecule. *NeuroToxicology* **80**:93–104.
145. O’Sullivan D, Millard WJ, Badger TM, Martin JB, Martin RJ (1986) Growth Hormone Secretion in Genetic Large (LL) and Small (SS) Rats. *Endocrinology* **119**:1948–1953.
146. Pampori NA, Agrawal AK, Shapiro BH (2001) Infusion of Gender-Dependent Plasma Growth Hormone Profiles Into Intact Rats: Effects of Subcutaneous, Intraperitoneal, and Intravenous Routes of Rat and Human Growth Hormone on Endogenous Circulating Growth Hormone Profiles and Expression of Sexually Dimorphic Hepatic Cyp Isoforms. *Drug Metab Dispos* **29**:8–16.
147. Pascussi JM, Gerbal-Chaloin S, Drocourt L, Assénat E, Larrey D, Pichard-Garcia L, Vilarem MJ, Maurel P (2004) Cross-talk between xenobiotic detoxication and other signalling pathways: clinical and toxicological consequences. *Xenobiotica* **34**:633–664.
148. Pascussi JM, Gerbal-Chaloin S, Drocourt L, Maurel P, Vilarem MJ (2003) The expression of CYP2B6, CYP2C9 and CYP3A4 genes: a tangle of networks of nuclear and steroid receptors. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* **1619**:243–253.

149. Pascussi JM, Gerbal-Chaloin S, Duret C, Daujat-Chavanieu M, Vilarem MJ, Maurel P (2008) The Tangle of Nuclear Receptors that Controls Xenobiotic Metabolism and Transport: Crosstalk and Consequences. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **48**:1–32.
150. Pavek P, Dvorak Z (2008) Xenobiotic-Induced Transcriptional Regulation of Xenobiotic Metabolizing Enzymes of the Cytochrome P450 Superfamily in Human Extrahepatic Tissues. *Curr Drug Metab* **9**:129–143.
151. Paxinos G, Watson C (2007) *The rat brain in stereotaxic coordinates*, 6th ed., Academic Press, London.
152. Perin-Dureau F, Rachline J, Neyton J, Paoletti P (2002) Mapping the binding site of the neuroprotectant ifenprodil on NMDA receptors. *J Neurosci* **22**:5955–5965.
153. Petroff OAC (2002) GABA and glutamate in the human brain. *Neuroscientist* **8**:562–573.
154. Pincus SM, Gevers EF, Robinson IC, van den Berg G, Roelfsema F, Hartman ML, Veldhuis JD (1996) Females secrete growth hormone with more process irregularity than males in both humans and rats. *Am J Physiol* **270**:E107–115.
155. Poleszak E, Stasiuk W, Szopa A, Wyska E, Serefko A, Oniszczyk A, Wośko S, Świąder K, Właż P (2016) Traxoprodil, a selective antagonist of the NR2B subunit of the NMDA receptor, potentiates the antidepressant-like effects of certain antidepressant drugs in the forced swim test in mice. *Metab Brain Dis* **31**:803–814.
156. Prakash C, Zuniga B, Song CS, Jiang S, Cropper J, Park S, Chatterjee B (2015) Nuclear Receptors in Drug Metabolism, Drug Response and Drug Interactions. *Nucl Receptor Res* **2**:101178.
157. Preskorn SH, Baker B, Kolluri S, Menniti FS, Krams M, Landen JW (2008) An innovative design to establish proof of concept of the antidepressant effects of the NR2B subunit selective N-methyl-D-aspartate antagonist, CP-101,606, in patients with treatment-refractory major depressive disorder. *J Clin Psychopharmacol* **28**:631–637.

158. Pukło R, Bromek E, Basińska-Ziobroń A, Haduch A, Kuban W, Danek PJ, Daniel WA (2025) The neuroendocrine regulation of hepatic cytochrome P450 by *N*-methyl-D-aspartate receptors in the paraventricular and arcuate nuclei of the hypothalamus. *Drug Metab Dispos* **53**:100143.
159. Pukło R, Bromek E, Haduch A, Basińska-Ziobroń A, Kuban W, Daniel WA (2023) Molecular Mechanisms of the Regulation of Liver Cytochrome P450 by Brain NMDA Receptors and via the Neuroendocrine Pathway-A Significance for New Psychotropic Therapies. *Int J Mol Sci* **24**:16840.
160. Ram PA, Waxman DJ (1992) Thyroid hormone stimulation of NADPH P450 reductase expression in liver and extrahepatic tissues. Regulation by multiple mechanisms. *J Biol Chem* **267**:3294–3301.
161. Ramanjulu JM, Williams SP, Lakdawala AS, DeMartino MP, Lan Y, Marquis RW (2021) Overcoming the Pregnane X Receptor Liability: Rational Design to Eliminate PXR-Mediated CYP Induction. *ACS Med Chem Lett* **12**:1396–1404.
162. Rehman G, Kumari N, Bano F, Tyagi RK (2023) Thyroid hormone receptor beta: Relevance in human health and diseases. *Endocr Metab Sci* **13**:100144.
163. Rettie AE, Jones JP (2005) CLINICAL AND TOXICOLOGICAL RELEVANCE OF CYP2C9: Drug-Drug Interactions and Pharmacogenetics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **45**:477–494.
164. Režen T, Ogris I, Sever M, Merzel F, Golic Grdadolnik S, Rozman D (2017) Evaluation of Selected CYP51A1 Polymorphisms in View of Interactions with Substrate and Redox Partner. *Front Pharmacol* **8**:417.
165. Riaz F, Pan F, Wei P (2022) Aryl hydrocarbon receptor: The master regulator of immune responses in allergic diseases. *Front Immunol* **13**:1057555.
166. Rifkind AB, Lee C, Chang TK, Waxman DJ (1995) Arachidonic acid metabolism by human cytochrome P450s 2C8, 2C9, 2E1, and 1A2: regioselective oxygenation and evidence for a role for CYP2C enzymes in arachidonic acid epoxyoxygenation in human liver microsomes. *Arch Biochem Biophys* **320**:380–389.

167. Rischka L, Murgaš M, Pichler V, Vranka C, Rausch I, Winkler D, Nics L, Rasul S, Silberbauer LR, Reed MB, Godbersen GM, Unterholzner J, Handschuh P, Gryglewski G, Mindt T, Mitterhauser M, Hahn A, Ametamey SM, Wadsak W, Lanzenberger R, Hacker M (2022) Biodistribution and dosimetry of the GluN2B-specific NMDA receptor PET radioligand (R)-[11C]Me-NB1. *EJNMMI Res* **12**:53.
168. Rischka L, Vranka C, Pichler V, Rasul S, Nics L, Gryglewski G, Handschuh P, Murgaš M, Godbersen GM, Silberbauer LR, Unterholzner J, Wotawa C, Haider A, Ahmed H, Schibli R, Mindt T, Mitterhauser M, Wadsak W, Hahn A, Lanzenberger R, Hacker M, Ametamey SM (2022) First-in-Humans Brain PET Imaging of the GluN2B-Containing N-methyl-d-aspartate Receptor with (R)-11C-Me-NB1. *J Nucl Med* **63**:936–941.
169. Rysz M, Bromek E, Daniel WA (2016a) Activation of brain serotonergic system by repeated intracerebral administration of 5-hydroxytryptophan (5-HTP) decreases the expression and activity of liver cytochrome P450. *Biochem Pharmacol* **99**:113–122.
170. Rysz M, Bromek E, Haduch A, Liskova B, Wójcikowski J, Daniel WA (2016b) The reverse role of the hypothalamic paraventricular (PVN) and arcuate (ARC) nuclei in the central serotonergic regulation of the liver cytochrome P450 isoform CYP2C11. *Biochem Pharmacol* **112**:82–89.
171. Rysz M, Bromek E, Haduch A, Sadakierska-Chudy A, Daniel WA (2015) Damage to the Brain Serotonergic System Increases the Expression of Liver Cytochrome P450. *Drug Metab Dispos* **43**:1345–1352.
172. Sadakierska-Chudy A, Haduch A, Rysz M, Gołembiowska K, Daniel WA (2013) The role of brain noradrenergic system in the regulation of liver cytochrome P450 expression. *Biochem Pharmacol* **86**:800–807.
173. Schaub C, Betti O, Bluett-Pajot MT, Vedrenne C, Lornet-Videau C, Szikla G (1980) Circadian patterns of growth hormone, prolactin and corticotrophin secretion in hypothalamic and extra-hypothalamic lesions localized by stereotactic neuro-radiology in humans. *Acta Psychiatr Belg* **80**:376–380.

174. Schousboe A, Scafidi S, Bak LK, Waagepetersen HS, McKenna MC (2014) Glutamate Metabolism in the Brain Focusing on Astrocytes. *Adv Neurobiol* **11**: 13–30.
175. Schreiber JA, Schepmann D, Frehland B, Thum S, Datunashvili M, Budde T, Hollmann M, Strutz-Seebohm N, Wünsch B, Seebohm G (2019) A common mechanism allows selective targeting of GluN2B subunit-containing N-methyl-D-aspartate receptors. *Commun Biol* **2**:1–14.
176. Schuetz EG, Wrighton SA, Barwick JL, Guzelian PS (1984) Induction of cytochrome P-450 by glucocorticoids in rat liver. I. Evidence that glucocorticoids and pregnenolone 16 alpha-carbonitrile regulate de novo synthesis of a common form of cytochrome P-450 in cultures of adult rat hepatocytes and in the liver in vivo. *J Biol Chem* **259**:1999–2006.
177. Schwartz TL, Sachdeva S, Stahl SM (2012) Glutamate Neurocircuitry: Theoretical Underpinnings in Schizophrenia. *Front Pharmacol* **3**:195.
178. Seliskar M, Rozman D (2007) Mammalian cytochromes P450—Importance of tissue specificity. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* **1770**:458–466.
179. Shah MB, Zhang Q, Halpert JR (2018) Crystal Structure of CYP2B6 in Complex with an Efavirenz Analog. *Int J Mol Sci* **19**:1025.
180. Shinkov A, Borissova AM, Vlahov J, Dakovska L, Blajeva E (2014) Male gender differences in the thyroid ultrasound features, thyroid peroxidase antibodies and thyroid hormone levels: a large population-based study. *J Endocrinol Invest* **37**:269–276.
181. Smith TJ, Drummond GS (1988) Thyroid hormone regulation of heme synthesis in rat liver. *Endocrinology* **122**:1964–1967.
182. Smutny T, Mani S, Pavek P (2013) Post-translational and Post-transcriptional Modifications of Pregnane X Receptor (PXR) in Regulation of the Cytochrome P450 Superfamily. *Curr Drug Metab* **14**:1059–1069.

183. Song Y, Li C, Liu G, Liu R, Chen Y, Li W, Cao Z, Zhao B, Lu C, Liu Y (2021) Drug-Metabolizing Cytochrome P450 Enzymes Have Multifarious Influences on Treatment Outcomes. *Clin Pharmacokinet* **60**:585–601.
184. Stasiuk W, Szopa A, Serefko A, Wyska E, Świąder K, Dudka J, Wlaź P, Poleszak E (2017) Influence of the selective antagonist of the NR2B subunit of the NMDA receptor, traxoprodil, on the antidepressant-like activity of desipramine, paroxetine, milnacipran, and bupropion in mice. *J Neural Transm (Vienna)* **124**:387–396.
185. Stern S, Kurian R, Wang H (2022) Clinical Relevance of the Constitutive Androstane Receptor. *Drug Metab Dispos* **50**:1010–1018.
186. Stringer B, Wynford-Thomas D, Jasani B, Williams ED (1981) Effect of goitrogen administration on the circadian rhythm of serum thyroid stimulating hormone in the rat. *Acta Endocrinol (Copenh)* **98**:396–401.
187. Su J, Chang C, Xiang Q, Zhou ZW, Luo R, Yang L, He ZX, Yang H, Li J, Bei Y, Xu J, Zhang M, Zhang Q, Su Z, Huang Ya, Pang Ji, Zhou SF (2014) Xyloketal B, a marine compound, acts on a network of molecular proteins and regulates the activity and expression of rat cytochrome P450 3a: a bioinformatic and animal study. *Drug Des Devel Ther* **8**:2555–2602.
188. Supiot LF, Benschop AAC, Nicolson ASJ, Haak R, Wolterink-Donselaar IG, Luijendijk MCM, Adan RAH, Poorthuis RB, Meje FJ (2024) A prefrontal cortex-lateral hypothalamus circuit controls stress-driven food intake. bioRxiv 2024.05.02.592146.
189. Tachibana M (2016) Epigenetics of sex determination in mammals. *Reprod Med Biol* **15**:59–67.
190. Takahashi N, Inui N, Morita H, Takeuchi K, Uchida S, Watanabe H, Nakamura H (2010) Effect of Thyroid Hormone on the Activity of CYP3A Enzyme in Humans. *J Clin Pharmacol* **50**:88–93.
191. Takemura H, Sakakibara H, Yamazaki S, Shimoi K (2013) Breast Cancer and Flavonoids - A Role in Prevention. *Curr Pharm Des* **19**:6125–6132.

192. Taylor TJ, Diring K, Russell T, Venkatakrishnan K, Wilner K, Crownover PH, Benincosa LJ, Gibbs MA (2006) Absolute oral bioavailability of traxoprodil in cytochrome P450 2D6 extensive and poor metabolisers. *Clin Pharmacokinet* **45**:989–1001.
193. Teo CH, Wong ACH, Sivakumaran RN, Parhar I, Soga T (2023) Gender Differences in Cortisol and Cortisol Receptors in Depression: A Narrative Review. *Int J Mol Sci* **24**:7129.
194. Tran LT, Park S, Kim SK, Lee JS, Kim KW, Kwon O (2022) Hypothalamic control of energy expenditure and thermogenesis. *Exp Mol Med* **54**:358–369.
195. Treberg JR, Banh S, Pandey U, Weihrauch D (2014) Intertissue differences for the role of glutamate dehydrogenase in metabolism. *Neurochem Res* **39**:516–526.
196. Uga M, Kaneko I, Shiozaki Y, Koike M, Tsugawa N, Jurutka PW, Miyamoto KI, Segawa H (2024) The Role of Intestinal Cytochrome P450s in Vitamin D Metabolism. *Biomolecules* **14**:717.
197. Ulrich-Lai YM, Jones KR, Ziegler DR, Cullinan WE, Herman JP (2011) Forebrain Origins of Glutamatergic Innervation to the Rat Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus: Differential Inputs to the Anterior Versus Posterior Subregions. *J Comp Neurol* **519**:1301–1319.
198. Vilčková M, Škereková M, Dobrota D, Kaplán P, Jurečková J, Kliment J, Híveš M, Dušenka R, Evin D, Brožová MK, Sivoňová MK (2023) Polymorphisms in the gene encoding CYP1A2 influence prostate cancer risk and progression. *Oncol Lett* **25**:1–9.
199. Voss CM, Arildsen L, Nissen JD, Waagepetersen HS, Schousboe A, Maechler P, Ott P, Vilstrup H, Walls AB (2021) Glutamate Dehydrogenase Is Important for Ammonia Fixation and Amino Acid Homeostasis in Brain During Hyperammonemia. *Front Neurosci* **15**:646291.
200. Wang F, Zhang X, Wang Y, Chen Y, Lu H, Meng X, Ye X, Chen W (2023) Activation/Inactivation of Anticancer Drugs by CYP3A4: Influencing Factors for Personalized Cancer Therapy. *Drug Metab Dispos* **51**:543–559.

201. Wang X, Rao J, Tan Z, Xun T, Zhao J, Yang X (2022) Inflammatory signaling on cytochrome P450-mediated drug metabolism in hepatocytes. *Front Pharmacol* **13**: 1043836.
202. Wang Y, Ji Q, Cao N, Ge G, Li X, Liu X, Mi Y (2024) CYP19A1 regulates chemoresistance in colorectal cancer through modulation of estrogen biosynthesis and mitochondrial function. *Cancer Metab* **12**:33.
203. Wang Y, Wu YR, Hsiao TH, Chen IC, Kung HF (2025) Genetic Variations in CYP19A1 and SLCO1B1 Genes and Their Association with Endometrial Cancer Risk in the Taiwanese Population: A Case–Control Study. *Int J Mol Sci* **26**:2461.
204. Waxman DJ, Holloway MG (2009) Sex Differences in the Expression of Hepatic Drug Metabolizing Enzymes. *Mol Pharmacol* **76**:215–228.
205. Waxman DJ, O’Connor C (2006) Growth Hormone Regulation of Sex-Dependent Liver Gene Expression. *Mol Endocrinol* **20**:2613–2629.
206. Waxman DJ, Ram PA, Notani G, LeBlanc GA, Alberta JA, Morrissey JJ, Sundseth SS (1990) Pituitary Regulation of the Male-Specific Steroid 6 β -Hydroxylase P-450 2a (gene product IIIA2) in Adult Rat Liver. Suppressive Influence of Growth Hormone and Thyroxine Acting at a Pretranslational Level. *Mol Endocrinol* **4**:447–454.
207. Waxman DJ, Ram PA, Pampori NA, Shapiro BH (1995) Growth hormone regulation of male-specific rat liver P450s 2A2 and 3A2: induction by intermittent growth hormone pulses in male but not female rats rendered growth hormone deficient by neonatal monosodium glutamate. *Mol Pharmacol* **48**:790–797.
208. Wells WA (2005) Microsomes are the in vitro ER. *J Cell Biol* **168**:13.
209. Werck-Reichhart D, Feyereisen R (2000) Cytochromes P450: a success story. *Genome Biol* **1**: REVIEWS3003.
210. Westerink WMA, Stevenson JCR, Schoonen WGEJ (2008) Pharmacologic profiling of human and rat cytochrome P450 1A1 and 1A2 induction and competition. *Arch Toxicol* **82**:909–921.

211. Williams PA, Cosme J, Ward A, Angove HC, Matak Vinković D, Jhoti H (2003) Crystal structure of human cytochrome P450 2C9 with bound warfarin. *Nature* **424**:464–468.
212. Wittmann G, Lechan RM, Liposits Z, Fekete C (2005) Glutamatergic innervation of corticotropin-releasing hormone- and thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus of the rat. *Brain Res* **1039**:53–62.
213. Wójcikowski J, Daniel WA (2011) The Role of the Nervous System in the Regulation of Liver Cytochrome P450. *Curr Drug Metab* **12**:124–138.
214. Wójcikowski J, Daniel WA (2009) The brain dopaminergic system as an important center regulating liver cytochrome P450 in the rat. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **5**:631–645.
215. Wójcikowski J, Gołmbiowska K, Daniel WA (2008) Regulation of liver cytochrome P450 by activation of brain dopaminergic system: Physiological and pharmacological implications. *Biochem Pharmacol* **76**:258–267.
216. Wójcikowski J, Gołmbiowska K, Daniel WA (2007) The regulation of liver cytochrome p450 by the brain dopaminergic system. *Curr Drug Metab* **8**: 631–638.
217. Wójcikowski J, Haduch A, Daniel WA (2013) Effect of antidepressant drugs on cytochrome P450 2C11 (CYP2C11) in rat liver. *Pharmacol Rep* **65**:1247–1255.
218. Wolbold R, Klein K, Burk O, Nüssler AK, Neuhaus P, Eichelbaum M, Schwab M, Zanger UM (2003) Sex is a major determinant of CYP3A4 expression in human liver. *Hepatology* **38**:978–988.
219. Xu L, Lin L, Xie N, Chen W, Nong W, Li R (2024) Role of aryl hydrocarbon receptors in infection and inflammation. *Front Immunol* **15**:1367734.
220. Yamazoe Y, Ling X, Murayama N, Gong D, Nagata K, Kato R (1990) Modulation of hepatic level of microsomal testosterone 7 alpha-hydroxylase,

- P-450a (P450IIA), by thyroid hormone and growth hormone in rat liver. *J Biochem* **108**:599–603.
221. Yamazoe Y, Murayama N, Shimada M, Kato R (1989) Thyroid hormone suppression of hepatic levels of phenobarbital-inducible P-450b AND P-450e and other neonatal P-450S in hypophysectomized rats. *Biochem Biophys Res Commun* **160**:609–614.
222. Yang H, Wang H (2014) Signaling control of the constitutive androstane receptor (CAR). *Protein Cell* **5**:113–123.
223. Yang M, Cao S (2022) Gender and Age-Specific Differences in the Association of Thyroid Function and Hyperuricemia in Chinese: A Cross-Sectional Study. *Int J Endocrinol* **2022**:2168039.
224. Yao Z, DuBois DC, Almon RR, Jusko WJ (2006) Modeling Circadian Rhythms of Glucocorticoid Receptor and Glutamine Synthetase Expression in Rat Skeletal Muscle. *Pharm Res* **23**:670–679.
225. Zanger UM, Schwab M (2013) Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacol Ther* **138**:103–141.
226. Zanger UM, Turpeinen M, Klein K, Schwab M (2008) Functional pharmacogenetics/genomics of human cytochromes P450 involved in drug biotransformation. *Anal Bioanal Chem* **392**:1093–1108.
227. Zaphiropoulos PG, Mode A, Norstedt G, Gustafsson JA (1989) Regulation of sexual differentiation in drug and steroid metabolism. *Trends Pharmacol Sci* **10**:149–153.
228. Zhan Y, Wang A, Yu Y, Chen J, Xu X, Nie J, Lin J (2023) Inhibitory mechanism of vortioxetine on CYP450 enzymes in human and rat liver microsomes. *Front Pharmacol* **14**:1199548.

229. Zhang C, Cheng Y, Chen W, Li Q, Dai R, Wang Y, and Yang T (2022) Association of CYP19A1 rs28757157 polymorphism with lung cancer risk in the Chinese Han population. *World J Surg Oncol* **20**:400.
230. Zhao Y, Chen ZX, Rewuti A, Ma YS, Wang XF, Xia Q, Fu D, Han YS (2013) Quantitative Assessment of the Influence of Cytochrome P450 1A2 Gene Polymorphism and Colorectal Cancer Risk. *PLoS One* **8**:e71481.
231. Zhao Y, Liu JC, Yu F, Yang LY, Kang CY, Yan LJ, Liu ST, Zhao N, Wang XH, Zhang XY (2023) Gender differences in the association between anxiety symptoms and thyroid hormones in young patients with first-episode and drug naïve major depressive disorder. *Front Psychiatry* **14**:1218551.
232. Zhou JJ, Gao Y, Zhang X, Kosten TA, Li DP (2018) Enhanced Hypothalamic NMDA Receptor Activity Contributes to Hyperactivity of HPA Axis in Chronic Stress in Male Rats. *Endocrinology* **159**:1537–1546.
233. Zhou SF (2008) Drugs Behave as Substrates, Inhibitors and Inducers of Human Cytochrome P450 3A4. *Curr Drug Metab* **9**:310–322.
234. Zhou SF, Wang B, Yang LP, Liu JP (2010) Structure, function, regulation and polymorphism and the clinical significance of human cytochrome P450 1A2. *Drug Metab Rev* **42**:268–354.
235. Zhou SF, Zhou ZW, Yang LP, Cai JP (2009) Substrates, Inducers, Inhibitors and Structure-Activity Relationships of Human Cytochrome P450 2C9 and Implications in Drug Development. *Curr Med Chem* **16**:3480–3675.
236. Zhou X, Meng F, Xiao L, Shen H (2023) CYP19A1 promotes gastric cancer as part of a lipid metabolism-related gene signature related to the response of immunotherapy and prognosis. *BMC Med Genomics* **16**:228.
237. Ziegler DR, Edwards MR, Ulrich-Lai YM, Herman JP, Cullinan WE (2012) Brainstem Origins of Glutamatergic Innervation of the Rat Hypothalamic Paraventricular Nucleus. *J Comp Neurol* **520**:2369–2394.

238. Zuber R, Anzenbacherová E, Anzenbacher P (2002) Cytochromes P450 and experimental models of drug metabolism. *J Cellular Molecular Medi* **6**:189–198.

Wyniki badań stanowiące podstawę niniejszej rozprawy doktorskiej zostały opublikowane w następujących artykułach:

- Pukło R, Bromek E, Haduch A, Basińska-Ziobroń A, Kuban W, Daniel WA (2023) Molecular Mechanisms of the Regulation of Liver Cytochrome P450 by Brain NMDA Receptors and via the Neuroendocrine Pathway-A Significance for New Psychotropic Therapies. *Int J Mol Sci* **24**:16840
- Pukło R, Bromek E, Basińska-Ziobroń A, Haduch A, Kuban W, Danek PJ, Daniel WA (2025) The neuroendocrine regulation of hepatic cytochrome P450 by *N*-methyl-D-aspartate receptors in the paraventricular and arcuate nuclei of the hypothalamus. *Drug Metab Dispos* **53**:100143.