

Studier av enzymer och transportproteiner av betydelse för skadliga effekter, sjukdomar och omsättning av xenobiotika hos häst (projnr. 0747199)

Bakgrund

För att kunna uppskatta risker för skadeverkningar av främmande substanser, undvika biverkningar och kunna ge en optimal läkemedelsterapi samt för att kunna förutsäga interaktionseffekter krävs kunskaper om hur läkemedel och andra främmande ämnen tas upp i kroppen, fördelas, metaboliseras och utsöndras. Dessa förhållanden styrs till stor del av enzymer och transportproteiner. Kunskapen om dessa enzymer och transportproteiner är mycket begränsad när det gäller häst. Syftet med det pågående projektet är att studera förekomst och aktivitet av enzymerna och transportproteinerna och betydelsen av dessa proteiner för uppkomst av skadliga effekter och vissa sjukdomar.

Hästar exponeras för en mängd olika främmande ämnen. Dessa inkluderar läkemedel och dessutom ett mycket stort antal potentiellt skadliga ämnen som hästar kan få i sig oavsiktligt (dessa ämnen kommer hädanefter att gemensamt att benämnas för xenobiotika). T.ex. kan skadliga mögelgifter finnas i foder av dålig hygienisk kvalitet. Även luften i dåliga stallmiljöer kan vara bemängd med skadliga substanser. Hur mycket xenobiotika som tas upp i kroppen samt hur ämnena fördelas, metaboliseras, bioaktiveras och utsöndras styrs till stor del av förekomst och aktivitet av enzymer och av transportproteiner (Leslie et al, Ding & Kamisky). Enzymerna och transportproteinerna finns främst uttryckta i vävnader som utgör ingångsvägarna vid exponering (mage/tarm och andningsvägar) och metabolism samt utsöndring (lever och njure) av xenobiotika. Förekomst och aktivitet av både enzymer och transportproteiner kan visa avsevärda variationer mellan arter (Chauret et al, Leslie et al). För att man ska kunna bedöma hur läkemedel omsätts hos häst, vilket är en förutsättning för att man ska kunna ge rätt dos och få en möjlighet att förutsäga om det finns risker för negativa interaktioner vid samtidig medicinering med flera läkemedel, krävs kunskaper om mängd och aktivitet av enzymerna och transportproteiner. Förändrad aktivitet eller förekomst av vissa enzymer engagerade i omsättningen av xenobiotika har hos människa även visats vara relaterade till uppkomst av inflammatoriska sjukdomar i luftvägar (astma) (Gilliland et al).

De enzymatiska reaktioner som ingår i metabolism av xenobiotika dels upp i två faser: fas I och fas II. Enzymerna som är aktiva i dessa reaktioner har studerats hos människa och laboratoriedjur medan däremot undersökningar på häst är mycket få (Larsson et al 2003, Tydén et al 2004, 2007, Nebbia et al). Bland de enzymer som deltar i fas I-reaktionerna är cytokrom P450 (CYP) -enzymerna av störst betydelse. Det är främst CYP-familjerna 1-3 som är involverade i metabolismen av främmande ämnen (Guengerich). Ibland kan CYP-reaktionerna ge metaboliter som är mer toxiska än ursprungssubstanserna, d.v.s. man får en bioaktivering så att det bildas elektrofila metaboliter eller reaktiva syremetaboliter som kan leda till skadliga effekter i form av akuta funktionsstörningar, inflammatoriska processer (Larsson et al 2003, Ding & Kaminsky). Vi har visat att det finns artskillnader i målorgan för de skadliga effekterna och att detta är relaterat till vävnadsspecifik CYP-beroende bioaktivering (Larsson 1994). Även superoxid-dismutas (SOD)-enzymerna, speciellt SOD3, har uppmärksamats som viktiga faktorer vid uppkomst av sjukdomar och skador i andningsvägarna. SOD-enzymerna katalyserar en del av de enzymatiska processer som

oskadliggör syreradikaler som kan bildas vid fas I reaktionerna (Rahman et al). Vid fas II-biotransformationen binds metaboliter, som bildats i fas I-reaktionerna, till kroppsegna molekyler. När det gäller elektrofila reaktiva metaboliter är konjugeringen till reducerat glutation (GSH) av störst betydelse (Strange et al). Konjugeringen till GSH katalyseras av en familj glutation-S-transferaser (GST). Isoenzymerna GSTP1 och GSTM1 anses ha en viktig skyddsfunktion i respirationsvägarna vad gäller uppkomst av inflammatoriska processer som kan leda till astma, bronkit och cancer hos människa (McCunney). Det är möjligt att på motsvarande sätt inhalation av xenobiotika som bioaktiveras i epitelcellerna i respirationsvägarna kan spela en roll i uppkomsten av (recurrent airway obstruction) RAO hos häst (Deaton et al).

Transportproteiner som tillhör "ATP-binding cassette (ABC) transporters" har under de senaste åren fått uppmärksamhet såsom varande mycket betydelsefulla för upptag och omsättning i kroppen av ett flertal läkemedel (Fricker et al). Transportproteinerna är lokaliserade i cellmembranen i olika vävnader och ut-transporterar ett stort antal strukturellt och funktionellt orelaterade substanser. Exempel på ämnen som transporteras är bl a antibiotika, antiparasitära läkemedel och antihistaminer. Det kan dock finnas avsevärda skillnader mellan olika arter när det gäller uttryck och funktion av transportörerna.

Material och metoder

Hästar

Vävnadsmaterial som används till gen- och proteinbestämningarna samt enzymaktivitetsbestämningar hämtas på Faringe slakteri i Huddunge från kliniskt friska svenska varmblodstravare (4-21år, ston och valacker). Slemhinnor från magtarmkanalen har samlats från 10 lika ställen längs tarmen och från levern. Från andningsvägarnas togs slemhinnor från luftstrupe och primär bronk (bronkens första bifurkationen) samt lungvävnad från vänstra diafragma loben ca 10 cm från den dorsala och caudala sidan. Proverna från lungan examinerades histopatologiskt. Vissa hästar hade en historia av RAO, så att lungvävnaden kunde klassas som normal eller med patologiska förändringar .

Genuttryck av cytokrom P450 enzymer, glutationtransferaser, SOD3 och hushållsgenerna GADPH, actin β och villin

Genuttrycket för transportproteinerna och enzymerna undersöks i olika vävnader med kvantitativ "real-time Reversed-Transcription Polymerase Chain Reaction" (real-time RT-PCR) med specifika primers och SYBR green. Primers för de olika proteinerna har designats baserat på nukleotidsekvenser hos häst som publicerats på Gendatabaserna NCBI i USA. Primers som ska generera PCR-produkter har designas så att de sträcker sig över två exoner inom respektive gen. De genererade PCR produkterna har sekvenserats på KI och alignments visade sig vara specifika för respektive gen på häst.

Proteinuttryck och cellulär lokalisation av CYP enzymerna, glutationtransferaserna och SOD3

Proteinuttryck för transportproteinerna och enzymerna studeras med antikroppar som finns kommersiellt tillgängliga. Den cellulära lokalisationen spårades med immunohistokemi på formalinfixerade paraffinbäddade vävnadssnitt. Proteinerna identifierades med immunoblotting på mikrosom- eller membranfraktioner från olika vävnader. Intensiteten på proteinbanden i gelen kvantifierades med ChemiDoc Gel Quantification System and Quantity-One software (Bio-Rad).

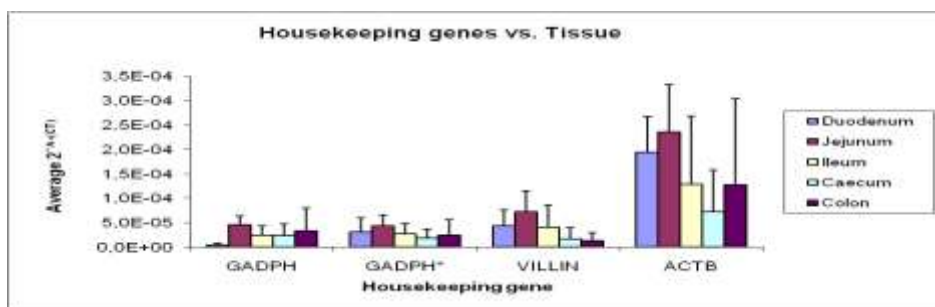
Katalytisk aktivitet av CYP enzymer

Den katalytiska aktiviteten av CYP isoenzymerna i tarmslemhinna och lever hos häst har mätts med EROD-aktiviteten som ett mått på CYP1A1 aktivitet samt P450-Glo assay L-IPA för CYP3A4 aktivitet och P450-Glo assay L-IH för CYP2C9 aktivitet (Promega, Madison, WI, USA). De olika enzym-assayerna har satts upp och validerats för att användas på mikrosomala proteinfraktioner av tarmslemhinna och lever från häst. Vi har även utfört inhibitionsstudier för att säkerställa att rätt CYP-isoenzym studeras. Vi har optimerat förutsättningarna för att mäta enzymaktiviteter i levern för alla tre enzym-assayerna.

Resultat och diskussion

Studie 1 – metodutveckling. Karaktärisering av hushållsgenerna GADPH, actin β och villin i tarm, lever samt njure hos häst.

Vid studier av genuttryck är det viktigt att kunna normalisera resultaten från Real-Tids (RT)-PCR så att det går att jämföra mellan olika vävnader och med andra studier. Numera gör man oftast en normalisering av sina data till hushållsgener (en grupp gener som är ansvariga för olika basala uppgifter i en cell). Det är viktigt att utvärdera om den hushållsgenen man väljer att använda skall uttryckas stabilt i de vävnader som ingår i studien. Detta ger möjlighet till normalisering av RT-PCR resultaten och även möjlighet att jämföra med genuttryck hos andra djurslag. Vi har därför tagit fram primers för tre tänkbara kandidater för hushållsgener på häst, GADPH, actin β och villin. De genererade PCR-produkterna har blivit sekvenserade på KI. Alignments (jämförelser) visade att dessa var mycket specifika för respektive gen.



Figur 1. Mängd mRNA uttryckt som $average\ 2^{-CT}$ score för de olika hushållsgenskandidaterna.

GADPH-genen visade minst variation mellan de examinerade vävnaderna (Figur 1) därför är det GADPH-genen som bör användas som hushållsgen för att normalisera genuttrycket av transportörer och enzymer i lever, tarm och njure. Ett annat sätt att normalisera mRNA uttrycket är att relatera till den totala mängden RNA som analyseras. Den metoden har vi använt oss av i dessa undersökningar.

Studie 2 – metodutveckling. Katalytisk aktivitet av CYP enzymer

CYP3A

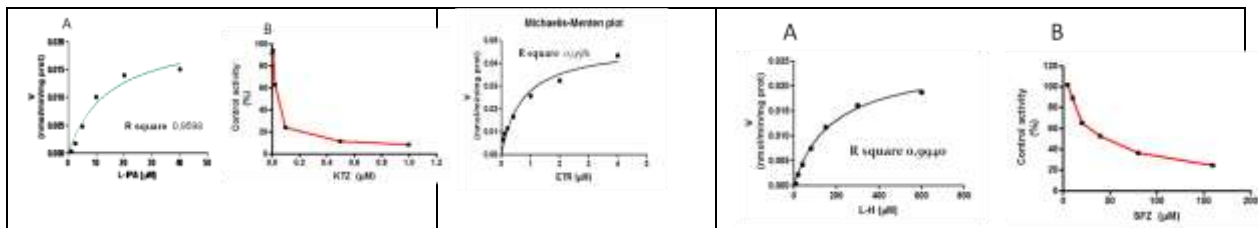
Vid CYP3A aktiviteten med P450-Glo Assays (L-IPA) är de optimala förhållandena 20 min inkubationstid med 30 μ g mikrosomalt protein. Enzymkinetiska beräkningar av inkubationer med olika substratkoncentrationer (L-IPA) visar att $K_m=14,5\ \mu$ M och $V_{max}=0,022$ nmol/min/mgprot för CYP3A i lever (Figur 2A). I en inhibitionsstudie med ketoconazol, specifik hämmare för humant CYP3A, fann vi ett IC_{50} på $0,035\ \mu$ M vilket ligger i ungefär samma storleksordning som för försök utförda med humana leverfraktioner (Figur 2B).

CYP1A

Vid mätning av CYP1A aktiviteten med EROD är de optimala förhållandena 15 min inkubationstid och en 0,4 mg protein /ml inkubationsmedia. Enzymkinetiska beräkningar av inkubationer med olika substratkoncentrationer (ETR) visar att $K_m=0,7244 \mu\text{M}$ och $V_{\text{max}}=0,04787 \text{ nmol/min/mg prot}$ för CYP1A i lever (Figur 3).

CYP2C

De preliminära resultaten av mätning av CYP2C aktiviteten med P450-Glo Assays (L-H) i lever visar att optimala förhållanden är en inkubations tid på 30 min med 30 μg protein. Enzymkinetiska beräkningar av inkubationer med olika substratkoncentrationer (L-H) visar att för CYP2C i lever är $K_m=175,9 \mu\text{M}$ och $V_{\text{max}}=0,025 \text{ nmol/min/mgprot}$ för (Figur 4A). I en inhibitionsstudie med sulfafenazol, specifik hämmare för humant CYP3A, fann vi ett IC_{50} på 47.2 μM vilket är högre än vad som är visat i försök med humanlever (Figur 4B).



Figur 2

Figur 3

Figur 4

Figur 2. (A) Michaelis-Menten plot som visar den katalytisk aktivitet av av CYP3A i lever hos häst. (B) Inhibition av CYP3C aktiviteten med ketokonazol.

Figur 3. Michaelis-Menten plot som visar den katalytisk aktivitet av CYP1A1 i lever hos häst

Figur 4. (A) Michaelis-Menten plot som visar den katalytiska aktiviteten av CYP2C i lever hos häst. (B) visar inhibition av CYP2C aktiviteten med sulfafenazol.

Studie 3. Gen- och proteinuttryck av transportproteinerna BCRP, MRP1 och MRP2 i olika vävnader hos häst.

Denna studie är avslutad och publicerad (se Publikationer som har finansierats med medel från projektet).

Transportproteiner som tillhör ”ATP-binding cassette (ABC) transporters” är mycket betydelsefulla för upptag och omsättning i kroppen av ett flertal läkemedel. De transportproteiner som räknas som de mest betydelsefulla är P-glykoprotein (P-gp), multidrug resistance protein 1 (MRP1) och 2 (MRP2) samt breast cancer resistance protein (BCRP) (Leslie et al). Det kan finnas avsevärda skillnader mellan olika species när det gäller uttryck och funktion av transportörerna. Vi har i ett tidigare publicerat arbete undersökt förekomsten av P-gp hos häst (Tydén et al 2009). I det här arbetet undersöktes gen- och proteinuttrycket av transportproteinerna BCRP, MRP1 och MRP2 i olika vävnader hos häst.

Resultaten från studien visade ett högt gen uttryck av BCRP och MRP2 tunntarmen med en lokalisering av transportörerna i de apikal membranerna av entrocyterna. Lokaliseringen av dessa transportörer i levern visade olika mönster med närvaro av BCRP i hepatocyter i perifera delar av levern lobuli och förekomst av MRP2 i membranerna i gallcanaliculi. I njuren var både BCRP och MRP2 var främst lokaliserade i distala tubuli och i Henles slynga. I de flesta vävnader var gen-och proteinuttryck av MRP1 betydligt lägre än för BCRP och MRP2.

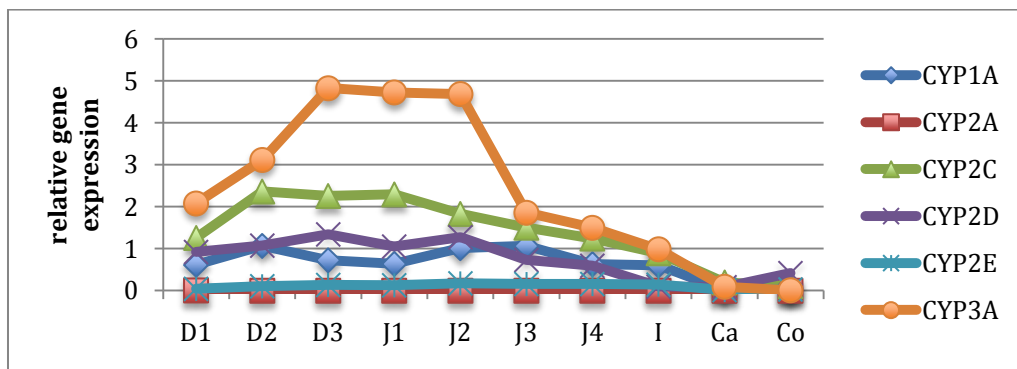
Immunfärgning av MRP1 detekterades endast i tarmen och var lokaliserad till cytoplasman av enterocyterna i caecum och colon samt till cellerna i serösa acini av Brunners körtlar i duodenum. De senare celler var också färgade för BCRP, men inte för MRP2.

BCRP, MRP1 och MRP2 finns uttryckta i tarmarna, lever och njurar hos häst och har sannolikt viktiga funktioner för oral biotillgänglighet, distribution och utsöndring av ämnen som är substrat för de transportörerna i hästen. Våra data visar också att det finns både likheter och skillnader i uttryck av transportörerna mellan häst och andra arter som kan medföra att utsöndringskapaciteten av substanser kan skilja sig åt.

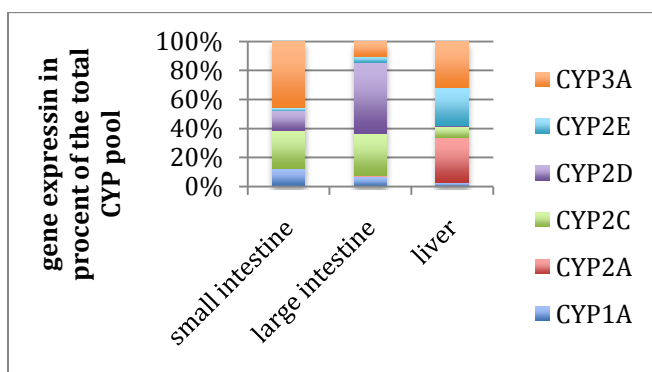
Studie 4. Gen- och proteinuttryck samt lokalisation av CYP1A, CYP2C, CYP2D, CYP2E och CYP3A i tarmslemhinna och lever hos häst.

I den här studien har vi undersökt gen och proteinuttryck hos häst av de CYP-enzymerna (CYP1A, CYP2A, CYP2C, CYP2D, CYP2E och CYP3A) som medverkar i fas I-metabolism av många läkemedel som är vanligt förekommande vid oral medicinering av häst.

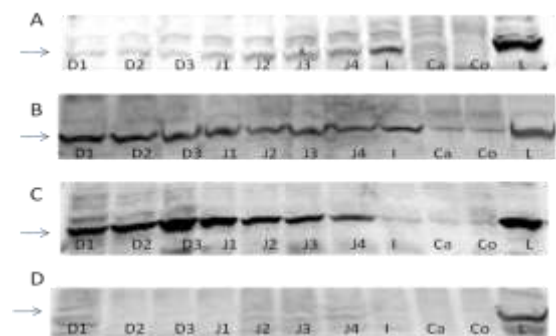
CYP2C, CYP2D, CYP2E och CYP3A genen visade ungefär samma mönster med höga uttryck i tunntarm och låga nivåer i grovtarmen (Figur 5). CYP3A var det enzym som hade det högsta genuttrycket i tarmen (Figur 1). CYP3A visade också högst uttryck i levern (Figur 6). Genuttrycket av CYP2E och CYP2A visade däremot ett annat mönster med mycket lågt genuttryck längs hela tarmen och högt uttryck i levern (Figur 6). Proteinuttrycket i tarm och lever visade samma mönster som för genuttrycket vilket tyder på att det finns en korrelation mellan genuttryck och proteinuttryck för CYP1A, CYP2C, CYP2D och CYP2E hos häst (Figur 7 A-D).



Figur 5.

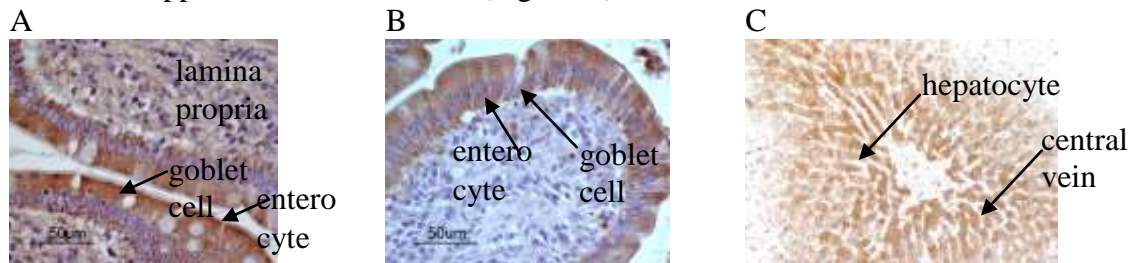


Figur 6



Figur 7. Western blot på mikrosomer från tarm och i lever hos häst. CYP1A (A), CYP2C (B), CYP2D (C) och CYP2E (D).

De immunohistokemiska analyserna att i tunntarmen var CYP2C och CYP2D lokaliserade till cytosolen i tarmcellerna. Hög immunoreaktivitet sågs framförallt på den apikala sidan av tarmcellerna med en minskande immunofärgning mot krypterna av villi. (Figur 8A och B). I grovtarmen var det en svag immunoreaktivitet i tarmcellerna. I levern var immunofärgningen framför allt lokaliserat till de centrilobulära delarna av leverlobuli, vilket tydligast visades med antikroppen riktad mot CYP2E (Figur 8C).



Figur 8 . Den bruna färgen visar immunoreaktivitet för de olika CYP antikropparna i vävnader från häst. CYP2C jejunum (A), CYP2D jejunum (B) och CYP2E levern (C).

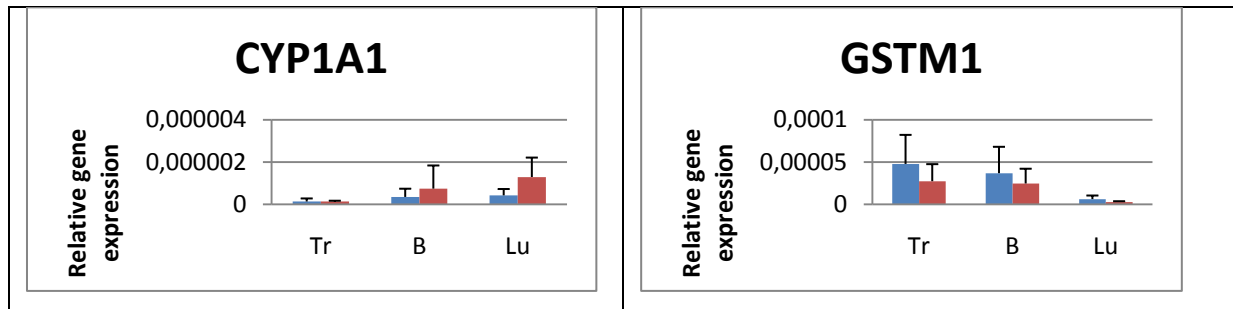
Studien visar att hur mycket som uttrycks av de undersökta CYP-enzymerna är olika i levern och de olika tarmavsnitten. Paine et al. (2) har visat en liknande rangordning för proteinet uttryckt av orthologues CYP-enzymerna i tarmen på människan som här har observerades för hästen. Både hos häst och människa är CYP3A-isoenzymerna de mest uttryckta CYP-enzymerna. För de andra CYP-enzymerna finns det vissa skillnader i levern rangordning av enzym-uttrycken mellan häst och människa. Variationen i uttrycket av CYP-isoenzymerna kan innebära skillnader i läkemedels omsättning mellan häst och människa.

Studie 5. Gen- och proteinuttryck av enzymer involverade i omsättning av främmande ämnen i luftvägarna hos häst.

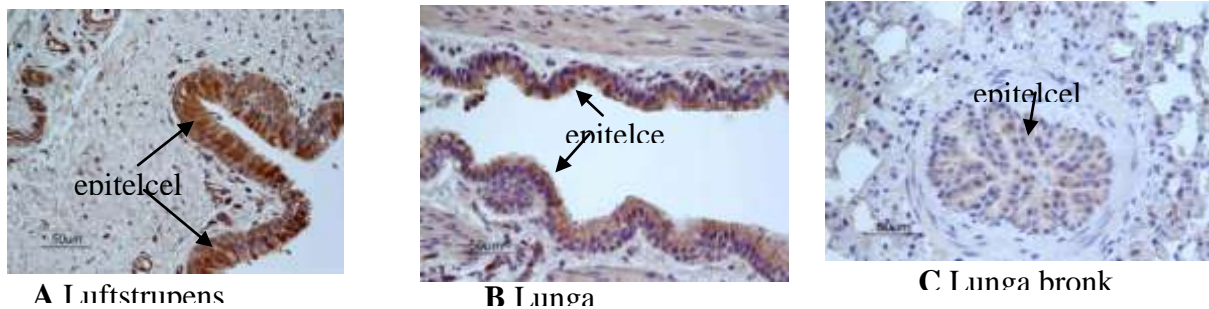
Vävnader i andningsvägarnas exponeras för skadliga ämnen som *in situ* kan omvandlas till toxiska metaboliter som orsakar oxidativ stress och inflammation. I den här undersökningen har vi studerat förekomst och lokaliseringen av enzymerna CYP1A1, CYP2A, CYP2E, CYP3A, GSTM1, GSTP1 och SOD3 hos friska hästar. Vi har även undersökt uttrycket av dessa enzymer i lungor hos hästar som har patologiska förändringar i lungorna som tyder på en historia av RAO.

Alla enzymer uttrycktes i luftvägarna. The högsta genuttryck av CYP1A1, CYP3A och SOD3 iaktogs i lungorna, medan GSTM1 och GSTP1 var mest uttryckta i trachea och bronk. CYP2A och CYP2E uttrycktes i ungefär lika nivå i alla vävnader. Betydande interindividuella variationer i halten av uttrycket av alla de enzymer observerades. I lungvävnad med histopatologiska förändringar det fanns en trend mot ett högre uttryck av CYP1A1 och ett lägre uttryck för GSTM1 jämfört med friska hästar (Figur 9). Lokaliseringen av enzymerna var huvudsakligen begränsad till epitelceller i slemhinnorna som bekläder respirationsvägarna (Figur 10).

De inter-individuella skillnader i uttrycket av enzymer involverade i bildandet av reaktiva metaboliter eller i försvarsmekanismer kan bidra till risken att utveckla lungsjukdomar. Trenden mot förändrat enzym uttryck hos hästar med inflammerade perifera luftvägarna tyder på att enzymerna i luftvägarna som är involverade i bioaktivering eller avgiftning av skadliga metaboliter kan ha en betydelse i kronisk bronkit hos häst.



Figur 9. Genuttryck av CYP1A1 och GSTM1 i normala hästar (blå) och hästar med patologiska förändringar (röd) i lungorna.

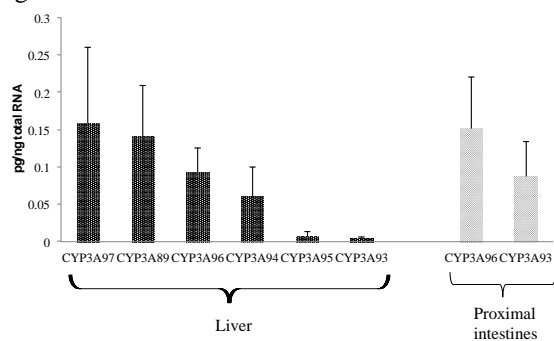


Figur 10 A-E. Den bruna färgen visar immunoreaktivitet för CYP-enzymerna i luftvägarna på häst. CYP1A (A), SOD3 (B) GSTP1 (C).

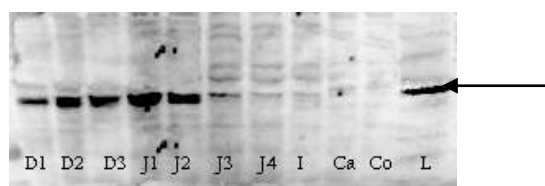
Studie 6 och 7. Genuttryck av CYP3A-isoformer i tarmslemhinna och lever samt i luftstrupe, bronk och lunga hos häst.

Enzymerna i CYP3A subfamiljen har mycket stor betydelse för metabolismen av många läkemedel och potentiellt skadliga ämnen. Nyligen har sju CYP3A isoformer – CYP3A89, CYP3A93, CYP3A94, CYP3A95, CYP3A96, CYP3A97 and CYP129 – isolerats från hästens genom (Schmitz et al 2010). I dessa två undersökningar studerades genuttrycket av de individuella isoformer av CYP3A i tarmen, luftvägarna samt levern hos häst. Dessutom examinerades protein uttrycket av CYP3A och den CYP3A-relaterade metaboliska aktiviteten i tam och lever hos häst.

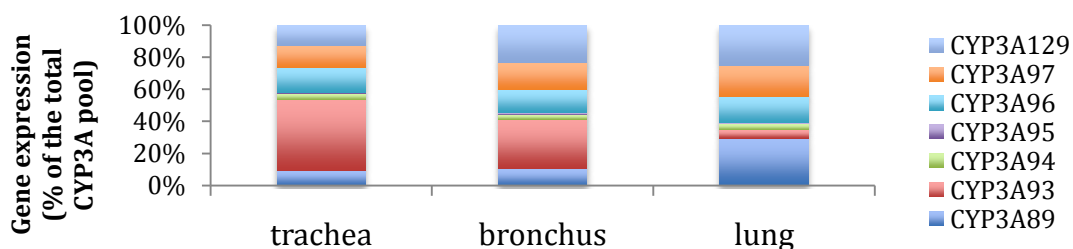
Figur 11



Figur 12



Figur 13



Resultaten av studierna visade att gen uttrycket av de olika CYP3A-isofromerna skilde väsentligt mellan de olika vävnaderna. I levern visade det sig att gen uttryck av CYP3A89, CYP3A94, CYP3A96 och CYP3A97 högt uttryckta, medan det i tarmen fanns två dominerande isoformer nämligen CYP3A93 och CYP3A96 (Figur 11). Isoformen CYP3A129 kunde inte alls detekteras vare sig i levern eller i tarmslemhinnan. I tarmen var de bägge isoformerna CYP3A96 och CYP3A93 högst uttryckta i duodenum och de proximala delarna av jejunum, det stämde väl överens med proteinuttrycker av CYP3A i dessa vävnader (Figur 12). Studierna av den metaboliska aktiviteten visade samma Km för LIPA substratet i levern och tarmen medan Vmax i levern var högre än i tarmen.

Table 1. The individual CYP3A gene expression in the airways in the individual horses included. Data are given as pg/mg total RNA.

Horse no	CYP3A89	CYP3A93	CYP3A94	CYP3A95	CYP3A96	CYP3A97	CYP3A129	Total CYP3A	Rank order
Trachea									
H1	38	332	10	3	509	127	7	1025	3
H2	2974	410	637	251	2894	4787	62	12013	1
H3	488	277	87	41	377	704	45	2018	2
H4	131	90	75	1	135	129	65	626	4
H5	14	88	11	n.d.	47	33	73	265	6
H6	4	89	6	n.d.	4	3	20	126	8
H7	2	34	3	n.d.	3	0	8	50	9
H8	0	237	3	n.d.	1	1	64	306	5
H9	n.d.	171	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	43	215	7
Bronchi									
H1	3218	193	538	123	2260	5148	11	11490	1
H2	213	398	48	11	139	385	258	1451	3
H3	2490	214	365	172	2253	3261	227	8981	2
H4	147	84	121	4	277	289	73	994	4
H5	43	94	11	8	69	44	379	649	5
H6	1	68	2	6	1	2	20	101	8
H7	0	22	n.d.	n.d.	15	1	6	44	9
H8	n.d.	44	n.d.	n.d.	2	0	196	242	6
H9	0	201	0	n.d.	4	n.d.	28	233	7
Lung									
H1	577	198	47	7	692	512	298	2331	4
H2	2435	115	112	52	703	1160	540	5116	2
H3	1090	84	150	87	880	1275	204	3770	3
H4	266	64	6	1	113	28	204	681	6
H5	4176	97	1074	104	4364	6846	172	16832	1
H6	66	8	34	2	46	83	53	292	9
H7	218	14	48	n.d.	190	178	183	831	5
H8	156	52	1	n.d.	1	5	293	507	7
H9	87	34	0	4	3	4	268	399	8

Till skillnad mot resultaten av gen uttrycken i tarm och lever visade det sig att alla CYP3A isoformer är uttryckta i luftstrupe, bronk och lunga hos häst, även CYP3A129 som i tidigare studier inte har kunnat påvisas i lever eller tarm (Figur 13). Gen uttrycket av de olika isoformerna varierade kraftigt mellan hästarna men i de flesta hästar visade CYP3A89, CYP3A96, CYP3A97 och CYP3A129 ett högt uttryck i de olika delarna av luftvägarna (Table 1, Figur 13). I de flesta hästar var CYP3A93 högst uttryckt i luftstrupens och bronkens

slemhinna men lågt i lunga. Genuttrycket av CYP3A94 och CYP3A95 var lågt i alla delar av luftvägarna.

Av resultaten kan det konstateras att i lever, tarmar och luftvägarna är det isoformen CYP3A96 det dominerande hästspecifika CYP3A-isoenzymet. Isoformerna CYP3A94 och CYP3A95 uttrycks däremot i mycket låg utsträckning i alla de undersökta vävnaderna. Våra fynd att genuttrycket av de olika CYP3A isoformerna varierar i levern och de olika tarmavsnitten mellan olika individer kan bidra till en bättre förståelse av kinetiken för oralt givna läkemedel till häst. Eftersom antalet läkemedel som används vid behandling regim av hästar har ökat under senare år och behandlingsregimer är ofta baserade på extrapolering från humanmedicin eller laboratorier försök, så skulle fler studier av substrat specificitet av hästspecifika CYP3A isoenzymer vara av intresse. Substraten för CYP3A isoenzymer omfattar ett brett utbud av strukturellt olika föreningar såsom steroider hormoner, olika kliniska läkemedel och xenobiotika (Ding & Kaminsky). De CYP3A-isoenzymer som finns i luftvägarna kan spela betydelsefull roll i den metaboliska nedbrytningen av inhalede xenobiotika. Men i vissa fall metabolismen kan i stället resultera i en bioaktivering av xenobiotika, vilket resulterar i vävnad skador.

Resultatförmedling

Publikationer och manuskript som har finansierats med medel från projektet

Tydén E, Björnström H, Tjälve H, Larsson P. (2010) Expression and localization of BCRP, MRP1 and MRP2 in intestines, liver and kidney in horse. *J. vet. Pharmacol. Therap.* 2010 Aug;33(4):332-40. doi: 10.1111/j.1365-2885.2009.01140.x.

Tydén E, Löfgren M, Pegolo S., Capolongo F, Tjälve H and Larsson P, Differential gene expression of CYP3A isoforms in equine liver and intestines. *Insänd till Xenobiotika.*

Tydén, E *, Löfgren M, Tjälve H, Larsson P, Gene-expression of CYP3A-isoenzymes in the airways in horse. *Insänd till Toxicol Appl Pharmacol.*

Tydén E, Tjälve H, Larsson P. Expression and localization of CYP1A, CYP2C, CYP2D, CYP2E and CYP3A in intestines and liver in horse. *Manuskript.*

Studien (studie 5) om enzymerna i luftvägarna samt lever hos häst är slutförd och ett manuskript kommer att färdigställas under hösten. Delresultat från studierna på luftvägarna kommer även att presenteras i september (2011) vid konferensen Cutting Edge Pathology i Uppsala.

Avhandling där en av publikationerna ingår

Eva Tydén. Cytochrome P450 3A and ABC-transport proteins in horse. 2008, publikation 5

Posters och föredrag vid internationella vetenskapliga konferenser där resultat från dessa undersökningar har presenterats

EAVPT (European Association for Veterinary Pharmacology and Toxicology) Leipzig 2009.

Föredrag: "Gene expression and cellular localization of isoenzymes of the CYP2A, CYP2C, CYP2D and CYP2E subfamilies in the intestines and liver in horse"

Poster: "Expression and localization of BCRP, MRP1 and MRP2 in intestines, liver and kidney in horse"

ISSX (International Society for the Study of Xenobiotics) Istanbul, sept, 2010.

Poster "Differential gene expression of CYP3A-isoforms in equine intestines and liver"

Cutting Edge Pathology i Uppsala sept, 2011

Poster "Expression of Enzymes Involved in Xenobiotic Metabolism in Equine Respiratory Tissues"

Posters med resultat från dessa undersökningar har även presenterats vid VH – fakultetens (SLU) forskardagar 2009 och 2010.

Referenser

- Chauret N, Gauthier A, Martin J, Nicoll-Griffith D A. (1997) In vitro comparison of cytochrome P450-mediated metabolic activities in human, dog, cat, and horse. *Drug Metab Dispos* 25, 1130-1136.
- Deaton CM, Deaton L, Jose-Cunilleras E, Vincent TL, Baird AW, Dacre K, Marlin DJ. (2007) Early onset airway obstruction in response to organic dust in the horse. *J Appl Physiol* 102,1071-7.
- Ding X, Kaminsky LS. (2003) Human extrahepatic cytochromes P450: function in xenobiotic metabolism and tissue-selective chemical toxicity in the respiratory and gastrointestinal tracts. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 43,149-73.
- Fricker G, Miller DS. (2002) Relevance of multidrug resistance proteins for intestinal drug absorption in vitro and in vivo. *Pharmacol Toxicol* 90, 5-13.
- Gilliland FD, Li YF, Saxon A, Diaz-Sanchez D. (2004) Effect of glutathione-S-transferase M1 and P1 genotypes on xenobiotic enhancement of allergic responses: randomised, placebo-controlled crossover study. *Lancet*, 363,119-25.
- Guengerich FP. (2006) Cytochrome P450s and other enzymes in drug metabolism and toxicity. 8, E101-11.
- Larsson, P. Biotransformation and retention of aflatoxin B₁ in extrahepatic tissues of various animal,species.ISBN91-576-4805-0.Thesis for the degree of Ph.D.Uppsala, Sweden(1994).
- Larsson P, Persson E, Tydén E, Tjälve H. (2003) Cell-specific activation of aflatoxin B₁ correlates with presence of some cytochrome P450 enzymes on olfactory and respiratory tissues in horse. *Res Vet Sci* 74, 227-233.
- Leslie EM, Deeley RG, Cole SP. (2005) Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicol Appl Pharmacol* 204, 216-3.
- McCunney RJ. (2005) Asthma, genes, and air pollution. *J Occup Environ Med* 47, 1285-91.
- Nebbia C, Dacasto M, Rossetto Giaccherino A, Giuliano Albo A, Carletti M. (2003) Comparative expression of liver cytochrome P450-dependent monooxygenases in the horse and in other agricultural and laboratory species. *Vet J* 165, 53-64.
- Paine, M.F., Hart, H.L., Ludington, S.S., Haining, R.L., Rettie, A.E., Zeldin, D.C., 2006, The human intestinal cytochrome P450 "pie". *Drug Metabolism and Disposition* 34, 880–886.
- Schmitz, A., Demmel, S., Peters, L.M., Leeb, T., Mevissen, M., Haase, B., 2010, Comparative human-horse sequence analysis of the CYP3A subfamily gene cluster. *Animal Genetics* 41 Suppl 2, 72–79.
- Strange RC, Spiteri MA, Ramachandran S, Fryer AA. (2001) Glutathione-S-transferase family of enzymes. *Mutat Res* 482, 21-6.
- Tydén E, Olsén L, Tallkvist J, Larsson P, Tjälve H. (2004) CYP3A in horse intestines. *Appl Pharmacol* 201, 112-119.
- Tydén E, Tallkvist J, Tjälve H, Larsson P. (2008) Cytochrome P450 3A, NADPH cytochrome P450 reductase and cytochrome b5 in the upper airways in horse *Research in Veterinary Science*. *Res Vet Sci*. Aug;85(1):80-5
- Tydén E, Tallkvist J, Tjälve H and Larsson P. (2009) P-glycoprotein in intestines, liver, kidney and lymphocytes in horse. *J. vet. Pharmacol. Therap.* 32, 167–176, doi: 10.1111/j.1365-2885.2008.01017.x.
- Rahman, I., Biswas, K. S., Kode, A. (2006) Oxidant and Antioxidant Balance in the Airways and Airway Diseases. *Eur. J. Pharm.*, Vol. 533, 222-239.