

DANUTA PALUT, GRAŻYNA KOSTKA, BOŻENA WIADROWSKA, ROBERT BAŃKOWSKI

WPŁYW DIKLOFOPU NA WYBRANE ENZYMY METABOLIZUJĄCE
SUBSTANCJE OBCE W WĄTROBIE SZCZURÓW RASY WISTAR

THE EFFECT OF DICLOFOP ON SOME DRUG METABOLIZING ENZYMES
IN THE LIVER OF WISTAR RATS

Zakład Toksykologii Środowiskowej
Państwowy Zakład Higieny
00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24
Kierownik: Prof. dr hab. Jan K. Ludwicki

Diklofop, herbicyd z grupy pochodnych kwasu fenoksypropionowego, nie wykazuje właściwości induktorów CYP1A i słabo stymuluje aktywność CYP2B w wątrobie szczura. Natomiast wyniki sugerują, że badany związek hamuje aktywność fenolowej formy UDP-glukuronylotransferazy.

Metabolizm heterogennej grupy substancji pochodzenia endogennego i egzogenne- go katalizuje głównie układ enzymatyczny zw. monooksydazami o mieszanej funkcji, w którym końcową oksydazę stanowią różne formy molekularne (rodziny i podrodziny) cytochromu P-450 (CYPs). Substratami CYPs są środowiskowe substancje chemiczne (leki, środki ochrony roślin, zanieczyszczenia przemysłowe, używki) oraz ważne fizjologicznie związki endogenne (cholesterol, hormony sterydowe, kwasy tłuszczowe i żółciowe, witaminy rozpuszczalne w tłuszczach, prostaglandyny, aminy biogenne, bilirubiny) [7, 9, 12]. U ssaków CYPs są z reguły białkami błonowymi występującymi we wszystkich tkankach za wyjątkiem mięśni szkieletowych i erytrocytów, przy czym najwyższą aktywność wykazano w wątrobie. Ogromna różnorodność i niezliczona liczba substratów jak też reakcji katalizowanych przez CYPs tłumaczy występowanie nie jednej ale szeregu form molekularnych CYPs o różnej lecz częściowo nakładającej się na siebie specyficzności substratowej [11, 12], co wyjaśnia udział CYPs w przemianach substancji chemicznych różniących się zarówno budową chemiczną jak i aktywnością biologiczną.

CYP bierze udział w I fazie metabolizmu, tj. w reakcjach utlenienia, redukcji i hydrolizy. Jedną bowiem z podstawowych funkcji CYPs jest przekształcenie niepolarnych związków chemicznych w metabolity bardziej polarne, które z kolei w wyniku II fazy biotransformacji tj. procesów sprzęgania m.in. z aktywnym kwasem glukuronowym, siarkowym i glutationem, tworzą produkty łatwo wydalane z organizmu. Najczęściej spotykanym u zwierząt mechanizmem detoksykacji jest synteza β -D-glukuronidów w wyniku łączenia się kwasu urydno-5'-difosfoglukuronowego (UDPGA) z licznymi związkami zawierającymi grupy karboksylowe, hydroksylowe, aminowe i sulfhydrylowe.

Drugi ważny mechanizm detoksykacji obejmuje połączenia z 3'-fosfoadenylosiarczanem (PAPS).

Niektóre formy CYP są stale obecne w określonych tkankach, inne pojawiają się w odpowiedzi na obecność induktora enzymatycznego. Ze względu na budowę chemiczną induktora oraz rodzaj indukowanej formy molekularnej CYP substancje chemiczne sklasyfikowano w następujące grupy: 1. policykliczne węglowodory aromatyczne – indukujące rodzinę CYP1A; 2. pochodne kwasu barbiturowego – rodzinę CYP2B; 3. sterydy – rodzinę CYP3A; 4. alkohol i aceton – rodzinę CYP3E; 5. proliferatory peroksyosomów – rodzinę CYP4A [8]. Rodziny CYPs 1, 2 i 4 generalnie uczestniczą w metabolizmie ksenobiotyków. Ostateczny efekt biotransformacji substancji chemicznych jest wynikiem różnorodnych i wielokierunkowych przemian i zależy od budowy chemicznej związku, gatunku i płci zwierząt. Uważa się, że indukcja CYP1A prowadzi do aktywacji tych szlaków metabolicznych, które prowadzą do powstawania toksycznych oraz mutagennych/kancerogennych metabolitów [12, 24]. Natomiast CYP2B katalizują reakcje przesuujące kierunek metabolizmu związków chemicznych w stronę procesów detoksykacyjnych. Należy jednak podkreślić, że związki chemiczne mogą indukować różne formy molekularne CYP.

Wcześniejsze badania [21] wykazały, że diklofop – [kwas 2-[4-(2,4-dichlorofenoksy)fenoksy]propionowy], wprowadzony do środowiska w postaci herbicydu, wykazuje właściwości proliferatorów peroksyosomów (PPs), które zostały zakwalifikowane do grupy induktorów rodziny CYP4A [7]. Związki wykazujące właściwości PPs uczestniczą w metabolizmie endogennych substratów, zmieniając poziom kwasów tłuszczowych, prostaglandyn, hormonów tarczycy i bilirubiny [3, 19]. Na podstawie nielicznych wprowadzie danych literaturowych można zakładać, że PPs mogą zmieniać też metabolizm substancji obcych [4, 18, 19].

Wydało się zatem celowe zbadanie wpływu diklofopu w wątrobie szczura na O-dealkilację 7-etoksyrezorufiny i O-demetylację p-nitroanizolu, które są substratami rodziny CYP1A [12, 17] oraz na aktywność O-dealkilazy 7-pentoksyrezorufiny, markerowego enzymu CYP2B [17]. Należy podkreślić, że pomiar O-dealkilaz alkoksyzorufin stanowi powszechnie stosowaną metodę biochemiczną pomiarów aktywności CYP1A i 2B w wątrobie zwierząt i człowieka, pozwalającą jednocześnie na zakwalifikowanie związku do odpowiedniej grupy induktorów CYPs.[6]. Jako kontrole pozytywne zastosowano modelowe induktory CYP1A i CYP2B tj. 3-metylocholanren i fenobarbital. W badaniach uwzględniono też wpływ diklofopu na aktywność fenolowej formy UDP-glukuronylotransferazy (UGT).

MATERIAŁY I METODY

1. Odczynniki

Diklofop metylu (95,8%) otrzymano z firmy AgrEvo Environmental Health Ltd.; -3-metylocholanren, rezorufina, 7-pentoksy-i 7-etoksy-rezorufina – Sigma Chemical Company (USA); p-nitrofenol – firmy Merck (Niemcy); p-nitroanizol – firmy Fluka Buchs (Szwajcaria); fenobarbital – Farmaceutyczno-Chemicznej Spółdzielni Pracy „Galenus”.

2. Schemat doświadczeń

Badania prowadzono na dojrzałych, samcach szczurów rasy Wistar (Pzh:WIS) o masie ciała 200 ± 10 g. W okresie adaptacji i doświadczeń zwierzęta otrzymywały paszę standardową LSM

i wodę *ad libitum*. Młode szczury 50 ± 10 g umieszczano w klatkach w pomieszczeniu o temperaturze powietrza $22 \pm 1^\circ\text{C}$ z 12 godz. rytmem świetlnym. Przed przystąpieniem do badań przeprowadzono test toksyczności ostrej doustnej wg wytycznych OECD celem wyznaczenia dawki LD_{50} dla diklofopu. Średnia wartość LD_{50} wynosiła 560 mg/kg masy ciała. Diklofop podawano szczurom doustnie w oliwie jadalnej w dawce wynoszącej 0; 5,6; 11,2 i 56 mg/kg m.c. x dzień⁻¹ (1/100; 1/50 i 1/10 wartości LD_{50}) przez 4 kolejne dni; 3-metylocholanteren i fenobarbital podawano szczurom dootrzewnowo w odstępach dobowych odpowiednio trzykrotnie w dawce 25 mg/kg m.c. x dzień⁻¹ i czterokrotnie w dawce 60 mg/kg m.c. x dzień⁻¹. Grupy kontrolne zwierząt otrzymywały równoważną objętość oliwy jadalnej. Po 24 godz. od podania ostatniej dawki badanych związków zwierzęta dekapitowano w narkozie pentobarbitem, wypreparowane wątroby dokładnie przemywano i ważono. Prawy płąt wątroby stanowił materiał do oznaczeń biochemicznych. Aktywność CYP 1A i 2B oznaczano metodą *Lubeta* i wsp. [17] z własnymi modyfikacjami [13]. Zasada metody polega na pomiarze fluorescencji rezorufiny uwalnianej w reakcji enzymatycznej O-dealkilacji 7-pentoksyrezorufiny i 7-etoksyrezorufiny, substratów odpowiednio CYP2B i 1A. Aktywność CYP2B i 1A wyrażano w pmolach rezorufiny/mg białka x min⁻¹. Aktywność O-demetylasy p-nitroanizolu oznaczano metodą *Nettera* i wsp. [20] w postmitochondrialnej frakcji wątroby. Metoda polega na spektrofotometrycznym pomiarze ilości utworzonego w czasie reakcji p-nitrofenolu z p-nitroanizolu stosowanego jako substrat. Aktywność O-demetylasy p-nitroanizolu wyrażano w nmolach p-nitrofenolu/mg białka x h⁻¹. Aktywność UGT oznaczano metodą *Hollmana* i wsp. [10] w postmitochondrialnym supernatancie wątroby i wyrażano w nmolach glukuronidu p-nitrofenolu/mg białka x 30 min⁻¹. Białko oznaczano metodą *Lowry* i wsp. [14].

Do oceny statystycznej wyników stosowano test *t-Studenta*, przyjmując jako kryterium znaczącości $p < 0.05$

WYNIKI

Odpowiedź hepatocytów na heterogenną grupę lipofilnych substancji chemicznych obejmuje indukcję różnych form molekularnych CYPs wynikającą ze wzrostu ilości białka katalizującego większość reakcji I fazy metabolizmu substancji obcych. Indukcja enzymatyczna prowadzi do rozrostu gładkiej siateczki śródplazmatycznej (SER) i w konsekwencji do wzrostu masy wątroby.

W tabeli I przedstawiono masę ciała oraz względną masę wątroby szczurów ($\text{RLW} = \text{masa wątroby/masa ciała} \times 100$) otrzymujących diklofop w dawce 5,6; 11,2 i 56 mg/kg m.c. x dzień⁻¹ (1/100; 1/50 i 1/10 LD_{50}) przez cztery kolejne dni oraz u zwierząt narażonych na 3-metylocholanteren i fenobarbital zastosowane jako kontrole pozytywne.

Diklofop nie wpływał na masę ciała badanych zwierząt. Związek wywoływał natomiast zależny od dawki wzrost RLW , który w porównaniu do kontroli wynosił 19% ($p < 0,01$) i 31% ($p < 0,001$) po narażeniu szczurów na dawkę diklofopu wynoszącą odpowiednio 11,2 i 56 mg/kg m.c. x dzień⁻¹. Najniższa dawka 5,6 mg/kg m.c. x dzień⁻¹ nie wywoływała zmian w masie badanego narządu. W analogicznych warunkach doświadczalnych 3-metylocholanteren stymulował przyrost RLW o 27% ($p < 0,01$). Fenobarbital wywoływał wzrost RLW o 16%, jednakże wzrost ten nie był statystycznie istotny w porównaniu z kontrolą (Tabela I).

W tabeli II przedstawiono wpływ diklofopu na aktywność form molekularnych CYP1A, i 2B.

Diklofop indukował w wątrobie szczurów formę molekularną CYP2B mierzoną aktywnością O-dealkilazy 7-pentoksyrezorufiny. Efekt był zależny od dawki. Aktywność enzymu wzrastała w stosunku do kontroli 2,7-krotnie ($p < 0,001$) i 4,8-krotnie ($p <$

0,001) odpowiednio po narażeniu szczurów na dawkę 11,2 i 56 mg/kg m.c. x dzień⁻¹. Najniższa z zastosowanych dawek nie wywoływała zmian w metabolizmie 7-pentoksyrezorufiny (dawka nieefektywna). Fenobarbital zastosowany jako kontrola pozytywna wywoływał 30-krotny ($p < 0,001$) wzrost badanego procesu.

Wyniki uzyskane w zakresie oddziaływania diklofopu na indukcję CYP1A (Tabela II) wykazały bardzo słaby, jednakże statystycznie istotny wzrost aktywności O-dealkilazy 7-etoksyrezorufiny. Aktywność badanego enzymu wzrastała o 28% ($p < 0,01$) po podawaniu dawki diklofopu wynoszącej 11,2 i 56 mg/kg m.c. x dzień⁻¹. Dawka diklofopu 5,6 mg/kg m.c. x dzień⁻¹ nie wywoływała badanego efektu. W opisanych warunkach doświadczenia, 3-metylocholanren indukował 14-krotny ($p < 0,001$) wzrost CYP1A, mierzony aktywnością O-dealkilazy 7-etoksyrezorufiny. Przedstawione wyniki potwierdzono dodatkowo oznaczeniami aktywności O-demetylazy p-nitroanizolu (Tabela III). Stwierdzono, że diklofop nie wpływał na aktywność O-demetylazy p-nitroanizolu, która jest markerowym enzymem CYP1A.

Wykazano natomiast, że diklofop wpływał na aktywność izoforny fenolowej UGT w wątrobie szczurów (Tabela III). Związek podawany w dawce 11,2 i 56 mg/kg m.c. x dzień⁻¹ wywoływał spadek aktywności UGT wynoszący odpowiednio 49% ($p < 0,001$) i 35% ($p < 0,001$) wartości kontrolnych. Stwierdzono istotne statystycznie różnice w aktywności enzymu pomiędzy stosowanymi dawkami związku ($p < 0,01$). Najniższa z zastosowanych dawek (5,6 mg/kg m.c. x dzień⁻¹) nie wywoływała badanego efektu.

DYSKUSJA

Czynniki proliferacji peroksysomów obejmują leki przeciwmiażdżycowe tzw. fibryny (pochodne kwasu fenoksy-izomasłowego i propionowego), aspirynę oraz szereg zanieczyszczeń środowiskowych (chlorowane rozpuszczalniki organiczne, plastyfikatory, herbicydy z grupy pochodnych kwasu fenoksyoctowego). Związki tego typu wywołują w wątrobie gryzoni plejotropowe efekty m.in. powiększenie wątroby w wyniku proliferacji peroksysomów i rozrostu SER z towarzyszącym wzrostem aktywności peroksysomalnych i mikrosomalnych enzymów uczestniczących w metabolizmie kwasów tłuszczowych [2].

CYPs charakteryzują się różną, aczkolwiek częściowo nakładającą się, specyficznością substratową. Badania z zastosowaniem różnych substratów wykazały, że tylko nieliczne związki są metabolizowane przez jedną formę molekularną CYPs. Np. fenobarbital, który indukuje głównie rodzinę CYP2B, stymuluje również w wątrobie szczura formy molekularne CYP1A; 2A; 2C i 3A [23]. Związki chemiczne należące do grupy PPs indukują aktywność rodziny CYP4A, która oprócz głównej katalitycznej funkcji w przemianach endogennych kwasów tłuszczowych i prostaglandyn [3], katalizuje również metabolizm oksydacyjny związków zawierających w cząsteczce grupę funkcyjną, karboksylową [7]. Ponadto, PPs stymulują enzymy hydrolityczne takie jak esterazy, mikrosomalną i cytosolową formę hydrolazy epoksydowej jak również izoforny UDP-glukuronylotransferazy [18, 19]. Należy zaznaczyć, że znakomitą większość PPs stanowią estry kwasów fenoksyalkanokarboksylowych. Obserwowany zatem umiarkowany wzrost esteraz można wiązać z udziałem tych enzymów w rozszczepieniu wiązania estrowego. Natomiast drugi silnie indukowany enzym tj. hydroksylaza epoksydowa, jak wiadomo przekształca silnie elektrofilową grupę epoksydową w dwie sąsia-

dujące grupy alkoholowe (powstają odpowiednie związki o budowie dioli). Cytosolowa forma enzymu wydaje się przekształcać nadtlenki powstające podczas peroksydacji kwasów tłuszczowych, natomiast forma mikrosomalna degraduje nadtlenki powstające podczas aktywacji metabolicznej związków chemicznych głównie wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych [16]. Niewiele jest natomiast informacji na temat wpływu PPs na indukcję innych rodzin CYPs niż CYP4A. Kwas klofibrowy, należący do silnych PPs, indukował CYP1A, 2B i 3A jedynie w hepatocytach płodów szczura hodowanych w warunkach *in vitro* [22]. Natomiast doświadczenia *in vitro* prowadzone przy użyciu skrawków wątroby szczura i człowieka jak również hepatocytów szczura wykazały, że klofibrat, metyloklofanat i Wy-14,643 nie indukowały form molekularnych CYP1A, 2B i 3A [14]. Powyższe obserwacje potwierdzają wprawdzie fragmentaryczne badania *in vivo*, które wykazały, że PPs takie jak klofibrat, bezafibrat i gemfibrozil indukowały rodzinę CYP4A, natomiast nie wzmagały aktywności CYP1A, 3A i 2B w wątrobie szczurów [1].

Uzyskane w niniejszej pracy wyniki w warunkach *in vivo* wydają się być zgodne z wynikami cytowanych autorów. Diklofop, wykazujący właściwości PPs, indukował bardzo słabo metabolizm 7-etoksyrezorufiny katalizowany przez CYP1A. Obserwowana słaba indukcja CYP1A pod wpływem diklofopu korelowała z wynikami uzyskanymi w zakresie metabolizmu p-nitroanizolu. Wykazano bowiem, że związek nie indukował O-demetylazy p-nitroanizolu w wątrobie szczurów. Zgodnie z danymi z piśmiennictwa, O-demetylacja p-nitroanizolu zachodzi przy udziale CYP1A [11, 12]. Można zatem wnioskować, że diklofop nie indukuje CYP1A, któremu przypisuje się rolę w procesie mutagenyzy/kancerogenyzy. Stwierdzono natomiast, że diklofop wywoływał zależny od dawki wzrost aktywności O-dealkilazy 7-pentoksyrezorufiny-wskaźnikowego enzymu rodziny CYP2B. Jednakże wyniki obrazujące wzrost aktywności badanego enzymu pozwalają wnioskować, że diklofop należy do słabych induktorów CYP2B.

Uzyskane wyniki sugerują, że diklofop może hamować aktywność fenolowej formy UGT w wątrobie szczurów. UGTs stanowią rodzinę białek enzymatycznych, o wysokiej specyficzności w stosunku do substratu, uczestniczących w detoksykacji substancji obcych oraz endogennych związków takich jak bilirubina i kwasy żółciowe [5]. Wg Moody i wsp. [19] PPs stanowią grupę induktorów UGT, która uczestniczy w degradacji bilirubiny. Natomiast wysunięto przypuszczenie, że PPs nie wpływają lub hamują aktywność form molekularnych UGT katalizujących procesy sprzęgania aktywnego kwasu glukuronowego (UDPGA) z grupą fenolową i karboksylową [4,19]. Przedstawione wyniki dotyczące diklofopu wydają się potwierdzać wcześniejsze obserwacje autorów [4], którzy wykazali hamowanie UGT 1-naftolu w wątrobie szczurów narażonych na fenofibrat i bezafibrat z grupy PPs. Jednocześnie, zarówno fenofibrat jak i bezafibrat indukowały formę molekularną UGT uczestniczącą w degradacji metabolicznej bilirubiny. Natomiast w tych samych warunkach doświadczenia ciprofibrat stymulował aktywność form UGTs katalizujących syntezę zarówno glukuronidu 1-naftolu, jak i bilirubiny. W świetle przedstawionych danych oraz wyników własnych badań można postulować, że indukcja i/lub hamowanie fenolowej UGT zależy od związku z grupy PPs. Obserwowana w przypadku diklofopu odwrotna zależność pomiędzy dawką a hamowaniem badanego enzymu na obecnym etapie badań jest trudna do zinterpretowania i wymaga dalszych doświadczeń.

PODSUMOWANIE

Diklofop nie indukuje rodziny CYP1A i jest słabym induktorem CYP2B w wątrobie szczurów, samców rasy *Wistar*. Natomiast uzyskane wyniki sugerują, że diklofop hamuje fenolową formę UDP-glukuronylotransferazy, która w II fazie metabolizmu substancji obcych inaktywuje większość kancerogenów i innych ksenobiotyków.

D. Palut, G. Kostka, B. Wiadrowska, R. Bańkowski

EFFECT OF DICLOFOP ON THE ACTIVITY OF SOME DRUG-METABOLIZING ENZYMES IN THE LIVER OF MALE WISTAR RATS

The study was designed to determine whether diclofop, introduced to environment as herbicide, would exert properties of chemical inducers of rat liver monooxygenase system related to CYP1A and CYP2B isozymes. For this purpose, the effect of diclofop on 7-etoxyresorufin O-dealkylase and p-nitroanisole O-demethylase activities specific for CYP1A as well as on CYP2B mediated 7-pentoxyresorufin O-dealkylase activity was studied in male Wistar rats. This biochemical method permits to determine whether tested compound belongs to one of two main types of chemical inducers. Diclofop was dosed by gavage for 4 days at 0; 5.6, 11.2 and 56 mg/kg b.w. per day. Treatment of rats with diclofop resulted in significant increase in relative liver weight (RLW), to 19% and 31% above the control, respectively. Diclofop administered at the dose of 11.2 and 56 mg/kg b.w. per day induced a 3-fold ($p < 0.001$) and a 5-fold ($p < 0.001$) increase in the metabolism of 7-pentoxyresorufin (CYP2B-mediated reaction), respectively. No effect level for CYP2B induction was 5.6 mg/kg b.w per day. However, diclofop induced only slight increase in 7-etoxyresorufin O-dealkylase and did not show any effect on p-nitroanisole O-demethylase activity (CYP1A-mediated reactions). The results revealed that diclofop not show the ability to induce CYP1A and moreover it was weak inducer of CYP2B isozymes in the liver of male Wistar rats. Diclofop was also examined for its ability to affect the activity of phenol UDP-glucuronosyltransferase in rat liver. The results suggest that diclofop suppressed phenol form of UDP-glucuronosyltransferase activity. The isozyme activity decreased by 50% and 35% at the dose of 11.2 and 56 mg/kg b.w. per day, respectively. It should be noted that this form of enzyme inactivates during II phase of biotransformation most chemical carcinogens and other xenobiotics.

PIŚMIENNICTWO

1. Amacher D.E., Beck R., Schomaker S.J., and KENNY C.V.: Hepatic microsomal enzyme induction, β -oxidation and cell proliferation following administration of clofibrate, gemfibrozil or bezafibrate in the CD rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1997, 142, 143–150.
2. Ashby J., Brady A., Elcombe C.R., Elliot C.R., Ishmael J., Odun J., Tugwood J.D., Kettle S., Purchase I.F.H.: Mechanistically based human hazard assessment of peroxisome proliferator – induced hepatocarcinogenesis. *Hum. Exp. Toxicol.* 1994, 13, S1–S101.
3. Bains S.K., Gardiner S., Mannweiler K., Gillet D., Gibson G.G.: Immunochemical study of the contribution of hypolipidaemic-induced cytochrome P-450 to the metabolism of lauric and arachidonic acid. *Biochem. Pharmacol.* 1985, 34, 3221–3229.
4. Boiteux-Antoine A.F., Magdalou J., Fournel-Gigleux S., Siest G.: Comparative induction of drug-metabolizing enzymes by hypolipidaemic compounds. *Gen. Pharmacol.* 1989, 20, 407–412.
5. Burchell B., Coughtrie M.W.H.: UDP-glucuronosyl transferases. *Pharmacol. Ther.* 1989, 43, 261–289.
6. Burke M.D., Thompson S., Weaver R.J., Elcombe C.R., Halpert J., Haaparanta T., Mayer R.R.: Etoxy-, pentoxy- and benzyloxyphenoxazones and homologues. A series of substrates to

- distinguish between different induced cytochrome P-450. *Biochem. Pharmacol.* 1985, 34, 3337–3345.
7. *Gibson G.G.*: Comparative aspects of the mammalian cytochrome P-450IV gene family. *Xenobiotica* 1989, 19, 1123–1148.
 8. *Gonzalez F.J.*: Molecular genetics of the P-450 superfamily. *Pharmacol. Ther.* 1989, 45, 1–38.
 9. *Guengerich F.P., Shimida T.*: Oxidation of toxic and carcinogenic chemicals by human cytochrome P-450. *Chem. Res. Toxicol.* 1991, 4, 391–407.
 10. *Hollman S., Touster O.*: Alterations in tissue level of uridine diphosphate glucose dehydrogenase, uridine diphosphate glucuronic acid pyrophosphatase and glucuronyl transferase induced by substances influencing the production of ascorbic acid. *Biochem. Biophys. Acta* 1962, 62, 338–352.
 11. *Kamataki T.*: Metabolism of xenobiotics. In: *Cytochrome P-450*. Ed. Omura T., Ishimura Y., Fujii-Kuriyama Y. 1993, 141–158.
 12. *Kobylińska K.*: Formy molekularne cytochromu P-450 wątroby szczura. *Post. Biochemii* 1994, 40, 248–252.
 13. *Kostka G., Palut D., Wiadrowska B.*: Wpływ permetryny i DDT na aktywność form molekularnych cytochromu P-4501A i 2B w wątrobie szczura. *Roczn. PZH* 1997, 48, 229–237.
 14. *Lake B.G., Charzat C., Tredger J.M., Renwick A.B., Beaman J.A., Price R.J.*: Induction of cytochrome P-450 isoenzymes in cultured precision-cut rat and human liver slices. *Xenobiotica* 1996, 26, 297–306.
 15. *Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.*: Protein measurement with the *Folin* phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951, 193, 265–275.
 16. *Lu A.Y.H., Miwa G.T.*: Molecular properties and biological function of microsomal and cytosolic epoxide hydrolase. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1980, 20, 513–518.
 17. *Lubet R.A., Nims R.W., Mayer R.T., Cameron J.W., Schechtman L.M.*: Measurement of cytochrome P-450 dependent dealkylation of alkoxyphenoxazones in hepatic S₉ and hepatocyte homogenates: effect of dicumarol. *Mut. Res.* 1985, 142, 127–132.
 18. *Lundgren B., DePierre J.W.*: Proliferation of peroxisomes and induction of cytosolic and microsomal epoxide hydrolase in different strains of mice and rats after dietary treatment with clofibrate. *Xenobiotica* 1985, 19, 876–881.
 19. *Moody D.E., Gibson G.G., Grant D.E., Magdalou J., Sambasive R.M.*: Peroxisome proliferators, a unique of drug-metabolizing enzyme inducers. *Drug Metab. Dispos.* 1992, 20, 779–791.
 20. *Netter J.K., Seidel G.*: An adaptively stimulated O-demethylating system in rat liver microsomes and its kinetic properties. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1964, 146, 61–64.
 21. *Palut D., Ludwicki J.K., Kostka G., Kopeć-Szlezak J., Wiadrowska B., Lembowicz K.*: Studies of early hepatocellular proliferation and peroxisomal proliferation in Wistar rats treated with herbicide diklofop. *Toxicology* 2001, 58, 119–126.
 22. *Parmentier I.H., Batt A.M., Kremers P.*: Interleukin 1-*beta* and interleukin-6 response clofibric acid and induction of different P-450 isoforms in cultured foetal rat hepatocytes. *Xenobiotica* 1996, 26, 1181–1193.
 23. *Waxman D.J., Azaroff L.*: Phenobarbital induction of cytochrome P-450 gene expression. *Biochem. J.* 1992, 281, 577–592.
 24. *Wolf C.R.*: Cytochrome P-450s; polymorphic multigene families involved in carcinogen activation. *TIGS* 1986, 2, 209–214.