

KSENOBIOTICI I BIOHEMIJSKI PARAMETRI IZOLOVANIH HEPATOCITA PACOVA

M. Popović, K. Đaković-Švajcer i J. Nerudova

Institut za hemiju, Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad, Zavod za farmakologiju i toksikologiju, Medicinski fakultet, Novi Sad, Institut za higijenu i epidemiologiju, Prag, ČSR

Primljeno 10. I. 1991.

U radu su ispitivane promene nekih biohemijskih parametara jetre pod uticajem induktora (grizeofulvin i fenitoin) i inhibitora (metronidazol, hloramfenikol i fenilbutazon), citohroma P-450, lekova sa purinskom strukturom (aminofilin, ksantinolnikotinat, pentoksifilin, azatioprin, tiogvanin i 6-merkaptopurin) i spojeva iz grupe pesticida (lindan, binapikril, paration). Ispitivani su sledeći parametri: vijabilnost hepatocita, sadržaj glutationa i citohroma P-450, te aktivnost ksantinoksidaze i lipoperoksidaze. Ogledi na Wistar pacovima vršeni su na dva načina. U ogledima *in vivo* životinje su tokom tri dana dobijale navedene supstance, nakon čega su izolirani hepatociti i određivani biokemijski parametri. U ogledima *in vitro* vijabilni hepatociti su inkubirani tokom tri časa navedenim supstancama nakon čega su određivani biohemijski parametri. Dobijeni rezultati pokazuju da su vijabilnost hepatocita i ostali posmatrani parametri najjače promenjeni pod uticajem hloramfenikola, azatioprina i parationa, dok ostale supstance ispoljavaju znatno manji efekt.

Cljučne reči: citohrom P-450, glutation, ksantinoksidaza, lipoperoksidaza, pesticidi, uticaj lekova, vijabilnost hepatocita.

Jedan od značajnih problema današnjice je gotovo neprekidan kontakt čoveka sa hemijskim supstancama (ksenobioticima), koje u jednom slučaju mogu biti lekovi a u drugom zagađivači životne sredine. Ksenobiotici mogu da utiču jedan na drugi ukoliko se unose istovremeno ili neposredno jedan za drugim, jer se većinom transformišu preko jetre odnosno preko jetrenih oksidaza mešovutih funkcija (OMF). Terminalna oksidaza jetrenih i drugih polusupstratnih oksigenaza je citohrom P-450. Aktivnost polusupstratnih oksigenaza, tj. citohroma P-450 zavisi od životinjske vrste, pola, genetskog nasleđa, hormonalne ravnoteže, ravnoteže ishrane i sl. (1-3), što potvrđuju razlike dobivene iz brojnih istraživanja sa ksenobioticima. Iz literature se vidi da su najzastupljenija upravo istraživanja o

* *Opaska Uredništva:* Ovo priopćenje tiskano je na jeziku na kojem je bilo primljeno, recenzirano i prihvaćeno za tisak.

delovanju ksenobiotika na citohrom P-450, tj. OMF, ali zbog mnogih nerešenih pitanja ove vrste istraživanja su još uvek najaktuelnija. Kao modeli za ova istraživanja mogu da se koriste homogenat jetre, perfundovana jetra, suspenzija hepatocita, kultura hepatocita i sl. Izolovani vijabilni hepatociti su se pokazali kao pogodan model za praćenje promena biohemijskih parametara ćelija pod uticajem ksenobiotika (4-7).

Cilj našeg rada je bio da ispitamo uticaj nekih ksenobiotika na biotransformacijske i konjugacione procese u jetri, kao i na vijabilnost hepatocita. Ispitivano je delovanje lekova koji su poznati kao induktori (grizeofulvin i fenitoin) ili inhibitori citohroma P-450 (hloramfenikol, metronidazol, fenilbutazon), kao i lekova koji u osnovi imaju istu purinsku strukturu (aminofilin, ksantinolnikotinat, pentoksifilin, 6-merkaptopurin, tiogvanin i azatioprin). Od zagađivača životne sredine ispitivano je dejstvo nekih pesticida: lindana, binapakrila i parationa.

MATERIJAL I METODE

Istraživanja su vršena na polno zrelim belim pacovima soja Wistar, telesne mase od 200 do 400 g, oba pola, koji su imali slobodan pristup hrani i vodi. Svi eksperimenti u ovom radu su izvedeni u tri vrste pufera:

Hank-pufer, pH 7,4: Hank-1: 134 mM NaCl; 0,49 mM KCl; 0,813 mM $MgSO_4 \times 7H_2O$; 0,337 mM $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$; 0,441 mM KH_2PO_4 ; 26 mM $NaHCO_3$; 0,5 mM EGTA (etilen-glikol bis (beta-aminoetil eter) N,N-tetraoctena kiselina); 12,6 mM HEPES (N-2-hidroksi-etil-piperazin-N-2-etansulfonska kiselina); Hank-2: 100 cm³ Hank-1 pufera sa 150 mg kolagenaze i 0,4 mM $CaCl_2 \times 2H_2O$.

Krebs-bikarbonatni pufer, pH 7,4: 4,2 mM NaCl; 4,8 mM KCl; 0,96 mM KH_2PO_4 ; 1,2 mM $MgSO_4 \times 7H_2O$; 4,2 mM $CaCl_2 \times H_2O$; 24 mM $NaHCO_3$.

TRIS-HCl pufer (TRIS-(trihidroksimetil)-aminometan), pH 7,4; 50 mM TRIS HCl se rastvori u 250 mM saharoze koja sadrži 150 mM KCl i 10 mM $MgCl_2$.

Izolovanje suspenzije hepatocita je vršeno po metodi *Moldeusa i saradnika* (8). Vijabilnost hepatocita je određivana metodom sa Trypan blue. Sadržaj citohroma P-450 meren je po metodi *Matsubare i saradnika* (9). Aktivnost ksantinoksidaze je određena metodom *Bergmeyer* (10), aktivnost lipoperoksidaze metodom *Buega i Austa* (11), sadržaj glutaciona određivan je sa DTNB (ditiobisnitrobenzojeva kiselina) po metodi *Kapetanovića* (12). Sva biohemijska merenja su vršena spektrofotometrija PYE UNICAM SP 1800 u kivetima s optičkim putem od 1 cm i volumenom od 3 cm³. Vijabilnost je praćena Zeissovim binokularnim mikroskopom. Izolovanje hepatocita je vršeno miniprotočnom peristaltičkom pumpom TIP S-32 UNIPAN, Varšava.

Ogledi su vođeni na dva načina: *in vivo* i *in vitro*. U ogleđima *in vivo* ksenobiotici su pacovima aplikovani i.p. tokom tri dana u sledećim dozama: metronidazol 584 μ mol/kg, hloramfenikol 1238 μ mol/kg, fenilbutazon 259 μ mol/kg, difetoin 117 μ mol/kg, grizeofulvin 113 μ mol/kg, aminofilin 137 μ mol/kg, ksantinolnikotinat 345 μ mol/kg, pentoksifilin 360 μ mol/kg, 6-merkaptopurin 32 μ mol/kg, tiogvanin 28 μ mol/kg, azatioprin 18 μ mol/kg, lindan 1400 μ mol/kg, binapakril 1800 μ mol/kg i paration 1100 μ mol/kg telesne mase. Svi ksenobiotici su davani u obliku čistih supstanci, a kontrolne životinje su dobijale fiziološki rastvor. Životinje su četvrtog dana žrtvovane, izolovani hepatociti i izmereni navedeni parametri. U *in vitro* ogleđima vijabilni hepatociti su izolovani iz jetre netretiranih pacova i inkubirani sa istim ksenobioticima tri časa na 37 °C, a potom su izmereni biohemijski parametri. Doze ksenobiotika u drugoj grupi ogleđa date su u μ mol na 2×10^6 ćelija/1 ml suspenzije hepatocita i iznosile su: metronidazol 58,4 μ mol, hloramfenikol 123,8 μ mol,

fenilbutazon 25,9 μmol , difetoin 11,7 μmol , grizeofulvin 11,3 μmol , aminofilin 13,7 μmol , ksantinolnikotinat 34,5 μmol , pentoksifilin 36 μmol , 6-merkaptopurin 3,2 μmol , tiogvanin 2,8 μmol , azatioprin 1,8 μmol , lindan 140 μmol , binapakril 180 μmol i paration 110 μmol .

Za statističku obradu podataka korištene su aritmetičke srednje vrednosti i njihove standardne devijacije, a testovi značajnosti rađeni su Studentovim t-testom.

REZULTATI I DISKUSIJA

Od lekova induktora i inhibitora oksidaza mešovite funkcije (OMF), posle *in vivo* tretmana od tri dana, na vijabilnost hepatocita su najviše delovali hloramfenikol i grizeofulvin (tabela 1), dok su ostali lekovi iz grupe induktora i inhibitora enzima imali mnogo slabije

Tabela 1.

Vrednost biohemijskih parametara izolovanih hepatocita iz jetre pacova tretiranih tri dana induktorima i inhibitorima sistema OMF (količine supstanci navedene su u tekstu)

| Ispitivani induktori i inhibitori | Ispitivani biohemijski parametri | | | | |
|-----------------------------------|----------------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|-------------------------|
| | Citohrom P-450 | Glutation | Aktivnost lipoperoksidaze | Aktivnost ksantinoksidaze | Vijabilnost |
| Kontrola | 0,492±0,171 | 209,21±33,645 | 1,740±0,562 | 13,343±4,377 | 72,50±2,50 |
| Grizeofulvin | 0,615±0,101 | 358,45±34,965 ^b | 2,809±0,035 ^c | 12,339±3,177 | 54,00±3,14 ^d |
| Fenitoin | 1,817±0,645 ^b | 261,17±32,014 | 1,466±0,334 | 12,034±1,688 | 77,50±5,59 |
| Hloramfenikol | 0,560±0,203 | 253,15±43,063 | 4,764±0,938 ^d | 11,793±3,766 | 30,00±7,64 ^d |
| Metronidazol | 0,826±0,139 ^b | 267,90±43,934 | 2,604±0,800 | 12,721±4,183 | 73,00±3,08 |
| Fenilbutazon | 1,245±0,335 ^b | 29,55±7,120 ^b | 1,891±0,126 | 21,413±3,074 ^a | 75,00±3,54 |

Rezultati predstavljaju srednje vrednosti \pm SD (n=5).

t-test ^a P<0,05, ^b P<0,02 ^c P<0,01, ^d P<0,001

Sadržaj citohroma P-450 i glutaciona izražen je u nmol/2 · 10⁶ ćelija.

Aktivnost lipoperoksidaze izražena je u nmol malondialdehida na 2 · 10⁶ ćelija · min⁻¹.

Aktivnost ksantinoksidaze izražena je u nmol ksantina na 2 · 10⁶ ćelija · min⁻¹.

Vijabilnost je izražena kao % živih ćelija.

dejstvo. Sadržaj citohroma P-450 su u ogledu *in vivo* statistički značajno povećali fenilbutazon, metronidazol i fenitoin, dok je sadržaj glutaciona statistički značajno menjao samo fenilbutazon. Ovaj nalaz može da znači da proces detoksikacije ovih lekova ne ide putem konjugacije sa glutationom. Aktivnost lipoperoksidaze su jako povećali hloramfenikol i grizeofulvin, što je verovatno uticalo i na veliku smrtnost ćelija. Aktivnost ksantinoksidaze u ogledu *in vivo* (tabela 1) povećao je samo fenilbutazon. U ogledu *in vitro* (tabela 2) svi inhibitori citohroma P-450 povećali su aktivnost ksantinoksidaze i lipoperoksidaze, što je smanjilo vijabilnost hepatocita. Od induktora citohroma P-450 samo je fenitoin povećao aktivnost ksantinoksidaze i lipoperoksidaze, ali ne u tolikoj meri kao što su to uradili inhibitori. Fenitoin je povećao sadržaj citohroma P-450 i smanjio sadržaj glutaciona. Fenilbutazon je takođe smanjio sadržaj glutaciona. Uopšte govoreći, toksičnost ovih lekova je izraženija ukoliko tri časa direktno deluju na izolovane ćelije nego ukoliko se aplikuju

Tabela 2.

Delovanje induktora i inhibitora OMF na biohemijske parametre izolovanih vijabilnih hepatocita nakon tročasovne inkubacije (količine supstanci navedene su u tekstu)

| Ispitivani induktori i inhibitori | Ispitivani biohemijski parametri | | | | |
|-----------------------------------|----------------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|
| | Citohrom P-450 | Glutation | Aktivnost lipoperoksidaze | Aktivnost ksantinoksidaze | Vijabilnost |
| Kontrola | 0,923±0,359 | 170,82±23,16 | 1,506±0,542 | 13,34±0,091 | 73,33±2,357 |
| Grizeofulvin | 1,076±0,457 | 183,00±29,14 | 2,299±0,932 | 34,68±0,89 ^a | 68,75±2,165 ^b |
| Fenitoin | 1,610±0,50 ^c | 56,79±4,05 ^d | 2,108±0,088 ^a | 13,89±3,876 | 62,50±2,500 ^d |
| Hloramfenikol | 0,894±0,543 | 188,10±22,28 | 16,570±3,662 ^d | 101,66±0,001 ^d | 57,50±2,500 ^d |
| Metronidazol | 0,956±0,163 | 177,90±35,12 | 5,873±0,083 ^d | 101,66±0,001 ^d | 57,50±2,500 ^d |
| Fenilbutazon | 1,586±0,344 | 91,21±30,62 ^c | 18,543±3,729 ^d | 51,70±1,628 ^d | 65,00±3,555 ^d |

Rezultati predstavljaju srednje vrednosti ± SD (n=5).

t-test ^a P<0,05, ^b P<0,02 ^c P<0,01, ^d P<0,001

Sadržaj citohroma P-450 i glutaciona izražen je u nmol/2 · 10⁶ ćelija.

Aktivnost ksantinaoksidaze izražena je u nmol ksantinimaa na 2 · 10⁶ ćelija · min⁻¹.

Aktivnost lipoperoksidaze izražena je u nmol malondialdehida na 2 · 10⁶ ćelija · min⁻¹.

Vijabilnost je izražena kao % živih ćelija.

Tabela 3.

Vrednosti biohemijskih parametara izolovanih hepatocita iz jetre životinja tretiranih tri dana lekovima purinske strukture (količine supstanci navedene su u tekstu)

| Ispitivani purinski lekovi | Ispitivani biohemijski parametri | | | | |
|----------------------------|----------------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|-------------------------|
| | Citohrom P-450 | Glutation | Aktivnost lipoperoksidaze | Aktivnost ksantinoksidaze | Vijabilnost |
| Kontrola | 0,181±0,112 | 118,93±23,96 | 6,74±2,89 | 15,64±3,05 | 85,25±2,95 |
| Aminofilin | 0,109±0,080 | 107,14±23,14 | 14,32±8,31 ^a | 33,47±6,894 ^a | 62,25±3,65 ^a |
| 6-merkaptopurin | 0,417±0,197 ^a | 108,43±65,78 | 8,56±3,05 | 94,56±8,150 ^d | 58,50±4,75 ^c |
| Tiogvanin | 0,281±0,091 | 104,38±15,97 | 6,92±3,43 | 15,95±3,17 | 63,25±3,13 |
| Azatioprin | 2,810±0,191 | 47,93±12,12 ^d | 54,93±4,15 ^d | 115,23±6,51 ^d | 12,50±1,68 ^d |
| Ksantinolnikotinat | 0,112±0,093 | 73,83±13,25 | 6,43±3,91 | 15,62±2,59 | 67,50±3,61 ^a |
| Pentoksifilin | 0,198±0,131 | 69,75±19,44 | 4,61±1,13 | 96,79±4,93 ^d | 75,50±3,65 |

Rezultati predstavljaju srednje vrednosti ± SD od pet uzoraka.

t-test ^a P<0,05, ^b P<0,02 ^c P<0,01, ^d P<0,001

Sadržaj citohroma P-450 i glutaciona izražen je u nmol/2 · 10⁶ ćelija.

Aktivnost lipoperoksidaze izražena je u nmol malondialdehida na 2 · 10⁶ ćelija · min⁻¹.

Aktivnost ksantinoksidaze izražena je u nmol ksantina na 2 · 10⁶ ćelija · min⁻¹.

Vijabilnost je izražena kao % živih ćelija.

intaktnoj životinji. Objašnjenje za ovo može biti različito. Najverovatnije se radi o različitoj koncentraciji ksenobiotika u neposrednoj blizini ćelije kod različitih tipova tretmana.

Tabela 4.

Delovanje lekova purinske strukture na neke biohemijske parametre izolovanih vijabilnih hepatocita nakon tročasovne inkubacije (količine supstanci navedene su u tekstu)

| Ispitivani purinski lekovi | Ispitivani biohemijski parametri | | | | |
|----------------------------|----------------------------------|--------------|---------------------------|---------------------------|-------------------------|
| | Citohrom P-450 | Glutation | Aktivnost lipoperoksidaze | Aktivnost ksantinoksidaze | Vijabilnost |
| Kontrola | 0,178±0,103 | 110,40±46,90 | 5,69±3,42 | 19,69±2,69 | 80,00±1,60 |
| Aminofilin | 0,125±0,083 | 95,27±46,63 | 7,78±3,88 | 18,30±1,47 | 70,00±0,01 ^a |
| 6-merkaptopurin | 0,322±0,256 | 117,57±72,44 | 3,85±0,94 | 35,44±13,06 ^a | 67,50±5,00 ^b |
| Tiogvanin | 0,274±0,163 | 90,65±72,35 | 3,58±2,27 | 11,44±2,18 ^c | 65,00±4,08 ^c |
| Azatioprin | 2,264±0,194 ^d | 80,20±23,34 | 21,57±3,03 ^d | 47,02±18,71 ^c | 16,25±4,79 ^d |
| Ksantinolnikotinat | 0,134±0,103 | 70,01±39,53 | 8,77±5,77 | 13,85±5,24 | 65,00±8,16 ^a |
| Pentoksifilin | 0,175±0,162 | 112,97±47,28 | 5,09±0,39 | 34,80±10,87 ^a | 72,25±2,16 |

Rezultati predstavljaju srednje vrednosti ± SD od pet uzoraka.

t-test ^a P<0,05, ^b P<0,02 ^c P<0,01, ^d P<0,001

Sadržaj citohroma P-450 i glutaciona izražen je u nmol/2 · 10⁶ ćelija.

Aktivnost lipoperoksidaze izražena je u nmol malondialdehida na 2 · 10⁶ ćelija · min⁻¹.

Aktivnost ksantinoksidaze izražena je u nmol ksantina na 2 · 10⁶ ćelija · min⁻¹.

Vijabilnost je izražena kao % živih ćelija.

Lekove purinske strukture možemo podeliti na ksantinske (aminofilin, ksantinotinat i pentoksifilin) i tiopurinske (azatioprin, 6-merkaptopurin i tiogvanin). Najveću smrtnost ćelija izaziva azatioprin što je povezano sa povećanjem lipoperoksidazne i ksantinoksidazne aktivnosti. Međutim oba tipa purinskih lekova u obe vrste ogleada, *in vivo* (tabela 3) i *in vitro* (tabela 4), smanjuju vijabilnost hepatocita. U oba ogleada azatioprin deluje i na ostale ispitivane parametre (sem sadržaja glutaciona u ogledu *in vivo*), pa treba biti oprezan kod primene azatioprina u terapijske svrhe. Kao što se iz tabela 3. i 4. vidi, azatioprin je jako povećao sadržaj citohroma P-450 u oba ogleada. Iako ova supstanca u literaturi nije poznata kao induktor citohroma P-450, možemo ga smatrati takvim, jer neki naši raniji radovi takođe govore u prilog toj pretpostavci (13, 14).

Ksantinski lekovi (aminofilin, pentoksifilin i ksantinolnikotinat) nemaju značajnijeg efekta na ispitivane parametre ni u oglelima *in vivo* ni u oglelima *in vitro*. 6-merkaptopurin u oba tipa ogleada povećava aktivnost ksantinoksidaze, dok tiogvanin smanjuje aktivnost ovog enzima pa možemo pretpostaviti da je i ova oksidaza uključena u biotransformacijske procese tiopurinskih lekova.

Kod životinja tretiranih pesticidima i.p. tokom tri dana (ogledi *in vivo*) dolazi do velike smrtnosti hepatocita. Naročito je to izraženo kod aplikacije parationa (tabela 5). Interesantno je da ova smrtnost ćelija nije povezana sa povećanjem lipoperoksidazne aktivnosti. Smrtnost ćelija je u ovom slučaju verovatno izazvana na drugi način, a ne razaranjem lipoproteinske membrane. Sadržaj glutaciona nije statistički značajno smanjen kod aplikacije nijednog od navedenih pesticida. Verovatno da putevi detoksikacije ovih otrova ne idu preko glutaciona. Binapakril i paration su povećali sadržaj citohroma P-450, a nisu uticali na aktivnost ksantinoksidaze. Rezultati dobijeni nakon inkubacije ovih pesticida sa netretiranim vijabilnim hepatocitima (ogled *in vitro*) prezentovani su u ranijem radu istih

Tabela 5.

Vrednost biohemijskih parametara izolovanih hepatocita iz jetre pacova tretiranih tri dana pesticidima (količine supstanci navedene su u tekstu)

| Ispitivani biohemijski parametri | Ispitivani biohemijski parametri | | | | |
|----------------------------------|----------------------------------|--------------|---------------------------|---------------------------|-------------------------|
| | Citohrom P-450 | Glutation | Aktivnost lipoperoksidaze | Aktivnost ksantinoksidaze | Vijabilnost |
| Kontrola | 0,328±0,084 | 100,99±11,30 | 6,42±1,28 | 12,80±2,08 | 81,50±3,50 |
| Lindan | 0,398±0,095 | 81,98±7,35 | 7,64±1,51 | 9,84±2,14 | 35,00±5,00 ^d |
| Binapakril | 0,618±0,141 ^b | 81,98±7,30 | 9,53±1,49 ^a | 11,21±11,23 | 30,00±7,50 ^d |
| Paration | 0,649±0,090 ^c | 86,69±8,78 | 7,62±1,23 | 8,13±1,95 | 5,00±6,50 ^d |

Rezultati predstavljaju srednje vrednosti ± SD od pet uzoraka

t-test ^a P<0,05, ^b P<0,02 ^c P<0,01, ^d P<0,001

Sadržaj citohroma P-450 i glutaciona izražen je u nmol/2 · 10⁶ ćelija.

Aktivnost lipoperoksidaze izražena je u nmol malondialdehida na 2 · 10⁶ ćelija · min⁻¹.

Aktivnost ksantinoksidaze izražena je u nmol ksantina na 2 · 10⁶ ćelija · min⁻¹.

Vijabilnost je izražena kao % živih ćelija.

autora (15) i ovde ih koristimo za poređenje sa rezultatima dobijenim *in vivo*. U oglecima *in vitro* pesticidi smanjuju aktivnost ksantinoksidaze što može biti posledica inhibicije nekim primarnim metabolitom koji se posle dalje transformišć. Takođe, svi ispitivani pesticidi smanjuju sadržaj glutaciona a povećavaju sadržaj citohroma P-450. Lipoperoksidaznu aktivnost je povećao samo binapakril. U ogledu *in vitro* svi ispitivani pesticidi smanjivali su vijabilnost hepatocita.

Teško je reći koji je od navedenih ksenobiotika najtoksičniji, a koji je manje toksičan. Vidimo da svi oni menjaju neke biohemijske parametre hepatocita kao i njihovu vijabilnost. Ogleci *in vivo* i *in vitro* su u većini slučajeva u korelaciji a razlike koje se javljaju najverojatnije su posledica aktivacije odbrambenih mehanizama celog organizma u odnosu na izolovanu ćeliju. Stoga bi oglede *in vitro* uvek trebalo provoditi paralelno sa oglecima *in vivo* jer se samo tako stiče uvid u celokupna delovanja nekog ksenobiotika. Svakako treba biti oprezan pri davanju azatioprina, budući da naši nalazi govore da ovaj lek značajno menja funkciju hepatocita. Iako promene u posmatranim parametrima mogu izgledati relativno male, neophodno je naglasiti da se često radi o ksenobioticima kojima su pacijenti izloženi u toku dužeg vremenskog perioda, pa gomilanje malih promena dovodi do ispoljavanja sindroma hronične intoksikacije.

LITERATURA

1. Blumberg EW. Enzymic modification of environmental intoxicants: the role of cytochrome P450. Q Rev Biophys II 1978;4:481-545.
2. Lu HYA. Multiplicity of liver drug metabolizing enzymes. Drug Metab Rev 1979;10(2):187-208.
3. Ayrton AD, McFarlane M, Walker R, Neville S, Coombs MM, Ioannides C. Induction of the P450 family of proteins by polycyclic aromatic hydrocarbons: possible relationship to their carcinogenicity. Toxicology 1990;60:173-86.
4. Krack G, Gravier O, Roberfroid M, Mercier M. Subcellular fractionation of isolated rat hepatocytes: a comparison with liver homogenate. Biochim Biophys Acta 1980;632:619-29.

5. Wiebkin P, Fry RI, Jones AC, Lowing R, Bridges WI. The metabolism of biphenyl by isolated viable rat hepatocytes. *Xenobiotica* 1976;6(12):725-46.
6. Sirica EA, Pitot CH. Drug metabolism and effects of carcinogens in cultured hepatic cells. *Pharmacol Rev* 1980;31:205-28.
7. Kappas A, Alvares PA. How the liver metabolizes foreign substances. *Sci Am* 1975;232:22-31.
8. Moldeus P, Hogberg I, Orenius S. Isolation and use of liver cells. *Methods in Enzymology Vol LII*. New York: Academic Press, 1978.
9. Matsubara T, Baron J, Petersko LL, Peterson JA. Quantitative determination of cytochrome P450 in rat liver homogenate. *Anal Biochem* 1976;75:596-605.
10. Bergmeyer UH. *Methoden der enzymatischen Analyse*. Verlag Chemie Weinheim 1970.
11. Buege AI, Aust DS. Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology Vol LII*. New York: Academic Press, 1978.
12. Kapetanović IM, Mieval II. Inhibition of acetaminophen induces hepatotoxicity by phenacetin and its alkoxy analogs. *J Pharmacol Exp Ther* 1979;209:25-30.
13. Popović M, Jakovljević V, Stanulović M, Nerudova J. Uticaj nekih lekova na biohemijske parametre funkcija jetre. Zbornik radova Prirodno-matematičkog fakulteta. Univerzitet u Novom Sadu, 1985;15:55-60.
14. Popović M, Jakovljević V, Stanulović M, Nerudova J. The effect of cimetidine and purine structure drugs on some biochemical parameters in rats. Zbornik radova Prirodno-matematičkog fakulteta. Univerzitet u Novom Sadu, 1989;19:11-8.
15. Popović M, Đaković-Švajcer K, Nerudova J, Trivić S. Pesticidi i biohemizam jetre. *Arh hig rada toksikol* 1989;40:277-83.

Summary

XENOBIOTICS AND BIOCHEMICAL PARAMETERS OF ISOLATED RAT HEPATOCYTES

The authors investigated the effects of the inductors (griseofulvin and fenitoin) and the inhibitors of the cytochrome P-450 (metronidazole, chloramphenicol and phenylbutazone), the effects of the drugs with the purine structure (aminophylline, xanthinol-nicotinate, pentoxiphylline, azathioprine, thioguanine, 6-mercaptapurine), and the effects of several pesticides (lindane, binapicrile, parathion) on some biochemical parameters of the rat liver. The following parameters were determined: viability of hepatocytes, the content of glutathione and cytochrome P-450, and the activity of xanthinoxidase and lipoperoxidase. The experiments were performed *in vivo* and *in vitro*. The results showed that the cell viability as well as the other parameters studied, were most drastically affected by chloramphenicol, azathioprine and parathion, whereas the other substances elicited less intensive changes.

Institute for Chemistry, Faculty of Science, Novi Sad, Institute for Pharmacology and Toxicology, Medical Faculty, Novi Sad, Institute for Hygiene and Epidemiology, Prague, Czechoslovakia

Key terms: cytochrome P-450, glutathione, xanthinoxidase, lipoperoxidase, pesticides, drug effects, hepatocyte viability.