

UNIwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu
Wydział Farmaceutyczny

MONIKA KARASIEWICZ

**ANALIZA WPŁYWU SUROWCÓW ROŚLINNYCH NA POZIOM EKSPRESJI
WYSOCE KONSERWATYWNYCH IZOENZYMÓW CYTOCHROMU P-450
CYP1A2 i CYP2E1 U SZCZURÓW**

ROZPRAWA DOKTORSKA

PROMOTOR:

Prof. dr hab. n. med. Przemysław M. Mrozikiewicz

PRACA WYKONANA
W INSTYTUCIE WŁÓKIEN NATURALNYCH
I ROŚLIN ZIELARSKICH W POZNANIU

Poznań, 2012

*Mojemu Promotorowi
Panu Prof. dr hab. Przemysławowi M. Mrozikiewiczowi
za umożliwienie realizacji tematu pracy doktorskiej,
wsparcie merytoryczne, wyrozumiałość i życzliwość*

*Wszystkim Pracownikom Zakładu Farmakologii i Biologii Doświadczalnej
oraz Zakładu Badania Jakości Produktów Leczniczych i Suplementów Diety IWNiRZ
za przyjazną atmosferę pracy i wsparcie w trudnych chwilach
Pracownikom Katedry i Zakładu Farmakologii UM w Poznaniu
za współpracę w zakresie realizacji części doświadczalnej*

Moim Najbliższym za zrozumienie i cierpliwość

Serdecznie dziękuję

*Praca doktorska zrealizowana
w ramach projektu badawczego nr N405 023 31/1522
finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego
Praca doktorska współfinansowana
ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego*

Pamięci Moich Rodziców...

SPIS TREŚCI

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW	8
SPIS RYCIŃ I TABEL	10
1. WPROWADZENIE LITERATUROWE	12
1.1. Wstęp	12
1.2. Fazy metabolizmu ksenobiotyków	14
1.3. Właściwości prokancerogenne ksenobiotyków	17
1.4. Cytochrom P450	19
1.4.1. Struktura i funkcje cytochromu P450	20
1.4.2. Lokalizacja tkankowa i komórkowa izoform cytochromu P450	26
1.4.3. Rodzina CYP1 cytochromu P450	28
1.4.3.1. Udział CYP1A2 w metabolizmie ksenobiotyków	30
1.4.4. Rodzina CYP2 cytochromu P450	32
1.4.4.1. Udział CYP2E1 w metabolizmie ksenobiotyków	34
1.5. Typy interakcji międzylekowych na poziomie cytochromu P450.....	37
1.5.1. Interakcje na poziomie CYP1A2	38
1.5.2. Interakcje na poziomie CYP2E1.....	41
1.6. Regulacja ekspresji genów CYP450.....	43
1.6.1. Regulacja ekspresji genów z rodziny CYP1A	48
1.6.2. Regulacja ekspresji CYP2E1	53
1.7. Zwierzęce modele eksperymentalne w badaniach metabolizmu ksenobiotyków	55
1.8. Przegląd właściwości farmakologicznych wykorzystanych w pracy badawczej surowców roślinnych	56
1.8.1. Jeżówka purpurowa	56
1.8.2. Soja zwyczajna	58
1.8.3. Czosnek pospolity	58
1.8.4. Kozłek lekarski	61
1.8.5. Zielona herbata	62
1.8.6. Dziurawiec zwyczajny	63
1.8.7. Miłorząb dwukłapowy	65
1.8.8. Żeń-szeń.....	67
2. CELE PRACY	70
3. MATERIAŁY I METODY	71
3.1. Materiały	71
3.1.1. Bufory	71
3.1.2. Roztwory i odczynniki	71
3.1.3. Aparatura i sprzęt laboratoryjny	72
3.1.4. Materiał biologiczny	72
3.1.4.1. Standaryzowane preparaty roślinne	72
3.1.4.2. Zwierzęta doświadczalne	73
3.2. Metody	74

3.2.1. Procedura projektu badawczego z wykorzystaniem modelu <i>in vivo</i>	74
3.2.2. Izolacja całkowitego RNA z tkanki wątrobowej	76
3.2.3. Analiza ilościowa i jakościowa preparatów RNA	76
3.2.4. Synteza cDNA	77
3.2.5. Łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym.....	78
3.2.6. Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji <i>real-time</i> PCR.....	80
3.2.7. Analiza statystyczna wyników.....	80
4. WYNIKI	81
4.1. Identyfikacja amplikonów badanych genów	81
4.2. Wykreślenie krzywych standardowych oraz charakterystyka temperatury topnienia amplikonów badanych genów.....	81
4.2.1. Krzywa standardowa oraz T_m dla produktu amplifikacji cDNA GAPDH	82
4.2.2. Krzywa standardowa oraz T_m dla produktu amplifikacji cDNA CYP1A2	82
4.2.3. Krzywa standardowa oraz T_m dla produktu amplifikacji cDNA AhR	83
4.2.4. Krzywa standardowa oraz T_m dla produktu amplifikacji cDNA CYP2E1	84
4.3. Analiza poziomu transkryptu CYP1A2, czynnika AhR oraz CYP2E1 pod wpływem syntetycznych substancji wzorcowych	84
4.3.1. Zmiany poziomu mRNA CYP1A2 pod wpływem β -naftoflawonu oraz cymetydyny	85
4.3.2. Zmiany poziomu mRNA czynnika AhR pod wpływem β -naftoflawonu oraz cymetydyny	86
4.3.3. Zmiany poziomu mRNA CYP2E1 pod wpływem izoniazylu oraz dietylodiokarbaminianu	88
4.4. Analiza wpływu wyciągów roślinnych na poziom transkryptu CYP1A2, czynnika AhR oraz CYP2E1	89
4.4.1. Ocena poziomu transkryptu genu <i>CYP1A2</i> w zależności od zastosowanego w pracy preparatu roślinnego i czasu jego podawania	89
4.4.2. Ocena poziomu transkryptu genu <i>AHR</i> w zależności od zastosowanego w pracy preparatu roślinnego i czasu jego podawania	91
4.4.3. Ocena poziomu transkryptu genu <i>CYP2E1</i> w zależności od zastosowanego w pracy preparatu roślinnego i czasu jego podawania	93
4.5. Określenie związku pomiędzy poziomem ekspresji CYP1A2 i czynnikiem AhR.....	95
5. DYSKUSJA	99
5.1. Zasadność zastosowanego modelu zwierzęcego i metodologii badawczej.....	99
5.2. Wpływ wyciągów roślinnych na metabolizm substratów izoenzymów CYP1A2 i CYP2E1 w oparciu o zmiany ekspresji genów na podstawie uzyskanych wyników i doniesień literaturowych.....	101
5.2.1. Wpływ <i>Echinacea purpurea</i> na poziom transkryptu i aktywność CYP1A2 i CYP2E1	107
5.2.2. Wpływ <i>Glycine max</i> na poziom transkryptu i aktywność CYP1A2 i CYP2E1	110
5.2.3. Wpływ <i>Allium sativum</i> na poziom transkryptu i aktywność CYP1A2 i CYP2E1	113

5.2.4. Wpływ <i>Valeriana officinalis</i> na poziom transkryptu i aktywność CYP1A2 i CYP2E1	117
5.2.5. Wpływ <i>Camellia sinensis</i> na poziom transkryptu i aktywność CYP1A2 i CYP2E1	119
5.2.6. Wpływ <i>Hypericum perforatum</i> na poziom transkryptu i aktywność CYP1A2 i CYP2E1	122
5.2.7. Wpływ <i>Ginkgo biloba</i> na poziom transkryptu i aktywność CYP1A2 i CYP2E1	126
5.2.8. Wpływ <i>Panax ginseng</i> na poziom transkryptu i aktywność CYP1A2 i CYP2E1	131
5.3. Podsumowanie	134
6. WNIOSKI	138
7. STRESZCZENIE	139
8. SUMMARY	141
9. LITERATURA	143

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

AhR	- ang. <i>aryl hydrocarbon receptor</i> , receptor węglowodorów aromatycznych
AHRR	- ang. <i>aryl hydrocarbon receptor repressor</i> , białko represorowe czynnika AhR
ARNT	- ang. <i>aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator</i> , jądrowy transporter receptora Ah
bHLH	- ang. <i>basic helix-loop-helix</i> , domena wiążąca DNA o strukturze helisa-pętla-helisa
BNF	- β -naftoflawon
CAR	- ang. <i>constitutive androstane receptor</i> , konstytutywny receptor androstanu
cDNA	- komplementarny DNA, jednoniciowa postać DNA będąca kopią RNA, uzyskana po odwrotnej transkrypcji
COMT	- katecholo-O-metylotransferaza
CYP	- cytochrom P450
DAS	- siarczek diallilu
DASO	- sulfotlenek diallilu
DASO ₂	- sulfon diallilu
DMBA	- 7,12-dimetylobenz[α]antracen
dNTP	- deoksyrybonukleotyd
DRE (XRE)	- ang. <i>dioxin response element</i> , sekwencja odpowiedzi na ksenobiotyk
DTIC	- dekarbazyna, cytostatyk
EC	- epikatechina
EGC	- epigallokatechina
EGCG	- galusan epigallokatechiny
FAD	- dinukleotyd flawinoadeninowy
GABA	- kwas γ -aminomasłowy
GAPDH	- ang. <i>glyceraldehydes phosphate 3-dehydrogenase</i> , dehydrogenaza gliceroaldehydofosforanowa
GR	- ang. <i>glucocorticoid receptor</i> , receptor glukokortykoidowy
GTC	- ang. <i>green tea catechins</i> , katechiny zielonej herbaty
HAH	- ang. <i>halogenated aromatic hydrocarbons</i> , halogenowe węglowodory

	aromatyczne
HCA	- ang. <i>heterocyclic aromatic amines</i> , heterocykliczne aminy
HNF	- ang. <i>hepatocyte nuclear factor</i> , hepatocytowy czynnik jądrowy
KBL	- marker wielkości
LBD	- ang. <i>ligand binding domain</i> , domena wiążąca ligand
MAO	- monoaminooksydaza
3-MC	- 3-metylocholanren
mRNA	- informacyjny RNA
NADPH	- zredukowany fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego
NAPQI	- ang. <i>N-acetyl-p-benzoquinone imine</i> , metabolit paracetamolu
NcoA	- ang. <i>nuclear receptor coactivator</i> , koaktywator receptora jądrowego
NES	- ang. <i>nuclear export signal</i> sygnał exportu z jądra
NLS	- ang. <i>nuclear localization signal</i> , sygnał lokalizacji jądrowej
OTC	- ang. <i>Over the Counter</i> , preparaty i leki sprzedawane bez recepty
PAS	- ang. <i>Per-Arnt-Sim</i> , domena odpowiedzialna za dimeryzację białka
PAH	- ang. <i>polycyclic aromatic hydrocarbons</i> , policykliczne węglowodory aromatyczne
PXR	- ang. <i>pregnane X receptor</i> , receptor pregnanu X
PCR	- ang. <i>polymerase chain reaction</i> , łańcuchowa reakcja polimerazy PCR
RAR	- ang. <i>retinoic acid receptor</i> , receptor kwasu retinowego
RE	- ang. <i>response element</i> , element odpowiedzi
RT-PCR	- ang. <i>reverse transcriptase-polymerase chain reaction</i> , reakcja PCR z odwrotną transkryptazą
RXR	- ang. <i>retinoid X receptor</i> , receptor retinoidu X
SRC-1	- ang. <i>steroid receptor coactivator-1</i> , koaktywator receptora steroidowego
TCDD	- 2,3,7,8-tetrachlorodibenzodioksyna
VDR	- ang. <i>vitamin D receptor</i> , receptor witaminy D

SPIS RYCIN I TABEL

Rycina 1. Ogólny schemat fazy I i II metabolizmu ksenobiotyków.....	17
Rycina 2. Drugorzędowa i trzeciorzędowa struktura ludzkiej izoformy cytochromu P450 CYP1A2.....	20
Rycina 3. Cykl katalityczny z udziałem cytochromu P450 oraz schematyczna struktura grupy prostetycznej.....	22
Rycina 4. Proporcje udziału enzymów cytochromu P450 w metabolizmie leków.....	24
Rycina 5. Metaboliczna aktywacja paracetamolu.....	36
Rycina 6. Zróznicowanie mechanizmów regulacji ekspresji izoform CYP450.....	44
Rycina 7. Struktura białka AhR.....	50
Rycina 8. Schemat szlaku sygnałowego czynnika AhR.....	51
Rycina 9. Analiza elektroforetyczna amplikonów reakcji PCR w czasie rzeczywistym... 81	
Rycina 10. Przebieg reakcji PCR w czasie rzeczywistym dla produktu GAPDH przy różnych rozcieńczeniach cDNA oraz krzywa wzorcowa.....	82
Rycina 11. Przebieg reakcji PCR w czasie rzeczywistym dla produktu CYP1A2 przy różnych rozcieńczeniach cDNA oraz krzywa wzorcowa.....	83
Rycina 12. Przebieg reakcji PCR w czasie rzeczywistym dla produktu AhR przy różnych rozcieńczeniach cDNA oraz krzywa wzorcowa.....	83
Rycina 13. Przebieg reakcji PCR w czasie rzeczywistym dla produktu CYP2E1 przy różnych rozcieńczeniach cDNA oraz krzywa wzorcowa.....	84
Rycina 14. Analiza wpływu β -naftoflawonu na poziom mRNA CYP1A2.....	85
Rycina 15. Analiza wpływu cymetydyny na poziom mRNA CYP1A2.....	86
Rycina 16. Analiza wpływu β -naftoflawonu na poziom mRNA czynnika AhR.....	87
Rycina 17. Analiza wpływu cymetydyny na poziom mRNA genu czynnika transkrypcyjnego AhR.....	87
Rycina 18. Analiza wpływu izoniazydu na poziom mRNA CYP2E1.....	88
Rycina 19. Analiza wpływu dietyloditiokarbaminianu na poziom mRNA CYP2E1.....	89
Rycina 20. Analiza wpływu standaryzowanych preparatów roślinnych na poziom mRNA CYP1A2.....	90
Rycina 21. Analiza wpływu standaryzowanych preparatów roślinnych na poziom mRNA AhR.....	92
Rycina 22. Analiza wpływu standaryzowanych preparatów roślinnych na poziom mRNA CYP2E1.....	94

Tabela 1. Reakcje I i II fazy metabolizmu ksenobiotyków.....	16
Tabela 2. Udział izoenzymów cytochromu P450 w bioaktywacji czynników prokancerogennych.....	25
Tabela 3. Udział izoenzymów CYP w fizjologicznych szlakach metabolicznych ludzkiego organizmu.....	26
Tabela 4. Zawartość całkowitej frakcji cytochromu P450 i poszczególnych izoform w ludzkich mikrosomach wątroby.....	27
Tabela 5. Charakterystyka ludzkich izoenzymów CYP1.....	28
Tabela 6. Poziom ekspresji enzymów z rodziny CYP1 i czynnika AhR w ludzkich prawidłowych tkankach.....	29
Tabela 7. Wybrane substraty CYP1A2.....	31
Tabela 8. Efekt toksykologiczny przykładowych substratów izoformy CYP1A2.....	32
Tabela 9. Charakterystyka ludzkich izoenzymów CYP2.....	33
Tabela 10. Efekt toksykologiczny przykładowych substratów CYP2E1.....	35
Tabela 11. Typy katalizowanych przez CYP2E1 reakcji na przykładzie wybranych substratów.....	36
Tabela 12. Przykłady inhibitorów i induktorów aktywności CYP1A2.....	39
Tabela 13. Interakcje z udziałem CYP1A2.....	40
Tabela 14. Przykłady inhibitorów i induktorów aktywności CYP2E1.....	42
Tabela 15. Związki organiczne siarki z czosnku testowane w modelu zwierzęcym z indukowanym rozwojem nowotworu.....	60
Tabela 16. Wybrane ginsenozydy w zależności od rodzaju aglikonu.....	68
Tabela 17. Zestawienie dawek preparatów syntetycznych użytych w doświadczeniu.....	74
Tabela 18. Zestawienie dawek preparatów roślinnych użytych w doświadczeniu.....	75
Tabela 19. Skład mieszaniny reakcyjnej PCR w czasie rzeczywistym.....	78
Tabela 20. Sekwencje starterów użytych do reakcji PCR w czasie rzeczywistym.....	79
Tabela 21. Parametry reakcji PCR w czasie rzeczywistym.....	79
Tabela 22. Wpływ syntetycznych induktorów i inhibitorów izoform CYP na poziom ekspresji badanych genów.....	85
Tabela 23. Wpływ standaryzowanych preparatów roślinnych na poziom ekspresji CYP1A2.....	91
Tabela 24. Wpływ standaryzowanych preparatów roślinnych na poziom ekspresji AhR.....	93
Tabela 25. Wpływ standaryzowanych preparatów roślinnych na poziom ekspresji CYP2E.....	95
Tabela 26. Porównanie średnich dla poszczególnych prób w odniesieniu do analizowanych genów po zastosowaniu substancji wzorcowych.....	96
Tabela 27. Porównanie wartości średnich dla poszczególnych prób w odniesieniu do analizowanych genów <i>CYP1A2</i> i <i>AHR</i> po zastosowaniu standaryzowanych wyciągów roślinnych.....	97

1. WPROWADZENIE LITERATUROWE

1.1. Wstęp

Współczesna medycyna i farmacja stoją przed problemem konsekwencji zdrowotnych wynikających z politerapii oraz ekspansji medycyny alternatywnej i komplementarnej, w tym będących skutkiem nieracjonalnego stosowania preparatów pochodzenia roślinnego, zarówno z jednego surowca jak również produktów wieloskładnikowych. Wspomagająca rola fitopreparatów o wielokierunkowym działaniu umocniła ich pozycję na rynku i sprawiła, że są one powszechnie stosowane w terapii wielu schorzeń i suplementacji diety oraz jako składniki nowej żywności. Niekontrolowane przyjmowanie preparatów tworzonych z surowców zielarskich, w tym leków, oparte jest na funkcjonującej w świadomości społecznej tezie, w myśl której uznawane są one za produkty w pełni bezpieczne. Niejednokrotnie dowodów na mylność takiego założenia dostarcza praktyka lekarska. Wskazuje ona na brak dostatecznej wiedzy pacjentów na temat zagrożeń wynikających z konsumpcji produktów ziołowych wraz z standardową farmakoterapią oraz innych niepożądanych skutków ich stosowania. Według analiz rynku, w Polsce suplementy diety stanowią obecnie 18,7% sprzedawanych preparatów bez recepty (OTC) a popyt na nie charakteryzuje się szybką dynamiką wzrostu. Jest to poważny problem, ponieważ wiele z nich może wywoływać efekty uboczne w rezultacie słabo poznanych interakcji między lekiem syntetycznym a roślinnym [Gorski i wsp., 2004]. Ryzyko jest wysokie zwłaszcza u osób w zaawansowanym i bardzo młodym wieku, u pacjentów z zaburzeniami czynności wątroby i/lub nerek, w stanach odwodnienia, chorobach metabolicznych i układu endokrynnego oraz przy wąskim indeksie terapeutycznym stosowanych leków [Juurlink i wsp., 2003]. Efektem interakcji może być zmiana okresu półtrwania leku, nasilenie lub osłabienie jego działania a także inny, negatywny wpływ na organizm, co potwierdza zwiększająca się systematycznie liczba zgłaszanych działań niepożądanych.

Do interakcji między lekiem a preparatem ziołowym może dochodzić na różnych etapach procesów farmakologicznych, w tym farmakokinetycznych dotyczących wchłaniania, wiązania z białkami, transportu błonowego, dystrybucji, metabolizmu i wydalania ksenobiotyku z organizmu. Uważa się, że w znacznej części u ich podłoża leżą zmiany na etapie I fazy biotransformacji przebiegającej na poziomie izoform cytochromu P450. Enzymy z tej nadrodziny, zlokalizowane zwłaszcza w tkankach narażonych na wysokie stężenia

substancji obcych, należą do mechanizmów obronnych organizmu umożliwiających metabolizm związków lipofilnych pochodzenia zewnętrznego i endogennego do związków polarnych, możliwych do usunięcia z moczem i żółcią. Wśród substratów egzogennych izoform cytochromu P450 znajdują się, obok leków, potencjalnie toksyczne czynniki, w tym chemiczne zanieczyszczenia środowiska, składniki dymu papierosowego i dodatki do żywności. W znacznej mierze biokonwersja prowadzi do inaktywacji dostarczanych do ustroju ksenobiotyków. Istnieje jednak możliwość tworzenia związków o właściwościach kancerogennych, zdolnych do wywierania cytotoksycznego wpływu na komórki i w efekcie uznawanych za czynniki rozwoju choroby nowotworowej. Dlatego zmiany aktywności enzymów zaangażowanych w biokonwersję skutkują konsekwencjami uzależnionymi od rodzaju substratu. W przypadku biotransformacji leków, obniżenie aktywności prowadzi do zwiększenia stężenia leku będącego substratem w osoczu, co może skutkować nasileniem jego działania i toksyczności. W sytuacji indukcji enzymu ma miejsce spadek stężenia leku w osoczu i obniżenie jego efektywności. Ze względów toksykologicznych, stosunkowo słabo poznanym a jednocześnie interesującym targetem badań stają się enzymy CYP1A1/2 i CYP2E1, prowadzące biotransformację leków, metabolizm czynników chemicznych oraz zaangażowane w aktywację związków prokancerogennych i hepatotoksycznych. Analizy modulacji ich aktywności są cenne również z punktu widzenia funkcji fizjologicznych. Ponadto, w związku z udokumentowanym udziałem enzymu CYP2E1 w patogenezie chorób wątroby, uwagę kieruje się na hamowanie aktywności tej izoformy jako potencjalnej metody terapeutycznej. Dotychczas poznane inhibitory tego enzymu w dłuższym okresie stosowania wykazują hepatotoksyczność lub neurotoksyczność, w związku z czym poszukuje się wciąż efektywnych i nieszkodliwych alternatywnych związków czynnych o podobnym wpływie na CYP2E1.

Istnieją doniesienia wskazujące na zdolność modyfikacji ekspresji i aktywności izoform cytochromu P450 poprzez indukcję lub inhibicję nie tylko poprzez czynniki syntetyczne, ale również związki aktywne występujące w przetworach z surowców zielarskich. Przegląd literatury wskazuje, iż wśród najpopularniejszych składników leku roślinnego i suplementów diety znajdują się: *Hypericum perforatum*, *Valeriana officinalis*, *Echinacea purpurea*, *Allium sativum*, *Camellia sinensis*, *Panax ginseng*, *Gingko biloba* oraz *Glycine max*. Dostępne są one w sprzedaży w postaci jedno- lub wieloskładnikowych preparatów o wielokierunkowym działaniu. Składniki ekstraktów z tych surowców mogą modulować biotransformację katalizowaną przez wybrane izoenzymy CYP co, ze względu na rodzaj ich substratów, ma istotne znaczenie dla bezpieczeństwa fitoterapii. W związku

z powyższym udziałem izoform cytochromu P450 w aktywacji i detoksykacji substancji obcych stanowi przedmiot szerokich badań farmakologii molekularnej i toksykologii a poznanie mechanizmów regulacji procesów metabolicznych stało się głównym zadaniem badań nad interakcjami ostatnich kilkunastu lat. Możliwość ich przewidywania jest elementem niezbędnym dla prowadzenia skutecznej i bezpiecznej farmakoterapii w dobie polipragmatyzacji, narastania popularności leku roślinnego, suplementu diety oraz ich skojarzonego przyjmowania z lekami syntetycznymi. Prowadzone w tym kierunku badania zmierzają do oceny bezpieczeństwa stosowania surowców zielarskich w kontekście potencjalnych korzyści i ryzyka ich przyjmowania.

1.2. Fazy metabolizmu ksenobiotyków

Ksenobiotyki to substancje obce dla organizmu, nie będące jego naturalnymi metabolitami, w tym leki, prokancerogeny chemiczne oraz obecne w środowisku związki posiadające w większości charakter lipofilowy. Dzięki tej właściwości mogą one przenikać przez warstwę lipidową, również z udziałem białek transporterowych. Hydrofobowe właściwości ksenobiotyków utrudniają procesy ich eliminacji i sprzyjają gromadzeniu się w tkance tłuszczowej. W celu usunięcia z organizmu wymagają procesów biotransformacji w hydrofilowe metabolity. Przemiany tych substratów prowadzone są przez szereg enzymów metabolizmu ksenobiotyków i uzależnione są od wielu czynników, takich jak: wiek, płeć, spożycie alkoholu, odwodnienie organizmu, dawka ksenobiotyku oraz wydolność narządów odpowiedzialnych za biotransformację. Ze względu na najwyższą zawartość enzymów metabolizmu ksenobiotyków, najistotniejszym organem biokonwersji substancji obcych jest wątroba. Wykazano, że rozpoczęcie aktywności biotransformacyjnej w komórkach szczurzej wątroby ma miejsce już pod koniec ciąży i trwa do osiągnięcia dojrzałości płciowej, gdy przejmuje ona główną rolę w przemianach ksenobiotyków [Yang i wsp., 1989].

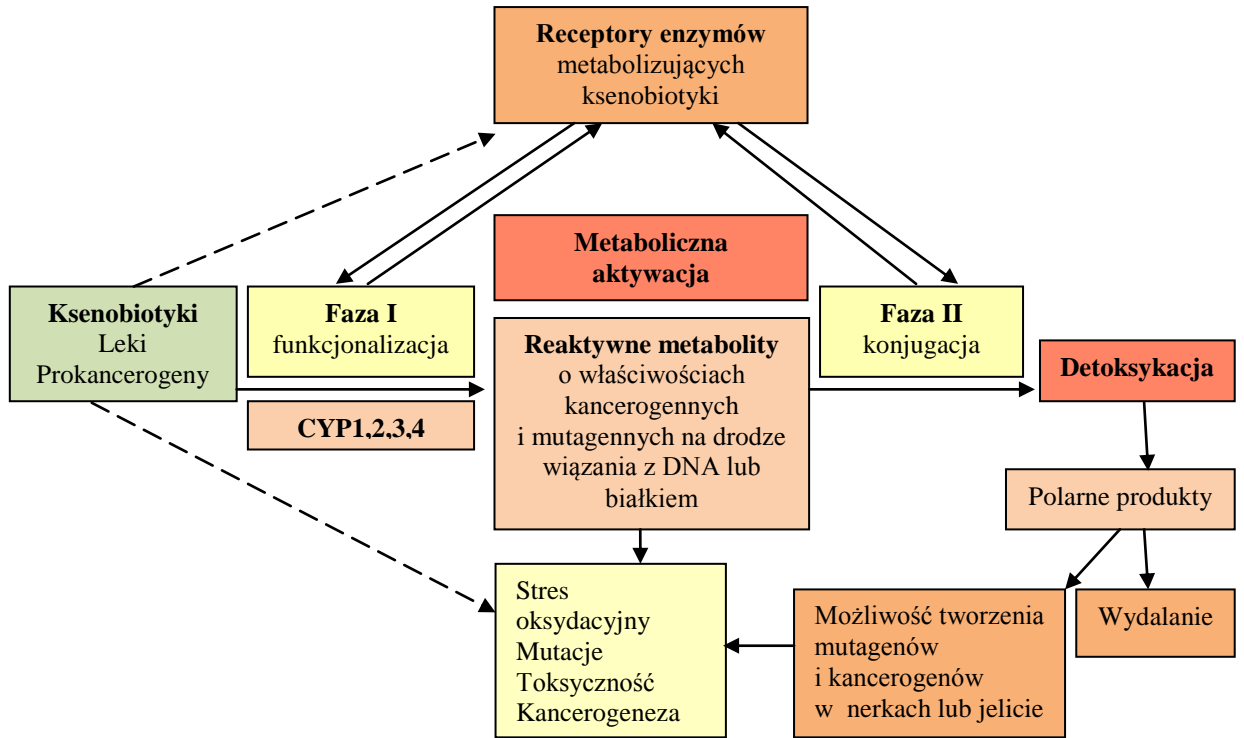
Biotransformacja ma na celu głównie ułatwienie eliminacji substancji obcych z organizmu. Jednak w rzeczywistości przemiany te mogą prowadzić zarówno do inaktywacji, zmiany aktywności i detoksykacji jak również do metabolicznej aktywacji i tworzenia związków toksycznych oraz kancerogennych. Jako etapowy proces przebiegający w następujących po sobie fazach tzw. funkcjonalizacji i koniugacji została po raz pierwszy przedstawiona przez *Rogera Williamsa* w monografii *Detoxifications Mechanisms* z 1947r. Reakcje biochemiczne w procesie biotransformacji prowadzone są przez enzymy strukturalnie związane z błonami siateczki endoplazmatycznej (np. monoaminooksydazy

i glukuronylotransferazy), zlokalizowane również w mitochondriach oraz enzymy rozpuszczalne (np. sulfotransferazy i esterazy). Wykazują one często niewielką specyficzność substratową, co pozwala na biotransformację szerokiego spektrum zróżnicowanych pod względem budowy ksenobiotyków a także przemiany związków endogennych. Reakcje I fazy przemian ksenobiotyków polegają na wprowadzeniu do substratu grupy funkcyjnej i katalizowane są głównie przez układ oksydaz o mieszanej funkcji tworzących mikrosomalny łańcuch przenoszenia elektronów składający się m.in. z cytochromu P450. Białka te katalizują reakcje biotransformacji zarówno endogennych jak i egzogennych substratów na drodze utleniania, redukcji i hydrolizy, prowadząc do powstania ich hydrofilnych metabolitów, zwykle wykazujących zredukowaną aktywność biologiczną. Aktywność izoform cytochromu P450 może wykazywać zmienność związaną ze zdolnością regulacji ich ekspresji, co ma istotne znaczenie ze względu na funkcje omawianej grupy enzymów w przemianie ksenobiotyków oraz ryzyko zachodzenia interakcji typu preparat roślinny lek syntetyczny. Ksenobiotyki, w tym leki, policykliczne węglowodory aromatyczne (PAH) i inne substraty enzymów CYP450, a także związki zawarte w wyciągach roślinnych, mogą oddziaływać z receptorami jądrowymi lub czynnikami transkrypcyjnymi powodując zmiany ekspresji genów kodujących określone izoformy. W II fazie biotransformacji, określanej jako biologiczna inaktywacja, powstałe metabolity pośrednie ulegają przekształceniu przez swoiste enzymy na drodze sprzęgania z endogennymi, polarnymi cząsteczkami takimi jak: aminokwasy, glutation, siarczany i kwas UDP-glukuronowy, co prowadzi zwykle do inaktywacji i warunkuje ułatwione usuwanie z organizmu z moczem lub żółcią. Reakcje II fazy biotransformacji katalizowane są głównie przez enzymy klasy transferaz a ich aktywność podlega również modyfikacji pod wpływem czynników endogennych i egzogennych. Enzymy poszczególnych faz przemian ksenobiotyków zamieszczono w Tabeli 1.

Tabela 1. Reakcje I i II fazy metabolizmu ksenobiotyków [Chung i wsp., 2000; Tredger i Stoll, 2002; Cashman, 2005; Gonzalez i Tukey, 2006; Mutschler, 2010]

Enzym	Funkcja	Przykłady substratów
Faza I		
Cytochrom P450	Hydroksylacja, demetylacja, dealkilacja, C- i O-oksydacja, inne	Propranolol, chlorzoksazon, teofilina, kofeina, diazepam
Monooksygenazy flawinowe (FMO)	N-, S- i P-oksydacja	Trimetyloamina, S-nikotyna, cymetydyna, klozapina, ranitydyna, tamoksyfen
Hydrolazy epoksydowe (mEH, sEH)	Hydroliza epoksydów	Epoksydy
Faza II		
Glutatio-S-transferazy (GST)	Sprzęganie z glutationem	Adriamycyna, busulfan, cyklofosamid, pestycydy
Sulfotransferazy (SULT)	Sprzęganie z siarczanem	Hormony steroidowe, kwasy żółciowe, izoflawony, paracetamol
N-acetylotransferazy (NAT)	Dodanie grupy acetylowej N-acetylacja, O-acetylacja	Arylaminy, N-hydroksylowane heterocykliczne aminy
UDP-glukuronylotransferazy (UGT)	Sprzęganie z kwasem glukuronowym	Morfina, bilirubina, paracetamol
Metylotransferazy (MT)	Dodanie grupy metylowej N-metylacja, S-metylacja	Nikotynamid, kaptopril, azatiopryna
Inne enzymy		
Dehydrogenaza alkoholowa	Redukcja	Alkohole
Dehydrogenaza aldehydowa	Redukcja	Aldehydy
Oksydoreduktaza NADPH - chinonu (NQO)	Redukcja	Chinony

Niektórzy autorzy definiują następujący po obu fazach proces transportu na zasadzie antyportu przez błony komórkowe przy udziale p-glikoproteiny lub białek MDR (ang. *multidrug resistance*) jako III fazę biotransformacji ksenobiotyków [Vrzal i wsp., 2004]. Ostatnim etapem jest usunięcie powstałych metabolitów z organizmu wraz z żółcią i moczem. Procesy biokonwersji mają na celu zmianę właściwości fizykochemicznych substancji w celu łatwiejszego jej wydalenia. Zachodząca podczas opisanych faz przemiana ksenobiotyków zwykle prowadzi do redukcji aktywności farmakologicznej leków i toksyczności substratów. Istnieją reakcje biotransformacji, w których z nieczynnych chemicznie substratów powstają reaktywne formy przejściowe wykazujące właściwości cytotoksyczne, kancerogenne, mutagenne i teratogenne (Rycina 1.) [Kishida i wsp., 2004].



Rycina 1. Ogólny schemat fazy I i II metabolizmu ksenobiotyków

Substratami takimi są środowiskowe czynniki chemiczne, w tym zawarte w diecie oraz dymie papierosowym prokancerogeny, które stają się realnym czynnikiem ryzyka rozwoju chorób nowotworowych [Baer-Dubowska, 2005].

1.3. Właściwości prokancerogenne ksenobiotyków

Konsekwencje toksykologiczne ekspozycji na ksenobiotyki uzależnione są od zachowania stanu równowagi między reakcjami fazy I i II metabolizmu substancji obcych. W sytuacji nasilonej wydajności funkcjonalizacji w stosunku do reakcji biologicznej inaktywacji, reaktywne formy związków kancerogennych gromadzą się w komórce i wykazują zdolność wiązania cząsteczek DNA i białek, co może prowadzić do uszkodzenia komórek. Wśród przyczyn wymienić można zarówno nieskuteczne funkcjonowanie enzymów sprzęgających jak i możliwość modyfikacji I fazy przemian ksenobiotyków. W tym zakresie szczególnie niebezpieczne wydaje się być zjawisko aktywacji metabolicznej macierzystych związków prokancerogennych, prowadzące do osiągnięcia przez nie właściwości mutagennych, kancerogennych i embriotoksycznych [Shweitz, 2000]. Wśród izoform cytochromu P450 związanych z metabolizmem substratów o takim charakterze wymienia się głównie enzymy z rodziny CYP1 oraz podrodziny CYP2E [Ioannides i Lewis, 2004]. Ponadto izoformy cytochromu P450 wykazują zdolność do generowania reaktywnych form tlenu mogących

modyfikować zasady purynowe i pirymidynowe a w konsekwencji prowadzić do mutacji punktowych i pęknięć łańcucha DNA [Villard i wsp., 1998].

Do składników diety wykazujących genotoksyczność przejawiającą się kowalencyjnymi modyfikacjami DNA należą: heterocykliczne aminy (HCA), N-nitrozaminy oraz policykliczne węglowodory aromatyczne (PAH) [Goldman i Shields, 2003]. Stosunkowo słabe działanie kancerogenne powstających podczas pirolizy białek i aminokwasów HCA, zbudowanych z pierścieni aromatycznych i silnie reaktywnej egzocyklicznej grupy aminowej, drastycznie wzrasta w wyniku procesu biologicznej aktywacji przez układ enzymatyczny metabolizmu ksenobiotyków. Ulegają przemianom w wyniku N-hydroksylacji katalizowanej przez izoenzym CYP1A2 oraz w wyniku estryfikacji prowadzonej przez acetylo- i sulfotransferazy [Sugimura, 2000; Goldman i Shields, 2003]. W innych tkankach organizmu z metabolizmem heterocyklicznych amin związane są izoformy CYP1A1 i CYP1B1 [Crofts i wsp. 1998; Turesky, 2007]. Powstałe reaktywne metabolity wiążą się głównie z guaniną w pozycji C8, co może zwiększać ryzyko rozwoju nowotworów, w tym raka jelita grubego [Schiffman i Felton, 1990]. N-nitrozoaminy powstają *in vivo* w wyniku jednoczesnego przyswajania azotanów lub też tlenków azotu wraz z substancjami takimi jak drugorzędowe aminy i przyczyniają się do rozwoju, głównie, nowotworów układu pokarmowego [Sugimura 2000; Goldman i Shields, 2003]. W wyniku ekspozycji tworzona jest N-nitrozodimetyloamina ulegająca enzymatycznej hydroksylacji przede wszystkim przez enzym CYP2E1 [Lai i Arcos, 1980]. Policykliczne węglowodory aromatyczne generowane są w wyniku niepełnego spalania substancji organicznych. Źródłem tych związków jest zarówno dym tytoniowy jak i dieta [Baer-Dubowska, 2005]. PAH są metabolizowane do zróżnicowanych produktów przez enzymy biotransformacji ksenobiotyków: CYP450, hydrolazę epoksydową, transferazę glutationu, NAD(P)H oksydoreduktazę chitonu i aldoketoreduktazę. Uznaje się, że cytochrom P450 pełni kluczową rolę w początkowym etapie utleniania PAH do fenoli i tlenków. Zaangażowanie wyżej wymienionych białek katalitycznych potwierdzają wyniki analizy szlaku prowadzącego do powstawania diol-epoksydów PAH z udziałem cytochromów P450 i hydrolazy epoksydowej w wątrobie szczurzej z wykorzystaniem substancji wzorcowej w postaci benzo[a]pirenu [Shimada, 2006]. Benzo[a]piren to chemiczny czynnik prokancerogeny ulegający biokonwersji do aktywnej formy posiadającej właściwości elektrofilne, wykazującej zdolność tworzenia wiązań kowalencyjnych z kwasami nukleinowymi. Przy udziale monooksygenaz w I fazie biotransformacji powstaje związek pośredni, benzo[a]pireno-7,8-dihydrodiol ulegający następnie w reakcjach metabolicznych II fazy detoksykacji do nieszkodliwego metabolitu benzo[a]pireno-7,8-dihydrodiolo-glukoronidu

usuwanego z żółcią i moczem. Endogenna aktywacja może jednak prowadzić do tworzenia pochodnych epoksydowych wykazujących wysokie powinowactwo do formowania adduktów DNA. W metabolizmie benzo[a]pirenu istotną funkcję pełnią izoformy podrodziny CYP1 oraz S-transferaza glutationu. Tego typu ksenobiotyki aktywowane są za pośrednictwem izoenzymów CYP1A, CYP1B1 oraz CYP2B1 do epoksydioli wiążących się z deoksyguanozyną lub adeniną i prowadzą prawdopodobnie do mutacji w genie supresorowym p53 indukując głównie nowotwory płuc [Denissenko i wsp., 1996]. Układy enzymatyczne prowadzące metabolizm ksenobiotyków pełnią istotną funkcję w aktywacji wielu chemicznych kancerogenów a więc potencjalna modulacja ich aktywności może stać się znacząca w zapobieganiu inicjacji procesu kancerogenezy.

1.4. Cytochrom P450

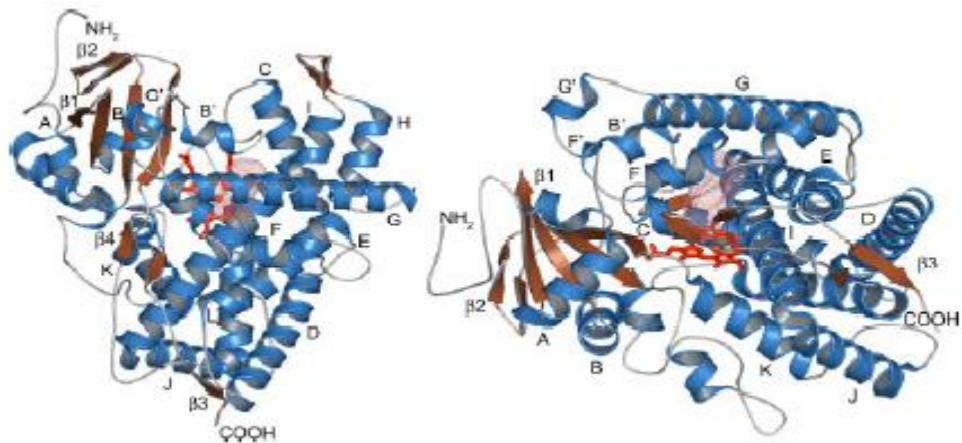
Izoenzymy należące do nadrodziny cytochromu P450 (CYP-450) to stara filogenetycznie grupa hemoprotein kodowanych przez geny, których obecność potwierdzono u jednokomórkowych organizmów żyjących 2-3 miliardy lat temu. Sugeruje się, że białka te wywodzą się od archebakterii - jednego z najstarszych poznanych organizmów i realizują ważne metaboliczne funkcje uczestnicząc w szlakach oksydoredukcyjnych komórek [Martignoni i wsp., 2006]. Nazewnictwo enzymów z rodziny cytochromu P450 zostało utworzone na podstawie obecności grupy hemowej w białku i charakterystycznej wartości absorbancji. CYP-450 zidentyfikowany został przez Klingenberga i Garfinkla w 1958r. i nazwany początkowo pigmentem P, a po charakterystyce widmowej dokonanej przez Sato w 1960r., cytochromem P450 ze względu na maksimum absorpcji przy długości fali 450 nm dla zredukowanej formy tego białka związanej z tlenkiem węgla [Klingenberg, 1958; Omura 1999; Nelson i wsp. 1996].

Nadrodzina hemoprotein cytochromu P450 obejmuje około 2500 białek mikrosomalnych, mitochondrialnych i cytozolowych występujących zarówno u ludzi, jak i zwierząt, bakterii, pierwotniaków i roślin. W latach osiemdziesiątych białka cytochromu P450 sklasyfikowano na podstawie homologii aminokwasowej w łańcuchu peptydowym, kryteriów filogenetycznych i organizacji genu [Kamiński i Wiaderkiewicz, 2008]. Izoenzymy należące do tej samej rodziny wykazują homologię sekwencji aminokwasowej na poziomie powyżej 40%, natomiast należące do tej samej podrodziny osiągają homologię rzędu powyżej 55% [Levy, 1995; Zuber i wsp., 2002]. Skrót CYP oraz cyfra arabska określają odpowiednio rodziny i podrodziny tych białek natomiast kolejny symbol liczbowy opisuje poszczególne

gen kodujący określony izoenzym [Nelson i wsp., 1996]. Każda izoforma CYP jest produktem specyficznego genu i posiada własną specyfikę substratową. U człowieka opisano występowanie 57 genów oraz ponad 58 pseudogenów sklasyfikowanych w 18 rodzinach i 43 podrodzinach cytochromu P450 [Pavek i Dvorak, 2008; Pelkonen i wsp., 2008; Tomaszewski i wsp. 2008]. Aktywność enzymatyczną izoform CYP450 łączy się z biotransformacją ksenobiotyków oraz przemianami steroidów i prostaglandyn, przy czym mają one odmienne lecz zachodzące na siebie specyficzności substratowe [Nelson i wsp., 1996].

1.4.1. Struktura i funkcje cytochromu P450

W 1985 roku po raz pierwszy określono krystalograficzną strukturę izoenzymu cytochromu P450 u bakterii z rodzaju *Pseudomonas putida*. W oparciu o te badania oraz modelowanie cząsteczek i ukierunkowaną mutagenezę u ssaków opisano budowę związanego z błoną cytochromu P450, u którego rozróżniono regiony odpowiedzialne za wiązanie substratu, transport elektronów i wiązanie hemu. Wykazano również, dla eukariotycznych enzymów P450, obecność na N-końcu białka 25 aminokwasowej sekwencji hydrofobowej umożliwiającej zakotwiczenie enzymu w błonie komórkowej [Sakaguci i wsp., 1987]. Pierwszym eukariotycznym enzymem P450, dla którego określono pełną sekwencję aminokwasową był izoenzym wyizolowany z komórek wątroby szczura indukowany przez podawanie fenobarbitalu [Fujii-Kuriyama i wsp., 1982]. Przykładową strukturę białka izoenzymu CYP1A2 przedstawiono na Rycinie 2.

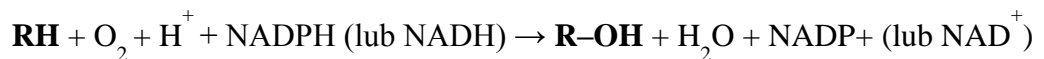


Rycina 2. Drugorzędowa i trzeciorzędowa struktura ludzkiej izoformy cytochromu P450 CYP1A2. Na schemacie oznaczono grupą prostetyczną. Kolorem niebieskim zaznaczono 12 struktur α -helisy oznaczone A-L, brązowym struktury β -kartki kolejno 1-4. Miejsce wiązania substratu zaznaczono czerwoną siecią [Sansen i wsp, 2007].

Funkcja cytochromu P450 jest ściśle związana ze strukturą centrum katalitycznego białka, gdzie na C-końcu łańcucha polipeptydowego znajduje się układ hemowy β określany

jako protoporfiryna IX. Żelazo protoporfiryny IX tworzy wiązania koordynacyjne z atomami azotu pierścienia pirolowego i siarki cysteiny łańcucha białkowego hemoproteiny oraz cząsteczką wody [Kamiński i Wiaderkiewicz, 2008]. Na C-końcu białka zlokalizowane są: miejsce wiązania substratu, domena oddziałująca z reduktazą NADPH cytochromu P450 i CYP- b₅ oraz determinanty antygenowe. Na aminowym końcu białka znajduje się kotwica hydrofobowa sięgająca do przestrzeni siateczki śródplazmatycznej, gdzie znajduje się hydrofobowy kanał stanowiący drogę transportu substratów metabolizowanych przez centrum katalityczne cytochromu P450. Masa cząsteczkowa izoform cytochromu P450 mieści się w zakresie 43 - 60 kDa.

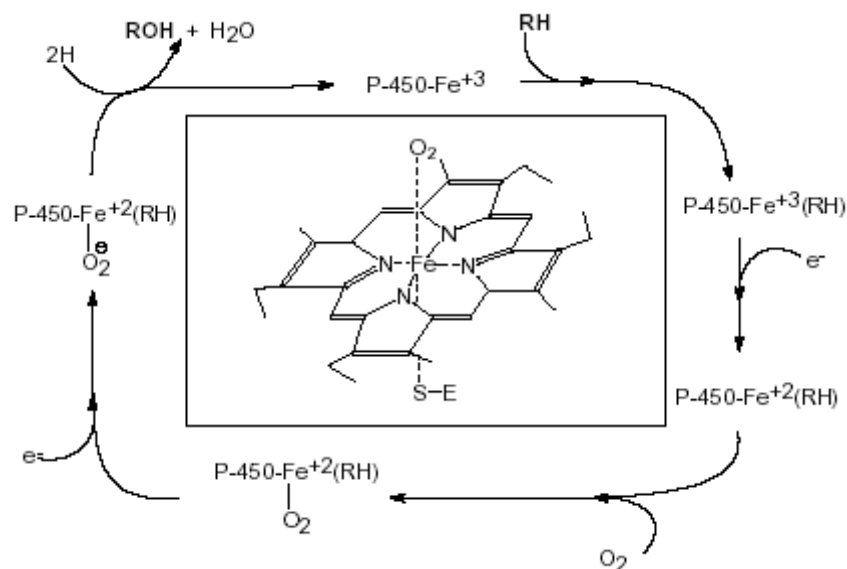
Cytochrom P450 jest końcowym ogniwem łańcucha przekazu elektronów. Wszystkie poznane izoformy CYP-450 wiążą dwa atomy tlenu cząsteczkowego do żelaza grupy hemowej, podobnie jak ma to miejsce w hemoglobinie i mioglobinie. Jeden atom tlenu tworzy cząsteczkę wody, przez co enzymy CYP są nazywane oksydazami o funkcji mieszanej. Drugi atom tlenu jest wprowadzany do cząsteczki substratu zwiększając polarność metabolitu, dlatego enzymy CYP należą do klasy enzymów określanych mianem monooksygenazy z numerem systematycznym 1.14.14.1. W większości przypadków powstaje hydroksylowany produkt. Ogólna reakcja katalizy prowadzonej przez enzymy cytochromu P450 przebiega według podanego poniżej schematu [Guengerich, 2000; Zuber i wsp., 2002]:



gdzie: RH - substrat, ROH - produkt

W reakcji monooksygenacji izoenzymy cytochromu P450 przejmują elektron z NADPH lub z NADH i poprzez inne przenośniki elektronów sprzężone z białkami błonowymi, przenoszą go na cząsteczkę tlenu. W rezultacie reakcji jeden atom tlenu zostaje wbudowany do cząsteczki substratu a drugi tworzy cząsteczkę wody. Cykl przemian rozpoczyna się utworzeniem kompleksu cytochrom P450-substrat w wyniku jego związania z grupą hemową oraz redukcją żelaza Fe(III) do Fe(II) w kompleksie przez elektron pochodzący od reduktazy NADPH [Guengerich, 2000]. U człowieka przenoszenie elektronów z NADPH na cytochrom P450 realizowane jest przez dwa systemy transportu funkcjonujące w siateczce śródplazmatycznej i mitochondriach. W siateczce śródplazmatycznej NADPH przekazuje elektrony na reduktazę cytochromu P450 (1.6.4.2) będącą flawoproteiną NADPH-zależną, posiadającą w części katalitycznej, we fragmencie C-końcowym zwróconym do cytozolu, domeny wiążące NADPH, dinukleotydy

flawinoadeninowy (FAD) i mononukleotyd flawinoadeninowy (FMN) a także domenę oddziałującą z cytochromem P450. Następnie, w wyniku związania cząsteczki tlenu z hемом, powstaje kompleks oksycytochrom P450-substrat, po czym ma miejsce redukcja utworzonego trójskładnikowego kompleksu przez elektron z cytochromu b₅ lub reduktazy NADPH cytochromu P450, uwodornienie i utworzenie kompleksu FeOOH-RH. Po przyłączeniu kolejnego protonu następuje rozpad wiązania O–O i utworzenie cząsteczki H₂O oraz kompleksu Fe(III)=O. Ten reaktywny kompleks przyjmuje rodnik wodorowy z substratu, przechodząc w strukturę Fe(III)–O•H, pozostawiając niesparowany elektron w cząsteczce substratu. Powstałe w ten sposób dwa rodniki podlegają przemianie tworząc produkt z grupą hydroksylową. Końcowym etapem cyklu jest odłączenie produktu i odtworzenie cząsteczki cytochromu P450 [Guengerich, 2000; Isin i Guengerich, 2007]. Schemat cyklu katalitycznego zamieszczono na Rycinie 3.



Rycina 3. Cykl katalityczny z udziałem cytochromu P450 oraz schematyczna struktura grupy prostetycznej [wg Rostkowska i wsp., 1998]

W pewnych reakcjach katalizowanych przez mikrosomalne izoenzymy cytochromu P450, transfer drugiego elektronu może zachodzić z cytochromu b₅ będącego niewielkim białkiem hemowym (17 kDa) funkcjonującym w retikulum endoplazmatycznym. Cytochrom b₅ jest redukowany z udziałem NADPH zależnej reduktazy cytochromu P450 lub NADH reduktazy cytochromu b₅ (1.6.2.2). W mikrosomach wątroby z jedną reduktazą NADPH współpracuje 10–20 cząsteczek CYP-450 i 5–10 cząsteczek cytochromu b₅ [Czekaj, 2005]. W warunkach indukcji lub inhibicji ma miejsce zmiana tych proporcji. W mitochondrialnym systemie transferu elektronów na cytochrom P450, akceptorem elektronów z NADPH jest

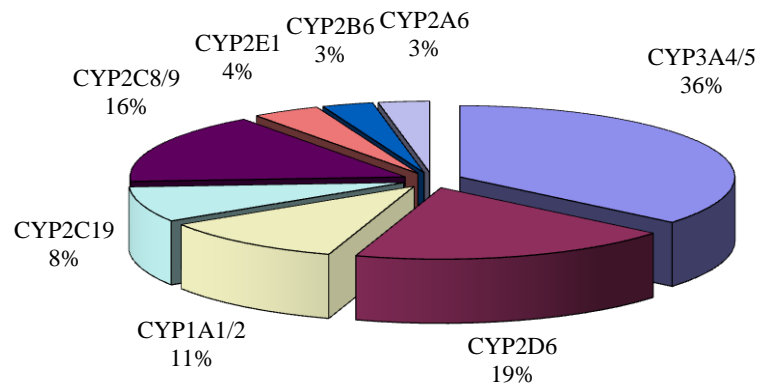
FAD reduktazy flawoproteinowe, enzymu o masie ok. 51 kDa słabo związanego z błoną mitochondrialną. W reakcji przenoszenia elektronów na cząsteczkę hemu cytochromu P450 pośredniczy niewielkie białko żelazo-siarkowe (adrenodoksyna). Trzeci typ transportu elektronów na cytochrom P450 występuje u bakterii i opisany został u *Pseudomonas putida* [Sevrioukova i wsp., 2004]. W mitochondriach znajduje się około 10-15% hemoproteidów metabolizujących ksenobiotyki, w tym zarówno konstytutywnych i indukowalnych izoform cytochromu P450 z rodziny CYP1, 2 i 3 [Anandatheerthavarada i wsp., 1997].

Enzymy z nadrodziny P450 katalizują wiele zróżnicowanych reakcji chemicznych szerokiego spektrum strukturalnie odmiennych substancji obcych. Główną funkcją katalizowanych przez nie reakcji jest przekształcenie substratów reakcji w bardziej polarne metabolity, które mogą zostać łatwiej wydalone z organizmu bezpośrednio lub w formie sprzężonej, powstałej w wyniku aktywności enzymów II fazy metabolizmu ksenobiotyków [Cederbaum, 2006]. Monooksygenazy z nadrodziny CYP, w zależności od struktury substratów, katalizują reakcje [Zuber i wsp., 2002; Tomaszewski i wsp., 2008]:

- hydroksylacji alifatycznego lub aromatycznego węgla (propanolol - CYP1A2)
- epoksydacji wiązania podwójnego (karbamazepina - CYP3A4)
- utleniania alkoholi i aldehydów (metronidazol - CYP3A4)
- N - oksydacji (meksyletyna - CYP2D6)
- S - oksydacji (tioridazyna - CYP2D6, omeprazol - CYP3A4)
- oksygenacji i N - hydroksylacji heteroatomów (S-, N-,X-),
- oksydatywnej O - dealkilacji (kodeina - CYP2D6)
- oksydatywnej N - dealkilacji (diazepam - CYP2C19)
- oksydatywnej S - dealkilacji (6-metylotiopuryna - CYP2D6)
- oksydatywnej deaminacji (amfetamina - CYP2D6)
- oksydatywnej denitryfikacji (aminofenazon - CYP3A4)
- oksydatywnej desulfurylacji (tiopental - CYP2D6)
- oksydatywnej dehalogenacji (halotan - CYP2E1)
- oksydatywnej cyklizacji (piroksykam - CYP2C9)
- aromatyzacji alicyklicznych substratów (nifedypina - CYP3A4, CYP3A3)
- oksydatywnej decyklizacji (alprazolam - CYP3A4)
- przeniesienia grupy tlenowej
- rozszczepienia estrów
- dehydrogenacji

- reduktywnej dehalogenacji
- azo- i nitro- redukcji
- izomeryzacji
- C- oksydacji

Uważa się, że izoenzymy CYP uczestniczą w metabolizmie ponad 80% leków oraz przemianie innych zróżnicowanych związków egzogennych. Obecnie wydaje się, że za wątrobową biokonwersję większości ksenobiotyków u człowieka odpowiadają izoformy z rodzin CYP1, CYP2 i CYP3 (CYP1A2, CYP3A4, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 i CYP2E1) zaliczane do 35 izoenzymów istotnych klinicznie [Badyal i Dadhich, 2001; Zuber i wsp., 2002; Martignoni i wsp., 2006] a spośród trzech głównych mechanizmów I fazy biotransformacji leków, utleniania, redukcji i hydrolizy, dominują reakcje oksydacji przeprowadzane przez monooksygenazy z nadrodziny cytochromu P450. Udział izoform w metabolizmie leków przedstawiono na Rycinie 4.



Rycina 4. Proporcje udziału enzymów cytochromu P450 w metabolizmie leków [wg Wrighton i wsp., 1992; Kashuba i Bertino, 2001]

Poza funkcją detoksykacyjną, aktywność niektórych izoform cytochromu P450 powiązana jest z przekształcaniem chemicznych prokancerogenów do ich aktywnych metabolitów zdolnych do indukcji procesu nowotworzenia. Spośród izoenzymów CYP450 analizowanych w kierunku biotransformacji czynników w kierunku kancerogennych, teratogennych i hepatotoksycznych metabolitów szczególnie wysoki udział przypisuje się izoformom z rodziny CYP1 oraz CYP2 (Tabela 2.).

Tabela 2. Udział izoenzymów cytochromu P450 w bioaktywacji czynników prokancerogennych [Ioannides, 2007]

Podrodzina CYP450	Zakres udziału w chemicznej kancerogenezie	Główne klasy aktywowanych kancerogenów	Indukowalność
CYP1A	bardzo szeroki	PAH, AA, HA, MC, NNK, AAB	bardzo wysoka
CYP1B	bardzo szeroki	PAH, AA, HA, MC, NNK, AAB, estrogen	bardzo wysoka
CYP2A	umiarkowany	NA, OP	umiarkowana
CYP2B	umiarkowany	NA, OP	wysoka
CYP2C	niewielki	PAH	umiarkowana
CYP2D	słaby	NNK	nieindukowana
CYP2E	obszerny	NA, HAH	wysoka
CYP2F	nie określono	–	nie określono
CYP2G	nie określono	–	nie określono
CYP2J	nie określono	–	nie określono
CYP3A	umiarkowany	PAH, MC, PA	wysoka

AA - aminy aromatyczne; HA - heterocykliczne aminy; MC - mikotoksyny;
 NNK - 4-(metylonitrozamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol; AAB - aminoazobenzeny;
 OP - oksazofosforiny; NA- nitrozaminy; PA - alkaloidy pirolizydynowe

Badania w modelach zwierzęcych pozbawionych ekspresji genów cytochromu P450 potwierdziły ich funkcje w zakresie metabolizmu substratów endogennych i utrzymaniu prawidłowego rozwoju u ssaków [Guengerich i wsp., 2000]. Funkcja systemu katalitycznego cytochromu P450 jest związana z metabolizmem endogennych steroidów, kwasów żółciowych, eikozanoidów, retinoidów i prostaglandyn [Lewis i wsp., 1998]. Przykładem takiej aktywności jest biosynteza niskocząsteczkowych regulatorów zróżnicowanych funkcji biologicznych, w tym tworzenie hormonów steroidowych z cholesterolu, w którym główną rolę przypisuje się enzymowi CYP51A1 [Shimada i wsp. 1994; Zuber i wsp., 2002]. Ponadto w syntezie kwasów żółciowych z cholesterolu i oksysterolu istotną funkcję pełnią CYP7A1, CYP7B1 i CYP39A1. W syntezie i metabolizmie witaminy D uczestniczą izoformy takie jak CYP27A1, CYP27B1 i CYP24A1 natomiast w przemiany pochodnej witaminy A i kwasu retinowego zaangażowane są CYP26A1 i CYP26B1 [Tomaszewski i wsp., 2008]. Fizjologiczne funkcje poszczególnych izoenzymów opisano w Tabeli 3.

Tabela 3. Udział izoenzymów CYP w fizjologicznych szlakach metabolicznych ludzkiego organizmu [wg Tomaszewski i wsp., 2008]

Funkcja w szlaku metabolicznym	Izoformy CYP	Źródło
Biosynteza cholesterolu	CYP51A1, CYP20A1	<i>Pikuleva</i> , 2006 www.cypalleles.ki.se
Biosynteza kwasów żółciowych	CYP7A1, CYP7B1, CYP8B1, CYP27A1, CYP3A4, CYP39A1	<i>Axelson i wsp.</i> 1992; <i>Russell</i> , 2003; <i>Norlin i Chiang</i> . 2004; <i>Chiang</i> , 2004
Metabolizm hormonów steroidowych	CYP1A2, CYP2C9, CYP2C18, CYP2C19, CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7, CYP3A43, CYP11A1, CYP11B1, CYP11B2, CYP17A1, CYP19A1, CYP21A2	www.cypalleles.ki.se, www.nextprot.org
Metabolizm kwasów tłuszczowych, prostaglandyn, prostacyklin i leukotrienów	CYP2C8, CYP2J2, CYP2U1, CYP2W1, CYP4A11, CYP4A22, CYP4F2, CYP4F3, CYP4F8, CYP4F11, CYP4F12, CYP4F22, CYP4X1, CYP5A1, CYP8A1, CYP20A1	<i>Kroetz i Zeldin</i> , 2002 www.cypalleles.ki.se www.nextprot.org
Biosynteza oksysteroli	CYP7A1, CYP27A1, CYP39A1, CYP46A1	<i>Norlin i Chiang</i> , 2004 www.nextprot.org
Metabolizm ciał ketonowych	CYP2E1	<i>Kalapos</i> , 2003 www.nextprot.org
Metabolizm witaminy A	CYP2C8, CYP26A1, CYP26B1, CYP26C1	<i>Gonzales</i> , 1989 <i>Taimi i wsp.</i> , 2004
Metabolizm witaminy D	CYP2R1, CYP3A4, CYP24A1, CYP27A1, CYP27B1, CYP27C1	<i>Sakaki i wsp.</i> , 2005 www.nextprot.org

[www.cypalleles.ki.se, dostęp 10.08.2011; www.nextprot.org., dostęp 25.04.2012r]

1.4.2. Lokalizacja tkankowa i komórkowa izoform cytochromu P450

Układ monooksygenaz zależny od cytochromu P450 popularnie określany jest mianem mikrosomalnego, ze względu na lokalizację enzymów CYP w błonach retikulum endoplazmatycznego, otoczki jądrowej, plazmolemie i mitochondriach. W mitochondriach funkcjonują konstytutywne izoformy CYP-450 zaangażowane w metabolizm substancji endogennych takich jak cholesterol, hormony sterydowe, witamina D3 i kwasy żółciowe oraz 10-15% cytochromów P450 metabolizujących ksenobiotyki. W blaszce zewnętrznej otoczki jądrowej połączonej z szorstką siateczką śródplazmatyczną opisano występowanie izoform rodziny CYP1 indukowanych przez TCDD, 3-metylocholanren i β -naftoflawon, co może wiązać się z nasilonym ryzykiem uszkodzenia DNA przez generowanie aktywnych metabolitów pośrednich lub tworzenie reaktywnych form tlenu. W plazmolemie hepatocytów zawartość cytochromu P450 i aktywność jego reduktazy jest niska lub nie występuje, przy czym spośród izoform cytochromu P450 stwierdzono obecność CYP2E1 [*Kamiński*, 1990].

U ssaków miejsce funkcjonowania izoform cytochromu P450 określono jako zróżnicowane, przy czym najwyższy poziom występuje w przewodzie pokarmowym, głównie w wątrobie. Ich obecność potwierdzono również w większości tkanek organizmu: nabłonku jamy nosowej, w płucach, nerkach, skórze, jądrach i komórkach krwi [Zuber i wsp., 2002; Martignoni i wsp., 2006]. Wykazano, że w wątrobie ilości tych białek utrzymują się na najwyższym poziomie wynoszącym blisko 300 pmol CYP/mg białka mikrosomalnego a w nabłonku jelita osiągają wartości stężenia ok. 20 pmol CYP/mg białka mikrosomalnego, co wskazuje, że są to główne miejsca zależnej od CYP drogi wydalania ksenobiotyków, podczas gdy inne tkanki wykazują znacznie mniejsze zdolności ich eliminacji [Peters i Kremers, 1989; Shimada i wsp., 1994]. W wątrobie dorosłego człowieka izoformy CYP1A2, CYP2A6, CYP2C, CYP2D6, CYP2E1 i CYP3A stanowią łącznie w przybliżeniu 70% całkowitej zawartości enzymów CYP450. Zawartość CYP1A2 i CYP2E1 stanowi niespełna 13% i 7% [Shimada i wsp. 1994, Shimada i wsp., 1996]. Udział poszczególnych izoform w mikrosomalnej frakcji ludzkiej wątroby przedstawiono poniżej w Tabeli 4.

Tabela 4. Zawartość całkowitej frakcji cytochromu P450 i poszczególnych izoform w ludzkich mikrosomach wątroby. Całość frakcji określono analizą spektralną natomiast specyficzne izoformy mierzono immunochemicznie Dane z 60 próbek (średnia±S.D.) [Guengerich i wsp., 1982]

Przedmiot badania	nmol/mg białka	% P-450
CYP450	0,344 ± 0,167	
P-450 1A2	0,042 ± 0,023	12,7 ± 6,2
P-450 2A6	0,001 ± 0,013	4,0 ± 3,2
P-450 2B6	0,014 ± 0,013	0,2 ± 0,3
P-450 2C	0,060 ± 0,027	18,2 ± 6,7
P-450 2D6	0,005 ± 0,004	1,5 ± 1,3
P-450 2E1	0,022 ± 0,012	6,6 ± 2,9
P-450 3A	0,240 ± 0,100	28.8 ± 10,4

Zaobserwowano, że całkowita zawartość enzymów CYP w ludzkiej wątrobie płodowej stanowi około 1/3 wartości mierzonej u dorosłej osoby i wzrasta w okresie pourodzeniowym do 10 roku życia. Ze względu na czas rozpoczęcia aktywności enzymy CYP u człowieka można podzielić na 3 kategorie:

- enzymy ulegające ekspresji w wątrobie płodowej (CYP3A7 i CYP4A1), których aktywność obniza się w okresie pourodzeniowym;
- enzymy ulegające ekspresji u noworodków (CYP2E1 i CYP2D6), których aktywność nie jest obserwowana u płodu a ujawnia się natychmiast po porodzie;

- enzymy ulegające ekspresji w późniejszym okresie rozwoju (CYP1A2, CYP2B, CYP2C i CYP3A4), których aktywność wzrasta w kilka tygodni po urodzeniu i wykazuje niższe tempo rozwoju w porównaniu do enzymów okresu wczesnopourodzeniowego [Cresteil, 1998].

1.4.3. Rodzina CYP1 cytochromu P450

Rodzina białek CYP1 jest jedną z najstarszych, najbardziej konserwatywnych ewolucyjnie struktur i obejmuje izoformy CYP1A1, CYP1A2 i CYP1B1 (Tabela 5.) [Zuber i wsp., 2002]. Wykazano, że ekspresja genów tych białek u człowieka jest zróżnicowana w poszczególnych organach [Ding i Kaminsky, 2003; Shimada, 2006]. Charakterystykę wymienionych izoform przedstawiono w Tabeli 5.

Tabela 5. Charakterystyka ludzkich izoenzymów CYP1 [Shimada i wsp. 1996; Choudhary i wsp., 2005; Tomaszewski i wsp., 2008]

Rodzina	Podrodzina	Izoenzym	Mcz (kDa)	L. aa	L. k	Lokalizacja tkankowa
CYP1	CYP1A	CYP1A1	58,2	512	ER	jądra, prostata, komórki mięszu płuc, komórki jajnika, gruczoł mlekowy, komórki nabłonkowe macicy, limfocyty, hepatocyty
		CYP1A2	58,3	515	ER	hepatocyty, komórki mięszowe płuc
	CYP1B	CYP1B1	60,8	543	ER	komórki mięszowe śledziony, naczyniówka oka, komórki nabłonkowe tchawicy i ślimaka ucha, nerka, gruczoły sutkowe, macica, jajniki, prostata, tarczycza, nadnercza, serce, płuca, mózg, łożysko, jądra, jelito cienkie, leukocyty przysadka

Mcz- masa cząsteczkowa; L.aa- liczba aminokwasów; L.k- lokalizacja komórkowa; ER- błony retikulum endoplazmatycznego

Izoforma CYP1A2 występuje głównie w wątrobie podczas gdy pozostałe zlokalizowane są w tkankach pozawątrobowych. Obecność transkryptu CYP1B1 potwierdzono w nerkach, gruczołach sutkowych, macicy, jajnikach, prostacie, tarczycy, nadnerczach, śledzionie, sercu, płucach, mózgu, łożysku, jądrach, jelicie cienkim, leukocytach

krwi obwodowej, przysadce, natomiast nie wykazano jego ekspresji w trzustce [Shimada i wsp. 1996; Choudhary i wsp., 2005]. Izoforma ta uczestniczy w metabolizmie PAH oraz endogennych steroidów, retinolu i retinalu, arachidonianu i melatoniny a także, u człowieka, katalizuje reakcję 4-hydroksylacji estradiolu. Podwyższony poziom ekspresji CYP1B1 obserwowany jest w komórkach nowotworowych a metaboliczna aktywacja estrogenów zachodząca z jego udziałem uznawana jest za czynnik rozwoju raka endometrium i piersi [Pavek i Dvorak, 2008]. Podrodzina CYP1A cytochromu P450 składa się u wszystkich gatunków ssaków z dwóch izoform CYP1A1 i CYP1A2 wysoce konserwatywnych międzygatunkowo z homologią powyżej 80% pomiędzy gatunkami takimi jak: mysz, szczur, małpa i człowiek. Obie izoformy wykazują wobec siebie 68% podobieństwo sekwencji aminokwasowej [Martignoni i wsp., 2006]. Ludzkie geny *CYP1A1* i *CYP1A2* położone są na chromosomie 15q23 w orientacji „głowa do głowy” (ang. *head to head*), w odległości około 23kb od siebie [Fujii-Kuriyama i Mimura, 2005]. Enzym CYP1A1 u człowieka ulega ekspresji głównie w tkankach pozawątrobowych, w tym w płucach pod wpływem indukcji przez prokancerogenne składniki dymu papierosowego, co wydaje się być istotnym czynnikiem rozwoju raka tego organu (Tabela 6.) [Lewis i wsp., 1998].

Tabela 6. Poziom ekspresji enzymów z rodziny CYP1 i czynnika AhR w ludzkich prawidłowych tkankach

Nazwa białka	Jelito cienkie	Nerki	Płuca	Łożysko	Wątroba
CYP1A1	+	+	+++ ^c +/-	++/+	++
CYP1A2	-	-	+/-	+ ^a /-	+++
CYP1B1	+	++/+	++/+	+	+
AhR	+	++	+++ / ++	+++*	++

+++ wysoka ekspresja, ++ umiarkowana ekspresja, + niska ekspresja, - brak ekspresji, c palacze, +/- poziom mRNA u osób niepalących, *organ z najwyższą ekspresją

Ponadto wykazano zdolność indukowania aktywności CYP1A1 w komórkach śródbłonkowych naczyń krwionośnych, nabłonku skóry i przewodu pokarmowego, w komórkach płodowych i embrionalnych [Nebert i wsp., 2004]. Izoforma CYP1A1 ma niewielkie znaczenie z punktu widzenia metabolizmu leków, przy czym wiązana jest z przemianami karotenoidów. CYP1A2 ulega natomiast konstytutywnej ekspresji w wątrobie. Wykazano, że profil indukcji obu izoform podrodziny CYP1A jest bardzo zbliżony międzygatunkowo [Martignoni i wsp., 2006]. Intensywne badania CYP1A1 i CYP1A2

prorowadzone są głównie ze względu na ich udział w metabolizmie policyklicznych węglowodorów aromatycznych i arylamin w elektrofilowe, reaktywne formy pośrednie, co prowadzi do nasilenia ich toksycznego oddziaływania i wzrostu ryzyka rozwoju nowotworów. Reakcje utleniania prowadzone przez CYP1A1 i CYP1A2 inicjują proces konwersji substratów o właściwościach prokancerogennych prowadząc do tworzenia się tlenków, dioli, epoksydów i innych metabolitów, które mogą pełnić funkcję adduktów DNA i białek. Poza tym podrodzina CYP1A katalizuje reakcje dealkilacji fenacetyny i kofeiny oraz przemiany wielu innych leków [Pelkonen i wsp., 1998]. Indukcja ekspresji izoenzymów z rodziny CYP1 ma miejsce w wyniku ekspozycji na substraty tych enzymów, takie jak benzo[a]piren, 3-MC, PAH i chlorowcowane węglowodory aromatyczne a aktywacja transkrypcji przebiega prawdopodobnie przez szlak czynnika cytoplazmatycznego - receptora węglowodorów aromatycznych (AhR) pod wpływem potencjalnych jego ligandów [Nebert i wsp., 2004].

1.4.3.1. Udział CYP1A2 w metbolizmie ksenobiotyków

Izoforma CYP1A2 to jeden z głównych enzymów I fazy metabolizmu ksenobiotyków ulegający ekspresji głównie w wątrobie i stanowiący ok. 13% całkowitej zawartości CYP. Obecność tego białka na niższym poziomie opisano również w innych tkankach [Shimada i wsp., 1994; Ding i Kaminsky, 2003; Martignoni i wsp., 2006]. Możliwość indukcji obserwuje się w przewodzie pokarmowym, nabłonku jamy nosowej oraz w mózgu [Nebert i wsp., 2004]. Ludzki gen *CYP1A2* składa się z siedmiu eksonów i sześciu intronów, natomiast w skład białka wchodzi 515 reszt aminokwasowych o łącznej masie 58,294 Da [Zhou i wsp., 2010]. Struktura ludzkiej izoformy CYP1A2 składa się z 12 α -helis i 4 struktur β -kartki oznaczonych odpowiednio jako A-L oraz 1-4. Ze względu na budowę centrum aktywnego enzym ten zaangażowany jest w biotransformację głównie niskocząsteczkowych, lipofilnych, płaskich substratów zróżnicowanych strukturalnie [Korhonen i wsp., 2005; Sansen i wsp., 2007]. Dotychczas opisano ponad 110 leków stosowanych klinicznie, które są w różnym stopniu metabolizowane przez CYP1A2. Wśród intensywnie biotransformowanych znajdują się: kofeina (>95%), teofilina (90-95%), tizanidyna (80-95%), fenacetyna (86%), paraksantyna (80%), riluzol (75-80%), tauryna (50-65%), klozapina (40-55%), propranolol (30-50%), melatonina (40-60%), aminopiryna (40-50%), duloksetyna (30-40%), olanzapina (30-40%) i dekarbazyna (20-40%) [Sansen i wsp. 2007; Zhou i wsp., 2010]. Wśród reakcji katalizowanych przez tę izoformę wymienia się: demetylację kofeiny i teofiliny,

hydroksylację propranololu, O-deetylację fenacetyny i N-demetylację zotepiny. Wykazano, że w mikrosomach wątroby, CYP1A2 odgrywa dominującą rolę w aktywacji dekarbazyny (DTIC) będącej cytostatykiem stosowanym w terapii pacjentów z czerniakiem [Reid i wsp., 1999]. Tezę tę potwierdzają obserwacje hamowania reakcji N-demetylacji DTIC pod wpływem inhibitorów enzymu: α -naftoflawonu, kwercetyny i chlorzoksazonu. Dla badań *in vivo* istotne jest, że ludzka i szczurza izoforma CYP1A2 wykazują zbliżoną specyfikę substratową (Tabela 7.).

Tabela 7. Wybrane substraty CYP1A2 [Gallagher i wsp., 1994; Edwards i Bernier, 1996; McKinnon i Evans, 2000; Flockhart, 2007; Sansen i wsp., 2007; Zhou i wsp., 2010]

ZESTAWIENIE SUBSTRATÓW IZOENZYMU CYP1A2	
CYP1A2 Hydroksylaza węglowodorów aromatycznych	Substraty endogenne: 17 β -estradiol, estrogen, retinol, kwas arachidonowy, inne steroidy i kwasy tłuszczowe
	Substraty egzogenne: <ul style="list-style-type: none"> • leki przeciwdepresyjne: amitryptylina, klomipramina, imipramina, dezipramina, agomelatyna, fluwoksamina, fluoksetyna, duloksetyna, • leki przeciwpsychotyczne: klozapina, olanzapina, haloperidol • agoniści receptora serotoninowego: zolmitryptan • benzodiazepiny: chlordiazepoksyd, diazepam • β-blokery: propranolol • blokery kanału wapniowego: verapamil • leki antyarytmiczne: meksyletyna, lidokaina, amiodaron • leki przeciwkrzepliwe: R-warfaryna, R-acenokumarol • leki przeciwbólowe/NLPZ: fenacetyna, naproksen, paracetamol, aminopiryryna • leki przeciwastmatyczne: furafilina, teofilina, zilueton • leki przeciwnowotworowe: tamoksyfen, dekarbazyna, flutamid, aminoflawon, bortezomib • leki przeciwwymiotne: ondansetron • hormony: melatonina, • inne: kofeina, paraksantyna, riluzol, tauryna, tizanidyna, ropiwakaina, takryna, tizanidyna, flutamid, ropiwakaina, tizanidyna • 7-metoksyrezorufina, 7-etoksykumaryna, 7-etoksyrezorufina benzyoksyrezorufina • PAH • aflatoksyna B1

CYP1A2 katalizuje również reakcje utleniania innych ksenobiotyków, w tym związków prokancerogennych, których przykłady podano w Tabeli 8. [Ding i Kaminsky, 2003]. Istnieją badania potwierdzające możliwość zmian aktywności CYP1A2 pod wpływem wielu czynników, w tym egzogennych hormonów oraz składników diety a także wyciągów roślinnych i izolowanych składników aktywnych w nich zawartych [Hong i wsp., 2004].

Tabela 8. Efekt toksykologiczny przykładowych substratów izoformy CYP1A2

Substrat	Efekt toksykologiczny	Autor
1. PAH		
Benzo[a]piren	Kancerogeny	<i>Fukuhara i wsp., 1999</i>
3-Nitrobenzantron	Genotoksyczny	<i>Arlt, 2005</i>
Benzo[a]fenantren	Kancerogeny	<i>Kleiner i wsp., 2004</i>
2. Heterocykliczne aminy		
2-acetyloaminofluoren	Kancerogeny, genotoksyczny	<i>Rendic, 2002</i>
MeIQx	Hepatokancerogeny	<i>Turesky i wsp., 2002</i>
3. Nitrozaminy		
N,N-dimetylnitrozamina	Kancerogeny	<i>Fujita i Kamataki, 2001</i>
N,N-dietylnitrozamina	Genotoksyczny	
N-nitrozodibutyloamina	Kancerogeny	
4. Leki		
Fenacetyna	Hepatotoksyczny i kancerogeny	<i>von Moltke i wsp., 1996</i>
Acetaminofen	Hepatotoksyczny i kancerogeny	<i>Rendic, 2002</i>

Enzym CYP1A2 związany jest z przemianami steroidów i kwasów tłuszczowych. Wśród funkcji fizjologicznych podkreśla się udział CYP1A2 w metabolizmie 17β -estradiolu po jego początkowym przekształceniu do estronu, przy czym enzym ten bardzo aktywnie katalizuje reakcje 2-hydroksylacji. Postuluje się więc, że wysoka aktywność CYP1A2 może być związana z ryzykiem rozwoju raka piersi [*Hong i wsp., 2004*]. Ponadto CYP1A2 uczestniczy w przemianach melatoniny, bilirubiny i kwasu arachidonowego [*Zhou i wsp., 2010*].

1.4.4. Rodzina CYP2 cytochromu P450

Wśród izoenzymów z rodziny CYP2, zaangażowanych w metabolizm klinicznie stosowanych leków i etanolu, wymienia się: CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 oraz CYP2F1 (Tabela 9.) [*Pavek i Dvorak, 2008*]. CYP2C9 ulega ekspresji na wysokim poziomie w ludzkiej wątrobie i jelicie. CYP2E1 uczestniczy w glukoneogenezie z acetonu i metabolizmie ksenobiotyków, w tym nitrozamin, paracetamolu [*Raucy i wsp., 1989*], 4-nitrofenolu [*Tassaneeyakul i wsp., 1993*], etanolu [*Ekström i wsp., 1986*], chlorowcowanych węglowodorów [*Raucy i wsp., 1993*] i innych niskocząsteczkowych związków. Poza tym izoforma ta aktywuje substraty prokancerogenne takie jak benzen, dialkilonitrozaminy, butadien, chloroform, chlorek winylu, akrylonitryl i czterochlorek węgla [*Gonzalez i Gelboin, 1994; Guengerich, 1995; Lewis i wsp., 1998*].

Tabela 9. Charakterystyka ludzkich izoenzymów CYP2 [Tomaszewski i wsp., 2008]

Rodzina	Podrodzina	Izoenzym	Mcz (kDa)	L. aa	L. k	Lokalizacja tkankowa
CYP2	CYP2A	CYP2A6	56,0	494	ER	hepatocyty, komórki mięśniowe płuc, nabłonek gruczołu mlekowego, neurony mózgu
		CYP2A7	42,0	443	ER	hepatocyty
		CYP2A13	56,7	494	ER	hepatocyty, komórki mięśniowe płuc, jąder i prostaty; komórki nabłonkowe tchawicy, jamy nosowej, przewodu moczowego, macica, gruczoł mlekowy; neurony mózgu
	CYP2B	CYP2B6	56,3	491	ER	hepatocyty, komórki mięśniowe płuc, komórki nabłonkowe tchawicy, komórki śluzówki jelita cienkiego
	CYP2C	CYP2C8	55,8	490	ER	hepatocyty
		CYP2C9	55,6	490	ER	hepatocyty
		CYP2C18	55,6	490	ER	hepatocyty, komórki śluzówki języka i jelita cienkiego, komórki trzustki
		CYP2C19	55,9	490	ER	hepatocyty
	CYP2D	CYP2D6	55,8	497	ER	hepatocyty
	CYP2E	CYP2E1	56,0	493	ER	hepatocyty, komórki mięśniowe nerek, płuc, jąder, jajników, śledziona, trzustka, miocyty, kardiomiocyty
	CYP2F	CYP2F1	55,5	491	ER	komórki mięśniowe i nabłonkowe płuc
	CYP2J	CYP2J2	57,7	502	ER	kardiomiocyty, śluzówka jelita, komórki mięśniowe nerek, hepatocyty
	CYP2R	CYP2R1	57,3	501	ER	neurony, śluzówka jamy ustnej i żołądka
	CYP2S	CYP2S1	58,0	504	ER	śluzówka jelita cienkiego i żołądka, komórki nabłonkowe tchawicy, komórki mięśniowe śledziony i płuc
	CYP2U	CYP2U1	62,0	544	ER	mózdzek, grasica, przytarczyca, komórki naskórka
CYP2W	CYP2W1	53,8	490	ER	płuca, rdzeń nadnercza, komórki śluzówki przełyku i żołądka	

Mcz- masa cząsteczkowa; L.aa- liczba aminokwasów; L.k- lokalizacja komórkowa;
ER- błony retikulum endoplazmatycznego

1.4.4.1. Udział CYP2E1 w metabolizmie ksenobiotyków

CYP2E1 jest jedyną izoformą w podrodzynie CYP2E, opisywaną głównie ze względu na udział w systemie MEOS (ang. *microsomal ethanol-oxidizing system*) stanowiącym alternatywną dla dehydrogenazy alkoholowej drogę utleniania etanolu. Po raz pierwszy izoforma ta została wyizolowana i oczyszczona z organizmu królika a następnie opisana u wielu gatunków, w tym szczura, myszy, chomika i człowieka oraz uznana za wysoce konserwatywną ewolucyjnie [Raucy i wsp. 1989; Nelson i wsp., 1996; Badyal i Dadhich, 2001]. Ludzki gen *CYP2E1* położony jest na długim ramieniu chromosomu 10 w prążku 10q24.3. Zawiera on 9 eksonów i 8 intronów obejmujących 11413bp genomowego DNA. U człowieka, szczura i myszy wykazano obecność jednego genu podrodziny CYP2E, przy czym u królika funkcjonują 2 geny. Gen *CYP2E1* koduje związane z błoną białko zbudowane z 493 aminokwasów o łącznej masie cząsteczkowej około 57 kDa. Enzym ulega konstytutywnej ekspresji w wątrobie, gdzie stanowi on w zależności od źródła około 7-15% całkowitej zawartości enzymów CYP. Poza tym zaobserwowano występowanie znacznych ilości tej izoformy w większości organów, w tym w płucach, nabłonku jelita, mózgu i nerkach [Cederbaum, 2006]. W gronkach wątrobowych poziom CYP2E1 jest wyższy w centralnej części zrazika. CYP2E1 ulega ekspresji głównie w hepatocytach, ale znaczne ilości występują również w komórkach Kupffera, przy czym obie te formy są indukowane przez np. etanol. CYP2E1 jest zlokalizowany w błonach retikulum endoplazmatycznego, gdzie jest zakotwiczony i utrzymywany przez hydrofobową część terminalną NH₂. Domena karboksylowa zawierająca miejsce katalityczne znajduje się w cytozolu. CYP2E1 został wykryty również w innych strukturach komórki takich jak błona komórkowa, gdzie może pełnić rolę w hepatotoksyczności autoimmunizacyjnej obserwowanej u pacjentów cierpiących na alkoholową chorobę wątroby. Wykazano, że CYP2E1 jest transportowany na zewnątrz retikulum endoplazmatycznego do aparatu Golgiego a następnie do błony komórkowej. Usunięcie lub modyfikacja hydrofobowej NH₂-końcowej transbłonowej domeny białka CYP2E1 prowadzi do ujawnienia sygnału kierującego do mitochondriom. Sygnał lokalizacji mitochondrialnej na N-końcu białka CYP2E1 w wątrobie szczurzej został zidentyfikowany i opisany pomiędzy aminokwasem 74 a 95 w regionie bogatym w dodatnio naładowane aminokwasy i zawierającym region hydrofobowy.

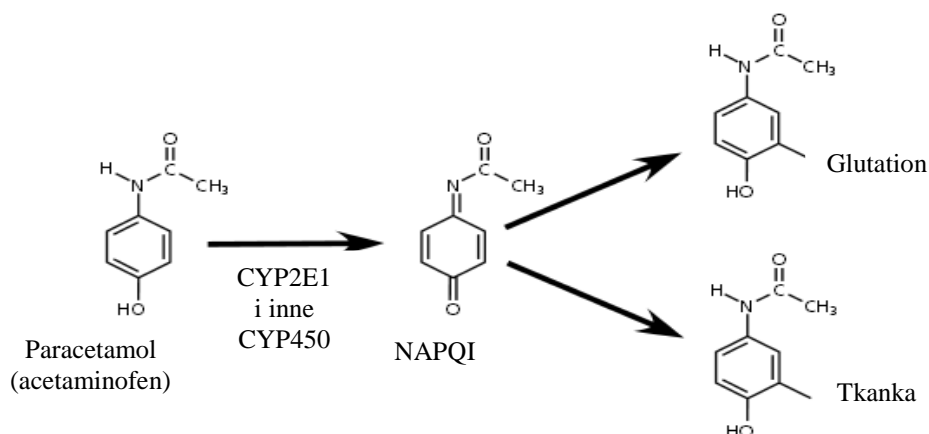
Izoenzym CYP2E1 metabolizuje wiele egzogennych, zróżnicowanych wielkościami, lipofilnych substratów, w tym nitrozaminy (N,N-dimetylonitrozamina), rozpuszczalniki organiczne (aceton, acetonitryl, chloroform, czterochlorek węgla), węglowodory aromatyczne

(benzen, toluen), alkohole (etanol, pentanol) i aldehydy (acetaldehyd). Niskocząsteczkowe związki aktywowane przez CYP2E1 wykazują właściwości prokancerogenne i hepatotoksyczne (Tabela 10.). Enzym CYP2E1 zaangażowany jest również w metabolizm niewielkiej grupy leków, w tym paracetamolu (acetaminofenu), izoniazydu, 7-etoksykumaryny, chlorzoksazonu i anestetyków wziewnych, takich jak halotan i sewofluran [Raucy i wsp. 1989; Guengerich, 1995; Lieber, 1997].

Tabela 10. Efekt toksykologiczny przykładowych substratów CYP2E1

Substrat	Efekt toksykologiczny	Autor
1. Leki		
Acetaminofen	Hepatotoksyczny Nefrotoksyczny	<i>Patten i wsp.</i> , 1993
Chlorzoksazon	Brak danych	<i>Fujita i Kamataki</i> , 2001
Izoniazyd	Hepatotoksyczny	<i>Koop</i> , 1992
2. Anestetyki wziewne		
Halotan	Hepatotoksyczny	<i>Njoku i wsp.</i> , 1997
Izofluran	Hepatotoksyczny	
Enfluran	Hepatotoksyczny	
3. Alkohole		
Etanol	Hepatotoksyczny	<i>Lieber</i> , 1994
Metanol	Hepatotoksyczny	<i>Koop</i> , 1992
Glicerol	Hepatotoksyczny	<i>Winters i wsp.</i> , 1988
4. Rozpuszczalniki organiczne		
Styren	Kancerogeny	<i>Leavens i wsp.</i> , 1997
Benzen	Hepatotoksyczny	<i>Kim i Kim</i> , 1996
Czterochlorek węgla	Hepatotoksyczny	<i>Wong i wsp.</i> , 1998
Chloroform	Hepatotoksyczny	<i>Nakajima i wsp.</i> , 1995
Trichloroetylen	Nefrotoksyczny/rak płuc	<i>Lipscomb i wsp.</i> , 1997
5. Nitrozaminy		
N,N dimetylonitrozamina	Hepatotoksyczny Kancerogeny	<i>Lin i Hollenberg</i> , 2001
N,N dietylonitrozamina	Hepatotoksyczny Kancerogeny	<i>Koop</i> , 1992

Bioaktywacja paracetamolu przez CYP2E1 przebiega w wyniku reakcji N-hydroksylacji do N-acetylo-p-benzochinonoiminy (NAPQI), która ulega detoksyfikacji na drodze sprzęgania z glutationem. NAPQI wykazuje wysoki stopień hepatotoksyczności i może wiązać się kowalencyjnie przez grupy tiolowe do makrocząsteczek a przez to prowadzić do martwicy hepatocytów. Toksyczny efekt biotransformacji ma miejsce w przypadku przyjmowania wysokich dawek leku lub nasilenia aktywności CYP2E1 w wyniku indukcji. Metaboliczną aktywację paracetamolu przedstawiono na Rycinie 5.



Rycina 5. Metaboliczna aktywacja paracetamolu

Lekiem modelowym, stosowanym do oznaczania aktywności CYP2E1 jest chlorzoksazon. Ponadto enzym ten jest związany, obok CYP1A2, z aktywacją DTIC [Reid *i wsp.*, 1999]. CYP2E1 ma istotne znaczenie w hepatotoksyczności etanolu a także innych ksenobiotyków, gdyż produkty jego metabolizmu cechują się wysoką reaktywnością chemiczną. Ma również zdolność generowania reaktywnych form tlenu wywołujących komórkowy stres oksydacyjny. Typy katalizowanych przez CYP2E1 reakcji zamieszczono w Tabeli 11.

Tabela 11. Typy katalizowanych przez CYP2E1 reakcji na przykładzie wybranych substratów [Lewis *i wsp.*, 2000]

Substrat	Katalizowana reakcja	Autor
Chlorzoksazon	6-hydroksylacja	<i>Dreisbach i wsp.</i> , 1995
4-Nitrofenol	2-hydroksylacja	<i>Tassaneeyakul i wsp.</i> , 1993
Paracetamol	N-hydroksylacja	<i>Koop</i> , 1992
Anilina	4-hydroksylacja	<i>Koop i Coon</i> , 1986
Etanol	C α -hydroksylacja	<i>Koop</i> , 1992
Dietylonitrozamina	N-deetylacja	<i>Gervasi i wsp.</i> , 1991

Wiele związków heterocyklicznych takich jak imidazol, pirydyna, pirazol, 4-metylopirazol, tiazol i izoniazyd podnosi poziom CYP2E1, podobnie jak rozpuszczalniki: dwumetylosulfotlenek, benzen i aceton. Indukcja tego izoenzymu przebiega w odróżnieniu od pozostałych enzymów na drodze złożonego mechanizmu, w którym dominującą rolę wydaje się mieć stabilizacja białka. Profil substratów CYP2E1 obejmuje również czynniki endogenne, co wskazuje na istotną fizjologiczną funkcję tego izoenzymu. Izoforma CYP2E1 jest określana powszechnie mianem monooksygenazy acetonu lub monooksygenazy acetolu. Udział tego enzymu w metabolizmie acetonu do acetolu i metyloglioksalu potwierdzają

obserwacje wzrostu poziomu acetonu we krwi transgenicznych myszy pozbawionych CYP2E1 w porównaniu do zwierząt typu dzikiego. Inne związki endogenne to kwasy tłuszczowe: linolenowy i arachidonowy. Wykazano, że przeciwciała anti-CYP2E1 IgG hamują mikrosomalną aktywność oksydacyjną i peroksydację lipidów zależną od CYP450 [Cederbaum, 2006].

1.5. Typy interakcji międzylekowych na poziomie cytochromu P450

Konstrytuwna ekspresja izoform cytochromu P450 często ulega zmianom pod wpływem zróżnicowanych czynników, w tym środowiskowych, oddziałujących w sposób pośredni lub bezpośredni. Zjawisko to leży u podłoża interakcji typu preparat roślinny-lek syntetyczny, dotyczy zmian w aktywacji leków i prokancerogenów oraz detoksyfikacji na etapie I fazy biotransformacji. Zróżnicowany przebieg i tempo metabolizmu wybranych leków i substancji chemicznych jest rezultatem pobudzenia lub hamowania przemian zależnych od tych izoform, co wiąże się z konsekwencjami w efekcie terapeutycznym [Vesel, 1988; Pelkonen i wsp., 1998; Badyal i Dadhich, 2001]. Ponadto potencjalny udział enzymów P450 w tworzeniu toksycznych metabolitów stał się przedmiotem wielu badań z zakresu bezpieczeństwa leków stosowanych w terapii i chemicznych zanieczyszczeń środowiska [Vesel, 1988]. Wykorzystanie narzędzi biologii molekularnej w celach wyjaśnienia mechanizmów regulacji ekspresji enzymów oraz typowania induktorów i inhibitorów poszczególnych izoenzymów stwarza możliwość przewidywania potencjalnych interakcji. Ponadto inhibitory wykorzystywane są powszechnie w pracach nad badaniem specyfiki substratowej dla aktywności izoform cytochromu P450, w tym udziału poszczególnych enzymów w metabolizmie leków w mikrosomach wątroby. Na etapie metabolizmu wątrobowego obserwuje się dwa rodzaje interakcji dotyczące enzymów biotransformujących leki - indukcję i inhibicję, przy czym najbardziej znane są interakcje dotyczące izoenzymu CYP3A4 odpowiedzialnego za biokonwersję większości leków. Indukcja enzymu prowadzi do zwiększenia produkcji jego białka zwykle po co najmniej trzech dniach od ekspozycji na induktor [Tredger i Stoll., 2002]. Induktory określonych izoform często są przez nie metabolizowane przez co nasilają własny metabolizm powodując autoindukcję. Ponadto mogą również wpływać na przemiany innych substratów tego samego izoenzymu [Tredger i Stoll., 2002]. Indukcja wiąże się zwykle ze wzrostem syntezy enzymów przez stymulację transkrypcji oraz translacji białka i przebiega z udziałem specyficznych receptorów, wśród których wyróżnia się m.in. AhR, CAR i PXR wiążące określone klasy

induktorów [Waxman, 1999]. Ponadto opisuje się funkcjonowanie mechanizmów takich jak stabilizacja transkryptu i proteiny. Hamowanie enzymu jest zwykle rezultatem kompetycji pomiędzy lekami, ich metabolitami oraz innymi czynnikami endogennymi i ksenobiotykami będącymi substratami tej samej izoformy cytochromu P450 o miejsce aktywne enzymu w warunkach ich jednoczesnego występowania w organizmie [Tomaszewski i wsp., 2008]. Przykładem jest CYP3A, gdzie rozróżnia się kompetycję prostą pomiędzy dwoma substratami jednej izoformy o wiązanie do miejsca aktywnego, która jest odwracalna i krótkotrwała; kompetycję między lekiem a metabolitem drugiego leku o miejsce wiązania substratu - odwracalną, polegającą na wiązaniu metabolitu z hemem i hamowaniu aktywności enzymu oraz nieodwracalny wpływ reaktywnego metabolitu leku, co hamuje metabolizm innych substratów, określaną jako inhibicja samobójcza, czego przykładem jest metoksalen z CYP1A2 [Tredger i Stoll, 2002]. W sytuacji, gdy dwa leki są substratami tej samej izoformy metabolizm jednego lub obu może być osłabiony, czego przykładem jest erytromycyna i midazolam konkurujące o miejsce aktywne izoformy CYP3A4 w konsekwencji czego ma miejsce hamowanie metabolizmu midazolamu. Cymetydyna i antybiotyki makrolidowe bezpośrednio tworzą kompleksy z grupą hemową izoenzymów CYP. Cymetydyna jest niespecyficznym inhibitorem enzymów CYP450. Odwracalna inhibicja może być kompetytywna lub niekompetytywna. Większość selektywnych inhibitorów CYP np. leki będące substratami określonych izoform CYP przekształcane do form reaktywnych kowalencyjnie wiążą izoenzymy CYP prowadząc do ich inaktywacji. Ten typ hamowania określany jest jako nieodwracalny lub mechanizm podstawowy [Murray, 1992; Badyal i Dadhich, 2001].

1.5.1. Interakcje na poziomie CYP1A2

Izoenzym CYP1A2 jest przedmiotem wielu modyfikacji poprzez oddziaływanie odwracanych i nieodwracalnych inhibitorów jego aktywności, w tym zarówno czynników syntetycznych jak i związków naturalnych. CYP1A2 jest główną izoformą cytochromu P450 odpowiedzialną za metabolizm kofeiny podawanej w dawce terapeutycznej. Fakt ten jest wykorzystywany podczas badań z zakresu farmakokinetyki, gdzie kofeina, podobnie jak teofilina oraz fenacetyna są stosowane jako modelowe substraty w oznaczaniu aktywności tego enzymu [Zhou i wsp., 2010]. Zaobserwowano, że możliwe jest występowanie interakcji farmakokinetycznych na poziomie zmiany aktywności CYP1A2. Przykłady inhibitorów i induktorów aktywności izoformy CYP1A2 zestawiono w Tabeli 12.

Tabela 12. Przykłady inhibitorów i induktorów aktywności CYP1A2

Inhibitor	Autor	Induktor	Autor
Amiodaron	<i>Yamreudeewong i wsp.</i> , 2003	β -naftoflawon	<i>Yokouchi i wsp.</i> , 2007
Amitryptylina	<i>Daniel i wsp.</i> , 2001	Dym tytoniowy	<i>Hersh i Moore</i> , 2004
Ciprofloksacyna	<i>Hersh i Moore</i> , 2004	Fenobarbital	<i>Sakuma i wsp.</i> , 1999
Cymetydyna	<i>Martinez i wsp.</i> , 1999	Fenytoina	<i>McKinnon i Evans</i> , 2000
Dezypiramina	<i>Daniel i wsp.</i> , 2003	Karbamazepina	<i>Magnusson</i> , 2008
Enoksacyna	<i>Hersh i Moore</i> , 2004	Lansoprazol	<i>Curi-Pedrosa i wsp.</i> , 1994
Erytromycyna	<i>McKinnon i Evans</i> , 2000	Metylocholanteren	<i>McKinnon i Evans</i> , 2000
Flawonoidy soku grejpfrutowego	<i>McKinnon i Evans</i> , 2000	Mięso grillowane (PAH)	<i>Hersh i Moore</i> , 2004
Fluoksetyna	<i>Jeppesen i wsp.</i> , 1996	Modafinil	<i>Robertson i Hellriegel</i> , 2003
Fluwoksamina	<i>Hersh i Moore</i> , 2004	Omeprazol	<i>Yoshinari i wsp.</i> , 2008
Furafilina	<i>Pelkonen i wsp.</i> , 1998	Pantoprazol	<i>Masubuchi i Okazaki</i> , 1998
Imipramina	<i>Daniel i wsp.</i> , 2001	Ryfampicyna	<i>Hersh i Moore</i> , 2004
Interferon	<i>Chen i wsp.</i> , 2011	TCDD	<i>French i wsp.</i> , 2004
Izoniazyd	<i>Zhou i wsp.</i> , 2010	Warzywa z rodziny krzyżowych	<i>Hakooz i Hamdan</i> , 2007
Klomipramina	<i>Daniel i wsp.</i> , 2003		
Ofloksacyna	<i>Fuhr i wsp.</i> , 1990		
Paroksetyna	<i>Jeppesen i wsp.</i> , 1996		
Sertralina	<i>Daniel i wsp.</i> , 2003		
Trans-resweratrol	<i>Chang i wsp.</i> , 2001		
Verapamil	<i>Fuhr i wsp.</i> , 1992		
Zilueton	<i>Zhou i wsp.</i> , 2010		

Wykazano, że hamowanie CYP1A2 może powodować wzrost stężenia substratów tego izoenzymu we krwi i w konsekwencji generować działania niepożądane, w tym również zatrucie kofeiną. Spośród inhibitorów na szczególną uwagę zasługuje substrat CYP1A2 - fluwoksamina, gdyż ma ona analogiczny wpływ na izoformy, takie jak: CYP3A4, CYP2C9 i CYP2C19 a więc może zmieniać inne szlaki metaboliczne. Wśród najistotniejszych selektywnych inhibitorów wychwytu serotoniny (SSRI) wymienia się: imipraminę, klomipraminę, dezypiraminę oraz sertralinę. Natomiast fluoksetyna i paroksetyna wykazują słaby hamujący wpływ na ludzki CYP1A2 obserwowany w mikrosomach wątroby. Jednak wpływ środków antydepresyjnych jest w przybliżeniu dziesięciokrotnie słabszy u szczurów w porównaniu do człowieka, co wskazuje na różnicowanie międzygatunkowe w strukturze i funkcji CYP1A2. Niektóre neuroleptyczne fenotiazyny w badaniach *in vitro* na szczurzych mikrosomach hamują CYP1A2 na drodze mechanizmu kompetytywnego lub mieszanego podobnie jak antydepresanty u szczura, przy czym najsilniejszym inhibitorem jest promazyna. Natomiast w przeciwieństwie do niej, nietypowy neuroleptyk - risperidon i sertindol nie wpływają na procesy utleniania kofeiny w szczurzych mikrosomach wątroby

[Goshman i wsp., 1999]. Wśród leków hamujących CYP1A2 wymieniane są: cymetydyna, ciprofloksacyna, izoniazyd, erytromycyna i doustne środki antykoncepcyjne. Ciprofloksacyna, furafilina i fluwoksamina opisywane są jako inhibitory odwracalne [Zhou i wsp., 2010]. Hamujący wpływ na izoformę CYP1A2 mają również flawonoidy zawarte w soku grejpfrutowym [McKinnon i Evans, 2000; Foti i Wahlstrom, 2008]. Sugeruje się, że potencjalnymi inhibitorami CYP1A1 i CYP1A2 są: metoksalen, bergapten i psoralen [Yang i wsp., 1992]. Spadek aktywności CYP1A2 może również nastąpić pod wpływem działania syntetycznych dodatków do żywności - waniliny i etylowaniliny [Chen i wsp., 2012]. Przykłady interakcji z udziałem CYP1A2 przedstawiono w Tabeli 13.

Tabela 13. Interakcje z udziałem CYP1A2 [Badyal i Dadhich, 2001; Zhou i wsp., 2010]

CYP1A2	Substrat podlegający modyfikacji metabolizmu
Inhibitor	
Fluwoksamina	Alprazolam, antypiryna, bromazepam, diazepam, imipramina, karbamazepina, klomipramina, klozapina, kofeina, melatonina, metadon, propranolol, tauryna, teofilina, tizanidyna, warfaryna
Fluoksetyna	Dezipramina, klozapina, 7-etoksyrezorufina
Ciprofloksacyna	Antypiryna, klozapina, kofeina, teofilina
Sok grejpfrutowy	Kofeina
Cymetydyna	Teofilina, warfaryna
Werapamil, diltiazem	Antypiryna, teofilina
Estradiol, lewonorgestrel	Takryna
Omeprazol	Teofilina
Induktor	
Dym tytoniowy	Fluwoksamina, klozapina, kofeina, lidokaina, melatonina, riluzol, teofilina, werapamil

Badania genetyczne na zwierzętach doświadczalnych wykazały, że obie izoformy CYP1A mogą ulegać silnej indukcji pod wpływem zróżnicowanych czynników zarówno na poziomie mRNA jak i białka [Zhou i wsp., 2010]. Stymulacja CYP1A2 przyczynia się do obniżenia skuteczności leków będących substratami tego enzymu. Przykładem są zmiany w kierunku silnej indukcji CYP1A2 obserwowane w badaniach klinicznych u palaczy pod wpływem PAH zawartych w dymie tytoniowym [Tredger i Stoll, 2002; Zhou i wsp., 2010]. Indukcja CYP1A2 obniża poziom teofiliny u palaczy, którzy wymagają zwiększania jej dawek podczas terapii [Goshman i wsp., 1999]. Dane literaturowe wskazują na 50% wzrost klirensu teofiliny u młodych palaczy oraz 80% zwiększenie u uzależnionych osób starszych [Zhou i wsp., 2010]. U tych samych pacjentów ma miejsce redukcja skuteczności atypowych

neuroleptyków: klozapiny i olanzapiny. Etanol hamuje metabolizm kofeiny i jednocześnie może maskować indukcyjny wpływ palenia papierosów [Tredger i Stoll, 2002]. Efekt indukcji klirensu leków obserwowany jest też u dorosłych i dzieci biernie narażonych na ekspozycję. Wykazano również, że niektóre leki psychotropowe mogą modyfikować metabolizm kofeiny pośrednio poprzez wpływ na regulację cytochromu P450. Dwutygodniowe podawanie promazyny, perazyny, klozapiny lub risperidonu powoduje wzrost poziomu i aktywności CYP1A2 u szczurów. Ostatnie badania wpływu antydepresantów na metabolizm kofeiny wykazały, że chroniczne podawanie fluwoksetyny indukuje metabolizm kofeiny poprzez zwiększanie aktywności tylko enzymów z podrodziny CYP2C natomiast podawanie sertraliny i mitrazapiny wpływają na aktywność zarówno enzymów CYP2C jak i izoformy CYP1A2. Interakcje kofeiny zanotowano w powiązaniu z innymi lekami takimi jak leki przeciwgrzybiczne, leki sercowo-naczyniowe, antagoniści receptorów histaminowych H₂, metyloksantyny (furafilina, teofilina), niesteroidowe leki przeciwzapalne (paracetamol), doustne środki antykoncepcyjne i inhibitory pompy protonowej [Kot i Daniel, 2008]. Aktywność CYP1A2 nasilają leki takie jak: fenytoina, karbamazepina i omeprazol [McKinnon i Evans, 2000]. Inhibitory pompy protonowej (omeprazol i lansoprazol) indukują obie izoformy CYP1A w pierwotnych ludzkich hepatocytach jak również w ustalonych liniach komórkowych [Zhou i wsp., 2010], jednak zmian tych nie obserwuje się a pracach z zakresu badań klinicznych. Ponadto wykazano również, że kawa w większych ilościach może również indukować CYP1A2 u osób niepalących i nie stosujących doustnych środków antykoncepcyjnych [Zhou i wsp., 2010].

1.5.2. Interakcje na poziomie CYP2E1

Z punktu toksykologicznego zainteresowanie koncentruje się głównie wokół zdolności CYP2E1 do metabolizowania wybranych leków, w tym anestetyków wziewnych i acetaminofenu oraz etanolu. Ponadto izoenzym CYP2E1 pełni istotną funkcję w aktywacji związków prokancerogennych o niskiej masie molowej do ich kancerogennych metabolitów. Modyfikacje metabolizmu z udziałem CYP2E1 przez jego inhibitory i induktory mogą, w przypadku leków, prowadzić do zmiany parametrów farmakokinetycznych i zwiększenia ryzyka wystąpienia działań niepożądanych. Biorąc pod uwagę rodzaj substratów prokancerogennych aktywowanych metabolicznie przez ten enzym, można wnioskować, iż toksyczność wymienionych czynników nasila się po indukcji CYP2E1, np. poprzez przyjmowanie etanolu, a redukowana jest przez inhibitory CYP2E1. Wykazano, że

hamowanie CYP2E1 może prowadzić do redukcji genotoksyczności wielu ksenobiotyków będących jego substratami [Hammond i Fry, 1997].

W analizach interakcji CYP2E1 szczególne znaczenie ma jego substrat chlorzoksazon, który w wyniku reakcji hydroksylacji, przechodzi w 6-hydroksychlorzoksazon a ich wzajemny stosunek jest łatwo oznaczany we krwi i powszechnie stosowany do oceny przybliżonego poziomu aktywności CYP2E1 u człowieka [Cederbaum, 2006]. Wśród związków hamujących przemianę chlorzoksazonu a więc redukujących aktywność tej izoformy wymienia się disulfiram i izoniazyd. Indukcja CYP2E1 pod wpływem etanolu opisana została zarówno w badaniach na zwierzętach jak i u człowieka prowadząc do zwiększenia metabolicznego klirensu wybranych leków i wzrostu toksyczności substratów tej izoformy (acetaminofen, CCl₄) [Yang i wsp. 1992]. Przykłady inhibitorów i induktorów izoformy CYP2E1 zamieszczono w Tabeli 14.

Tabela 14. Przykłady inhibitorów i induktorów aktywności CYP2E1

Inhibitor	Autor	Induktor	Autor
3-amino-1,2,4-triazol	Rendic, 2002	Aceton	Iba i wsp., 1993
Chlorometiazol	Gebhardt i wsp., 1997	Etanol	Badyal i Dadhich, 2001
Cymetydyna	Ohashi i wsp., 1993	Fenobarbital	Madan i wsp., 2003
Dietylotiotiokarbaminian	Guengerich i wsp., 1991	Izoniazyd	Koop i wsp., 1985
Disulfiram	Kharasch i wsp., 1993	Pirazol	Winters i Cederbaum, 1992
Izotiocyjanian fenetylu	Nakajima i wsp., 2001	Ryfampicyna	Madan i wsp., 2003
4-metylopirazol	Lejus i wsp., 2002		
Propofol	Samela i wsp., 1998		
Siarczyk diallilu	Brady i wsp., 1991b		

Ze względu na fakt, iż CYP2E1 jest związany z biotransformacją 5% dobowej dawki paracetamolu w kierunku tworzenia toksycznego N-acetylo-p-benzochinonu (NAPQI) sprzęganego z glutationem, indukcja tej izoformy nasila tempo tych przemian i stwarza ryzyko uszkodzenia wątroby [Raucy i wsp., 1989; Riordan i Williams, 2002]. Na przykładzie tego izoenzymu dowiedziono również, że interakcje mogą być zależne od czasu działania czynnika. Długotrwałe podawanie etanolu indukuje biotransformację paracetamolu przez CYP2E1 w kierunku zwiększenia tworzenia NAPQI [Tredger i Stoll., 2002]. W pewnych stężeniach etanol może również hamować aktywność CYP2E1 na drodze inhibicji kompetytywnej [Yang i wsp., 1992]. Etanol spożyty wkrótce po przedawkowaniu acetaminofenu może zachowywać się jak konkurencyjny inhibitor katalizowanej przez CYP2E1 reakcji utleniania acetaminofenu do toksycznego NAPQI. Wykazano również, że w obecności induktora enzymu CYP2E1, izoniazydu, zmianie ulega metabolizm sewofluranu,

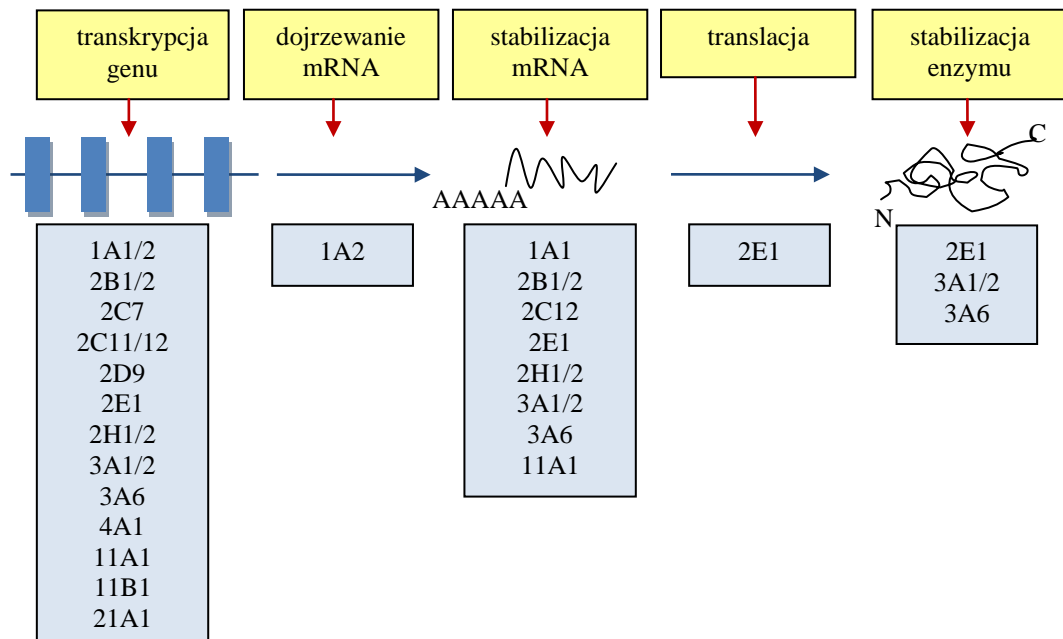
co prowadzi do stresu oksydacyjnego [Bezerra i wsp., 2010]. Jednocześnie indukcja izoformy CYP2E1 przez paracetamol lub etanol prowadzi do zwiększenia toksyczności wątrobowej tego leku. Postuluje się, że mechanizm inhibicji CYP2E1 przez 4-metylopirazol, 3-amino-1,2,4-triazol opierać się może na wiązaniu hemu, natomiast propofol jest uznawany za inhibitor kompetycyjny [Lewis i wsp., 2000].

Sugeruje się, że spośród składników aktywnych naturalnie występujących w surowcach roślinnych w interakcje na poziomie CYP2E1 są zaangażowane związki siarki. Podanie doustne siarczku diallilu (DAS) powoduje redukcję aktywności i poziomu białka CYP2E1 w szczurzych mikrosomach [Brady i wsp., 1991a]. Podobne obserwacje redukcji aktywności CYP2E1 pochodzą z badania *in vitro* z użyciem metabolitu DAS, sulfonu diallilu (DASO), które wskazały na efekt zależny od czasu inkubacji mikrosomów i stężenia. Na ich podstawie wyprowadzono hipotezę o konwersji sulfonu diallilu przez CYP2E1 do reaktywnej formy przejściowej modyfikującej grupę hemową tego izoenzymu [Brady i wsp. 1991b]. Izotiocyanian fenetylu należący do glukozynolatów szeroko występujących w warzywach z rodziny krzyżowych powoduje inaktywację CYP2E1 na drodze mechanizmu inhibicji samobójczej. Zarówno siarczki diallilu jak i izotiocyanian fenetylu zaliczono do kompetytywnych inhibitorów reakcji katalizowanych przez CYP2E1. Wśród ostatnich doniesień *in vivo* istnieją sugestie wskazujące na możliwość indukcji aktywności CYP2E1 pod wpływem popularnych dodatków do żywności, takich jak syntetyczne aromaty: wanilina i etylowanilina po tygodniowym okresie stosowania [Chen i wsp., 2012].

1.6. Regulacja ekspresji genów CYP450

Zmienność metabolizmu ksenobiotyków może wynikać z modyfikacji aktywności i ekspresji enzymów z nadrodziny cytochromu P450 w wyniku działania zróżnicowanych czynników na kolejnych etapach tworzenia proteiny. Modyfikacja może dotyczyć procesu transkrypcji określonych genów CYP450, tempa degradacji specyficznych mRNA, wydajności translacji i stabilizacji białka. Wiele czynników chemicznych będących jednocześnie substratami izoform cytochromu P450 oraz ich metabolitów ma zdolność wiązania enzymów CYP lub reduktazy NADPH:P450 hamując lub nasilając aktywność tego systemu poprzez interakcje między enzymami lub wpływ na kluczowe etapy cyklu katalitycznego [Yang i wsp., 1992]. Możliwość wpływu składników diety na aktywność monooksygenazy zależną od enzymów cytochromu P450 opisał w pionierskiej pracy

Wattenberg [1971]. Ogólny schemat mechanizmów regulacji ekspresji genów CYP450 przedstawiono na Rycinie 6.



Rycina 6. Zróżnicowanie mechanizmów regulacji ekspresji izoform CYP450 [wg Porter i Coon, 2009]

Wiele ksenobiotyków indukuje zmiany aktywności genów poprzez aktywację specyficznych czynników transkrypcyjnych będących wewnątrzkomórkowymi białkami receptorowymi. Powszechnym mechanizmem modulacji ekspresji izoform cytochromu P450 jest regulacja na poziomie transkrypcji genu zachodząca przez receptory PXR, CAR, AhR, receptor retinoidu X (RXR), receptor witaminy D (VDR), receptor kwasu retinowego (RAR) i GR [Honkakoski i Negishi, 2000; Pascussi i wsp. 2003]. Wykazano, że na poziomie transkrypcji rodzina CYP1 regulowana jest głównie poprzez heterodimer AhR z ARNT (ang. *aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*), podczas gdy ekspresja izoform z rodzin CYP2, 3 oraz 4 znajduje się pod kontrolą czynników transkrypcyjnych należących do receptorów jądrowych posiadających charakterystyczny motyw palca cynkowego, w tym CAR, PXR i PPAR [Waxmann, 1999]. Udział tych białek w indukcji ekspresji izoform cytochromu P450 został potwierdzony badaniami z zakresu inżynierii genetycznej z użyciem metod nokautu genów [Fujii-Kurijama i Mimura, 2005]. Indukcja bądź hamowanie ekspresji enzymów cytochromu P450 może modyfikować metabolizm a w konsekwencji klirens ksenobiotyku, co w zależności od jego rodzaju, może mieć pozytywne lub negatywne znaczenie dla funkcjonowania organizmu. Przykładem jest indukcja izoformy CYP1A przez β -naftoflawon redukująca działanie kancerogenne 7,12-dimetylobenzantracenu u gryzoni [Wattenberg i Leong, 1970; Martignoni i wsp., 2006]. Należy jednak zwrócić uwagę, iż

izoformy CYP1A mogą aktywować niektóre czynniki takie jak benzo[a]piren do ich reaktywnych szkodliwych metabolitów [Gelboin 1980; Martignoni i wsp., 2006]. Niektórzy autorzy podkreślają, iż podczas gdy indukcja wiąże się zwykle z syntezą nowych enzymów powodując zmniejszenie efektywności leków rozłożone w czasie, inhibicja enzymów CYP jest odpowiedzią bezpośrednią mogącą wywołać niepożądane podniesienie stężenia leków niosące konsekwencje toksykologiczne i terapeutyczne. Mechanizm inhibicji może mieć charakter odwracalny, który jest najczęściej występującą formą lub nieodwracalny (mechanizm podstawowy lub inhibitory samobójcze) prowadząc do tworzenia reaktywnych metabolitów i utraty aktywności enzymu przed syntezą nowych białek. Inhibitory mogą być substratami metabolizowanymi przez określony enzym P450 (np. ketokonazol dla CYP3A4) lub substancjami nie należącymi do grupy substratów [Martignoni i wsp., 2006]. Potranskrypcyjny mechanizm obejmuje stabilizację mRNA i białka lub ich degradację, co może wiązać się ze zmianami stanu fosforylacji enzymu. Poza tym wiele izoform ulega specyficznej tkankowo ekspresji w rezultacie tworząc zróżnicowany profil enzymów P450 w poszczególnych tkankach [Porter i Coon, 2009]. Ponadto międzyosobnicze zróżnicowanie aktywności metabolicznej może wynikać z polimorfizmu genetycznego i prowadzić do braku enzymu, utraty możliwości indukcji lub syntezy izoformy ze zmienioną aktywnością katalityczną. U człowieka wykazano, iż polimorfizm wykazują CYP2C9, CYP2C19, CYP1A1, CYP2B6, CYP2D6, CYP3A4 i CYP3A5 [Martignoni i wsp., 2006]. Konstytutywna ekspresja enzymów cytochromu P450 jest zależna od wewnątrzkomórkowego szlaku sygnałowego podlegającego wpływom czynników wzrostu, cytokin i endogennych hormonów. Molekularny mechanizm zaangażowany w ekspresję genów określonych izoform CYP podlega regulacji przez czynniki fizjologiczne i środowiskowe, w tym indukujące ich własną biokonwersję lub przemiany innych substancji [Vesel, 1988].

Czynniki mogące modyfikować ekspresję białek CYP i prowadzić do istotnych skutków w postaci interakcji międzylekowych wymieniono poniżej.

- Wiek - aktywność enzymów CYP spada wraz z wiekiem u obu płci, co wykazano poprzez obserwacje obniżenia metabolizmu antypiryny biotransformowanej przez m.in. CYP1A2 i CYP2E1, lidokainy, diazepam i teofiliny u osób starszych. *In vivo* aktywność CYP1A2, CYP3A4, CYP2C9 i CYP2D6 jest niska podczas narodzin, osiąga wartość maksymalną we wczesnym okresie dorosłości i maleje w podeszłym wieku [Tanaka, 1983; Sotanieui, 1997; Badyal i Dadhich, 2001].

- Płeć - kobiety wykazują wyższy podstawowy poziom aktywności CYP3A4 i większe nasilenie interakcji. Klirens diazepamu i prednizolonu jest wyższy u kobiet natomiast klirens propranololu u mężczyzn [Tanaka, 1983; Badyal i Dadhich, 2001].
- Hormony - niedobór testosteronu, obserwowany również w podeszłym wieku, obniża aktywność enzymów CYP. Wykazano, że estrogen redukuje procesy oksydacji niektórych leków, w tym imipraminy a doustne środki antykoncepcyjne (preparaty zawierające estrogen i progesteron) obniżają klirens diazepamu i chlordiazepoksydu. Fazy cyklu menstruacyjnego wykazują zmienny wpływ na aktywność CYP, klirens teofiliny jest obniżony w fazie lutealnej natomiast zwiększony metabolizm antypiryny zaobserwowano w okresie owulacji. Brak wpływu fazy cyklu na klirens zanotowano w przypadku paracetamolu, nitrazepamu, salicylanów i propranololu. Oś przysadka-wątroba wydaje się być istotnym regulatorem ekspresji CYP [Tanaka 1983; Kirkwood i wsp., 1991; Badyal i Dadhich, 2001].
- Polimorfizm genetyczny - każdy izoenzym jest produktem odrębnego genu a różnicowanie genetyczne zmienia ekspresję tych białek u poszczególnych organizmów i wpływa na różnice w metabolizmie zróżnicowanych leków. Polimorfizm genetyczny istotny klinicznie opisano dla CYP2D6, CYP2C19, CYP2C9 i CYP1A2. Te izoformy posiadają warianty alleliczne a ich częstość jest zwykle zróżnicowana w różnych populacjach. W przypadku 1A2 jedynie 3-4% rasy białej posiada genotyp wariant słabego metabolizera [Murray, 1992; Badyal i Dadhich, 2001]. Istotny klinicznie polimorfizm CYP1A2 stwierdzono głównie u Azjatów i Afrykańczyków, podczas gdy wśród mieszkańców Europy ma on mniejsze znaczenie. Wśród kilku odkrytych wariantów alleli genu kodującego izoformę CYP1A2, największe znaczenie ma warunkujący zmniejszenie aktywności enzymu allel CYP1A2*1C (G2964A), oraz allel CYP1A2*1F (C734A) związany ze zwiększeniem indukcji genu. W populacji kaukaskiej zaobserwowano niewielkie różnice międzyosobnicze w aktywności izoenzymu CYP1A2, przy czym kobiety wykazują mniejszą jego aktywność niż mężczyźni, a dominującym polimorfizmem jest obecność allelu CYP1A2*1F [Gawrońska-Szklarz, 2000]. U nosicieli mutacji warunkującej allel CYP1A2*1C leczonych teofiliną obserwuje się zwolnienie metabolizmu tego leku przejawiające się zwiększonym jego stężeniem w surowicy, oraz wzrost ryzyka działań niepożądanych, głównie tachykardii [Obase i wsp., 2003]. Badania polimorfizmu CYP1A2 z predyspozycją do wystąpienia chorób nowotworowych sugerują związek niskiej aktywności CYP1A2 z rakiem jądra

[Vistisen i wsp., 2004] i wskazują na zależność obecności alleli CYP1A2*1D (T-2467delT) i CYP1A2*1F i zwiększonego ryzyka wystąpienia raka trzustki [Li i wsp., 2006]. U człowieka opisano występowanie 10 polimorficznych loci genu *CYP2E1*, przy czym nie zaobserwowano znaczących różnic w predyspozycji do etanolu, nie wykazano związku pomiędzy formami allelicznymi genu *CYP2E1* a przypadkami wywołanej etanolem marskości wątroby a także różnic w ekspresji tego genu. W wielu badaniach epidemiologicznych podjęto próby określenia związku polimorficznych alleli *CYP2E1* z określonymi nowotworami (żołądka, płuc, odbytu, trzustki, wątroby, nerek i jamy ustnej) ale oczywisty i istotny związek był trudny do ustalenia [Cederbaum, 2006].

- Choroby wątroby - u pacjentów z marskością wątroby obserwuje się obniżoną ekspresję CYP1A2, CYP2E1 i CYP3A. Szczegółowa wiedza na temat wpływu chorób na izoenzymy może pozwolić na racjonalne projektowanie terapii.
- Stany zapalne - czynniki ostrej odpowiedzi na stan zapalny hamują aktywność CYP u człowieka, co może prowadzić do nieprawidłowo wysokich stężeń w osoczu i wzrostu toksyczności leków metabolizowanych przez te izoformy [Badyal i Dadhich, 2001]. Infekcje i stany zapalne mogą prowadzić do ograniczenia tempa metabolizmu substancji obcych, w tym leków. W znacznym stopniu ma to związek z obniżeniem poziomu i aktywności enzymów CYP w wątrobie, co potwierdzono w badaniach wpływu chorób infekcyjnych i substancji zapalnych *in vivo* i *in vitro* [Morgan, 1997; Renton, 2001]. Istnieją wyniki badań wskazujące na fakt, iż w redukcji CYP2E1 wywołanej przez stany zapalne pośredniczą cytokiny i złożony mechanizm regulacji, w tym czynnik transkrypcyjny HNF-1 zaangażowany w konstytutywną ekspresję genu [Hakkola i wsp., 2003].
- Dieta - wykazano, że otyłość powoduje nasilenie metabolizmu enfluranu i sewofluranu u człowieka [Badyal i Dadhich, 2001]. Enzym CYP2E1 może być indukowany w zróżnicowanych warunkach metabolicznych i żywieniowych, np. u otyłych szczurów i szczurów karmionych dietą wysokotłuszczową. Poziom CYP2E1 u szczurów wzrasta w wyniku głodzenia natomiast cukrzyca powoduje kilkukrotny wzrost mRNA i białka CYP2E1, co może być związane z aktywnością insuliny obniżającej ekspresję CYP2E1. Indukcja CYP2E1 u cukrzyków może wynikać ze zwiększonej produkcji ciał ketonowych. Wykazano, że w pierwotnych kulturach szczurzych hepatocytów glukagon obniżał poziom CYP2E1 poprzez przyspieszony obrót białka CYP2E1 w procesie zależnym od AMP.

- Palenie papierosów - powoduje indukcję enzymów CYP, zwiększa klirens fenacetyny i teofiliny.
- Cięża - może indukować enzymy CYP, w wyniku indukcji CYP2D6 obserwowano zwiększony metabolizm metoprololu [Wadelius i wsp. 1997; Badyal i Dadhich, 2001].

1.6.1. Regulacja ekspresji genów z rodziny CYP1A

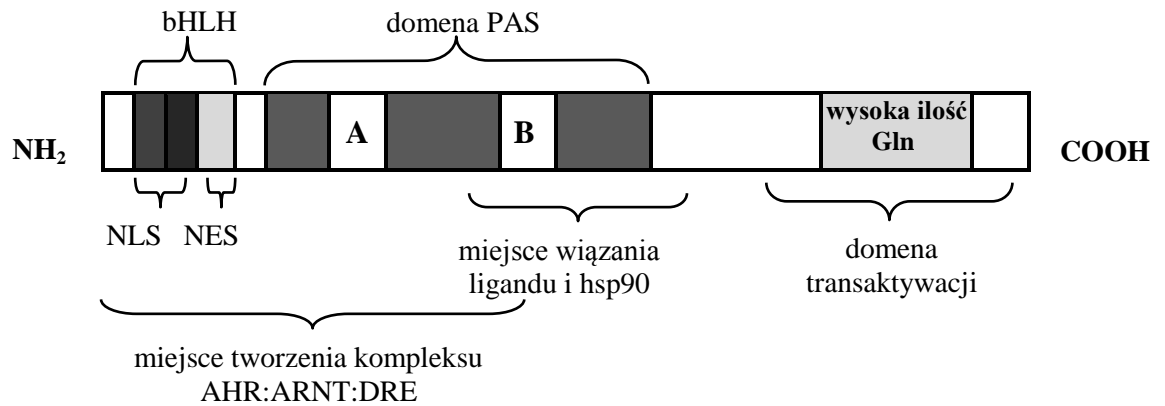
U podłoża indukcji izoform CYP1A znajduje się mechanizm transdukcji sygnału zależny od czynnika transkrypcyjnego AhR. Uznano, że nasilenie ekspresji izoenzymów z podrodzin CYP1A oraz CYP1B jest efektem poddania zwierząt laboratoryjnych działaniu agonistów czynnika AhR, przy czym stopień indukcji jest zwykle najwyższy dla CYP1A1 [French i wsp., 2004; Zhou i wsp., 2010]. Analiza elementów sekwencji DNA CYP1A2 zaangażowanych w regulację transkrypcji tej izoformy u człowieka wykazała występowanie w regionie 5' flankującym dwóch regionów zawierających specyficzne motywy sekwencji XRE i związanych z indukcją ekspresji enzymu pod wpływem m.in. 3-MC. Jeden z nich położony jest w pozycji -2532/-2423, a jego delecja prowadzi do zmniejszenia reakcji na induktor. Drugi region znajduje się w położeniu -2259/-1987, przy czym wykazano, iż nie jest on związany z czynnikiem AhR a może stanowić potencjalne miejsce oddziaływania z AP1. Ponadto zlokalizowana jest tam konserwatywna sekwencja TATA box. Sekwencja -2259/-1970 pełni funkcję eukariotycznego promotora. Na podstawie powyższej analizy twierdzić można, że sekwencje te związane są z kontrolą transkrypcji genu *AHR*, w tym z możliwością oddziaływania z czynnikiem AhR [Quattrochi i wsp., 1994].

Receptor węglowodorów aromatycznych AhR jest konserwatywnym białkiem funkcjonującym jako aktywowany ligandem czynnik transkrypcyjny u kręgowców, owadów i pierwotniaków, zaangażowany również w kontrolę cyklu komórkowego i apoptozę [Nebert i wsp., 2004]. AhR uczestniczy w regulacji ekspresji ludzkich izoform CYP1A1, CYP1A2 i CYP1B1 oraz niektórych genów enzymów II fazy metabolizmu leków [Quattrochi i wsp., 1994; Whitlock, 1999]. Pod kontrolą czynnika AhR znajdują się enzymy takie jak transferaza glutationu, dehydrogenaza aldehydowa, DT-diaforaza i UDP-glukuronylotransferaza, a także białka związane z proliferacją komórek (TGF- β , IL-1 β , PAI-2), regulacją cyklu komórkowego (p-27, jun-B) i apoptozą (Bax). Badania z wykorzystaniem mikromacierzy wskazują na szerszą grupę genów docelowych czynnika AhR [Nebert i wsp., 2000; Tijet i wsp., 2006]. Znane z silnej rakotwórczości ligandy AhR to głównie wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne i organiczne związki chemiczne z grupy dioksyn [Hankinson,

1995; Whitlock 1999]. Najważniejszym związkiem oddziałującym ze wspomnianym czynnikiem transkrypcyjnym jest TCDD (2,3,7,8-tetrachlorodibenzodiodksyna) będąc przyczyną różnorodnych toksycznych odpowiedzi u zwierząt i ludzi [French i wsp., 2004]. Receptor Ah wiąże również benzo[a]piren, dibenzoantracen, 3-MC, aflatoksyny i inne. Istnieją również doniesienia sugerujące aktywację szlaku sygnałowego AhR pod wpływem flawonoidów, karotenoidów i fenoli pomimo ich niewielkiego podobieństwa do ligandów tego czynnika [Denison i wsp., 2002]. W niektórych roślinach, w tym leczniczych, wykazano obecność agonistów/antagonistów czynnika AhR. Przykładem są flawon i diosmina będące potencjalnymi agonistami AhR wywołującymi indukcję aktywności CYP1A1, CYP1A2 i CYP1B1 [Hodek i wsp., 2002]. Wysoki konserwatyzm ewolucyjny wskazuje na ważną fizjologiczną rolę czynnika AhR w homeostazie i rozwoju organizmu. Na poparcie tej tezy wymienia się uznane za endogenne ligandy: tryptaminę, kwas indoliloctowy, bilirubinę i biliwerdynę oraz lipoksynę A4 posiadające niższe od egzogennych powinowactwo do izoenzymu [Fujii-Kuriyama i Mimura, 2005]. Zainicjowanie interakcji ligandów z miejscem wiązania czynnika AhR może być liniowo zależne od ich stężenia. Po związaniu liganda następuje wieloetapowy proces transdukcji sygnału [French i wsp., 2004].

Ludzki gen *AHR* zlokalizowany jest na 7 chromosomie i obejmuje 12 eksonów kodujących białko zbudowane z 848 aminokwasów o łącznej masie cząsteczkowej około 96 kDa [Hahn, 2002]. Białko AhR należy do dużej rodziny czynników transkrypcyjnych bHLH-PAS i charakteryzuje się występowaniem konserwatywnej domeny wiążącej DNA o strukturze helisa-pętla-helisa bHLH (ang. *basic helix-loop-helix*) na aminowym końcu białka oraz domeny PAS (ang. *Per-Arnt-Sim*) odpowiedzialnej za dimeryzację białka i zawierającej domenę wiążącą ligand (LBD) [Pongratz i wsp., 1998; Whitlock, 1999; Gu i wsp., 2000]. Ponadto zarówno bHLH jak i PAS są odpowiedzialne za oddziaływanie z hsp90 [Antonsson i wsp., 1995]. Na aminowym końcu białka zlokalizowany jest sygnał lokalizacji jądrowej (NLS) oraz sygnał exportu z jądra (NES) dzięki którym możliwe jest przemieszczanie białka pomiędzy cytoplazmą a jądrem komórkowym [Ikuta i wsp., 2000]. Sugeruje się również, że NLS jest konieczny do funkcjonowania szlaku czynnika AhR, gdyż mutacje w tej sekwencji wiążą się z uzyskaniem odporności na indukowaną TCDD toksyczność [Bunger i wsp., 2003]. W części karboksylowej białka zlokalizowana jest domena transaktywacji, w której znajduje się region bogaty w glutaminę (Q-rich) uczestniczący w oddziaływaniu AhR z koaktywatorami takimi jak RIP140 (ang. *receptor*

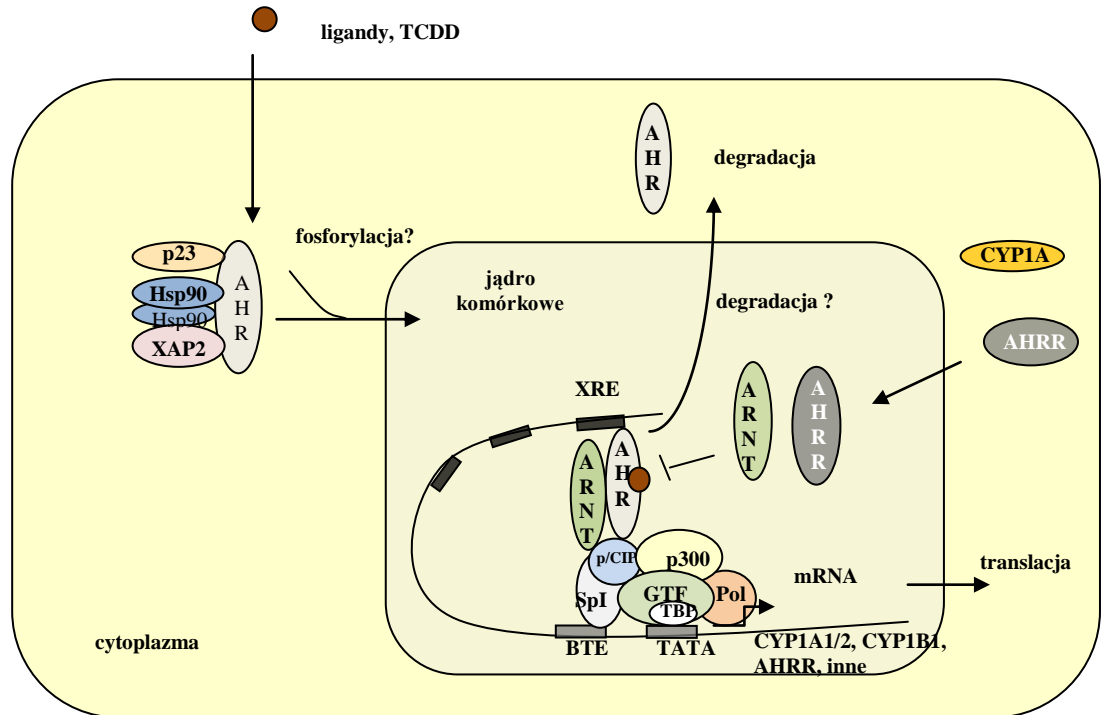
interacting protein 140) i SRC-1 (ang. *steroid receptor coactivator-1*) (Ryc. 7.) [Kumar i Perdew, 1999; Kumar i wsp., 1999].



Rycina 7. Struktura białka AhR [wg Denison i wsp., 2002]

Jako jedyny z tej rodziny wymaga związania liganda do jego aktywacji [Brunnberg i wsp., 2003]. W większości komórek AhR występuje na terenie cytoplazmy w formie nieaktywnej w kompleksie z białkami opiekuńczymi typu hsp90, białkiem fuzyjnym XAP2 i p23, które są zaangażowane w proces jego fałdowania i stabilizacji, zabezpieczają przed ubikwitynacją i proteosomalną degradacją [Gu i wsp., 2000; Vrzal, 2004]. Pojawienie się liganda i jego związanie do domeny PAS B powoduje dysocjację kompleksu i fosforylację receptora przez kinazę tyrozynową. Prowadzi to do zmian konformacyjnych AhR i uwidocznienia sygnału lokalizacji jądrowej NLS. W konsekwencji dochodzi do translokacji związanego z ligandem czynnika AhR do jądra komórkowego i utworzenia heterodimeru z białkami ARNT o łącznej masie cząsteczkowej około 180-220 kDa. Związanie heterodimeru do sekwencji odpowiedzi na ksenobiotyk-XRE określanego również mianem DRE (ang. *dioxin response element*) 5'-TNGCGTG-3' w rejonie 5' końcowym genów CYP1 prowadzi do aktywacji ich transkrypcji [Hankinson, 1995; Villard i wsp. 1998; Boutros i wsp. 2004; Fujii-Kuriyama i Mimura, 2005]. Sekwencje XRE występują w regionach promotorowych wszystkich genów indukowanych przez PAH lub HAH, w tym CYP1A1/2, CYP1B1, CYP2A8 i CYP19 i wykazują podobieństwo do elementów odpowiedzi na glukokortykoidy a AhR podobieństwo do receptora glukokortykoidowego [Fujii-Kuriyama i Mimura, 2005; Porter i Coon, 2009]. Oddziaływanie kompleksu z enhancerem wzmacnia sygnał indukcji transkrypcji w wyniku czego następuje uruchomienie aktywności polimerazy II RNA AhR/ARNT, synteza mRNA a następnie białka genów docelowych. Na Ryc. 8. przedstawiono schemat szlaku sygnałowego wraz z zarysem mechanizmu negatywnej

regulacji AhR przez represor (AhRR), który może hamować transdukcję sygnału na zasadzie kompetycji z AhR o wiązanie ARNT.



Rycina 8. Schemat szlaku sygnałowego czynnika AhR [Fujii-Kuriyama i Mimura, 2005; Pavek i Dvorak, 2008]

Powstały kompleks ARNT-AhRR oddziałuje z sekwencją XRE nie prowadząc jednak do aktywacji transkrypcji. Represor AhR jest indukowany przez AhR, co wskazuje na sprzężenie zwrotne w jego regulacji [Gu i wsp., 2000]. Najwyższe stężenie białka AhR i ARNT obserwuje się po 1-2 godzinach ekspozycji na TCDD po czym następuje proteosomalna degradacja czynnika transkrypcyjnego z udziałem proteosomu 26S [Vrzal i wsp., 2004] poprzedzona jego eksportem z jądra komórkowego i ubikwitynacją. Zależna od agonisty degradacja ma na celu ochronę komórki przed konsekwencjami długotrwałej ekspozycji na wysokie jego stężenia [Gu i wsp., 2000]. AhR oddziałuje również z wieloma innymi białkami, w tym czynnikami transkrypcyjnymi, korepresorami i koaktywatorami - SRC-1, NcoA i p160 które mogą wpływać na transkrypcję genów indukowanych obecnością TCDD [Beischlag i wsp., 2002; Hankinson, 2005]. Oddziaływanie z SMRT hamuje ekspresję genów zależnych od AhR [Rushing i Denison, 2002].

Pomimo, iż fizjologiczna rola czynnika AhR nie jest jasna, podkreśla się jego istotne znaczenie w rozwoju wątroby oraz w reprodukcji. Myszy z wyłączoną ekspresją genu *AHR* posiadają zmniejszoną i zwłóknioną wątrobę oraz obniżony poziom ekspresji CYP1A2

i oporność na indukowanie CYP1A1 przez TCDD. Zaobserwowano również obumieranie płodów mysich pozbawionych ARNT. Ponadto badania wykazały, że odpowiedź organizmu na TCDD, włączając teratogenezę, immunosupresję, defekty w reprodukcji i rozwój nowotworu wiążą się z funkcjonowaniem AhR [Gerhold i wsp., 2001].

Istnieją doniesienia sugerujące możliwość indukcji CYP1A2 na drodze mechanizmu niezależnego od receptora AhR. Uważa się, że β -naftoflawon i 3-MC mogą oddziaływać również z innym niż AhR receptorem cytoplazmatycznym o zbliżonej do niego sekwencji aminokwasowej lecz innej stałej sedimentacji [Brauze i Malejka-Giganti, 2000]. Postuluje się udział AhR w kontroli syntezy białka wiążącego β -naftoflawon oraz jego białka represorowego AhRR funkcjonującego w ujemnym sprzężeniu zwrotnym kształtującym efekty jego wiązania z ligandem [Kamiński i Wiaderkiewicz, 2008]. Ponadto uznaje się, że istnieje związek pomiędzy szlakiem sygnału AhR i receptorem estrogenowym (ER). Według niektórych autorów czynnik AhR może hamować aktywność ER na drodze mechanizmów takich jak: inhibicja pośrednia poprzez związanie heterodimeru AhR/ARNT do sekwencji hamującej iXRE (ang. *inhibitory XRE*) obecnej w genach docelowych ER, zmiany koaktywatorów - ARNT, synteza białka będącego inhibitorem, zwiększenie proteosomalnej degradacji ER lub inna droga syntezy i metabolizmu 17β -estradiolu poprzez nasilenie ekspresji aromatazy (CYP19), CYP1A1 i CYP1B1 [Safe i Wormke, 2003; Matthews i Gustafsson, 2006]. Ponadto AhR oddziałuje z białkiem Rb zaangażowanym w kontrolę cyklu komórkowego. Istnieją badania sugerujące, że u człowieka konstytutywna ekspresja CYP1A2 jest regulowana przez hepatocytowy czynnik transkrypcyjny HNF-1 [Chung i Bresnick, 1997]. Czynniki te mogą wiązać się do 5' sekwencji flankującej genu *CYP2E1* i kontrolować jego transkrypcję, choć jego rola w pozytywnej regulacji ekspresji wymaga dalszych badań. Biologiczne znaczenie indukcji genów z podrodziny CYP1A polega na utrzymaniu homeostazy środowiska komórki przez zwiększenie metabolicznego klirensu substratów tych enzymów. Ze względu na fakt, iż CYP1A1/2 może metabolizować szeroki zakres substratów, indukcja tych enzymów przez jeden z nich może zwiększyć metabolizm innych związków, w tym leków stosowanych klinicznie, a w rezultacie prowadzić do nieoczekiwanych interakcji międzylekowych.

Podstawy międzyosobniczego zróżnicowania ekspresji genu *CYP1A2* nie są w pełni poznane. Próby wyjaśnienia potencjalnej zależności aktywności CYP1A2 od stopnia metylacji DNA tego genu w wątrobie człowieka opierały się na założeniach, że stopień metylacji DNA obejmuje 17 wysp CpG położonych w pobliżu miejsca inicjacji translacji i wykazuje odwrotną korelację z poziomem mRNA genu *CYP1A2* w ludzkiej wątrobie.

Jednocześnie wykazano znaczne zwiększenie poziomu ekspresji genu *CYP1A2* w linii komórkowej pierwotnego raka wątroby B16A2 po inkubacji z chemicznym czynnikiem demetylującym 5-aza-2'-deoksytydyny, co potwierdza związek ekspresji tego genu ze stopniem metylacji DNA [Ghotbi i wsp., 2009]. Badania nad określeniem allelospecyficznej ekspresji *CYP1A2* wskazują, że wśród opisanych kilku wariantów alleli tego genu największe znaczenie ma *CYP1A2*1C* (G2964A) warunkujący redukcję aktywności enzymu i *CYP1A2*1F* (C734A) związany ze zwiększeniem indukcji genu. Klinicznie istotny polimorfizm *CYP1A2* stwierdzono głównie w populacjach azjatyckiej i afrykańskiej. Nie ma on większego znaczenia u Europejczyków. W populacji kaukaskiej zanotowano niewielkie międzyosobnicze zróżnicowanie w aktywności izoenzymu *CYP1A2* gdzie u kobiet opisano niższą jego aktywność niż u mężczyzn a dominującym polimorfizmem jest obecność allelu *CYP1A2*1F* [Gawrońska-Szklarz, 2000].

1.6.2. Regulacja ekspresji *CYP2E1*

Ekspresja izoformy *CYP2E1* jest regulowana wieloczynnikowo i zachodzi w sposób kompleksowy. U szczurów gen we wczesnym postnatalnym etapie rozwoju organizmu znajduje się pod kontrolą na etapie transkrypcji [Cederbaum, 2006]. Zaobserwowano, że aktywacja transkrypcji genu *CYP2E1* po urodzeniu jest związana z demetylacją cytozyny na 5' końcu genu co w konsekwencji prowadzi do akumulacji RNA po upływie miesiąca od narodzin [Jones i wsp., 1992]. Fakt ten jest poparty obserwacjami hipermetylacji genu *CYP2E1* w 5' regionie sekwencji. Wykazano, że ekspresja *CYP2E1* podlega zmianom w warunkach patofizjologicznych, takim jak jej indukcja w otyłości, cukrzycy, chorobie alkoholowej i przy niealkoholowym, tłuszczowemu zapaleniu wątroby [Caro i Cederbaum, 2004]. Zwiększony poziom *CYP2E1* jest też obserwowany u zwierząt przekarmionych, karmionych dietą wysokotłuszczową lub głodzonych. Istnieją również badania wskazujące na wpływ hormonów tarczycy, insuliny, leptyny i hormonu wzrostu w regulacji ekspresji *CYP2E1* [Ito i wsp., 2007]. Molekularne mechanizmy regulacji *CYP2E1* pozostają jednak słabo poznane. Uznaje się, że jest to złożony mechanizm obejmujący etap transkrypcji, oddziaływanie na mRNA, etap translacji i modyfikacje potranslacyjnie. Przypuszcza się, że w kontroli ekspresji genu najważniejsza jest stabilizacja mRNA i białka, a regulacja na etapie transkrypcji wydaje się mieć mniejsze znaczenie w przeciwieństwie do innych izoform. Poziom mRNA *CYP2E1* wzrasta kilkukrotnie w warunkach głodu i ketozy u cukrzyków, prawdopodobnie w wyniku potranskrypcyjnej stabilizacji mRNA [Cederbaum,

2006]. Na udział tego mechanizmu w indukcji CYP2E1 wskazują analizy w stanie głodzenia, gdzie podwyższonemu stężeniu mRNA tego genu nie towarzyszyła aktywacja transkrypcji [Yang i wsp., 1992]. Wykazano również, że etanol i imidazol zwiększają poziom białka CYP2E1 u szczura bez wpływu na stężenie mRNA tego genu, co potwierdza tezę potranskrypcyjnej stabilizacji białka i jego ochrony przed degradacją po etapie związania liganda [Eliasson i wsp., 1988; Eliasson i wsp., 1990; Yang i wsp., 1992; Cederbaum, 2006]. Jednak wyższe dawki etanolu mogą stymulować transkrypcję mRNA [Lieber, 1999]. Postuluje się także zwiększenie wydajności translacji pod wpływem izoniazydu [Park i wsp., 1993]. Badania analizujące znaczenie kompleksu proteosomu w obrocie CYP2E1 pod wpływem przewlekłego podawania etanolu na jego aktywność i zawartość, wykazały spadek aktywności proteosomu i redukcję szybkiej degradacji białka. Badania prowadzone z wykorzystaniem techniki znakowania radiologicznego białka CYP2E1 wykazały, że CYP2E1 ulega degradacji w dwóch fazach z krótkim czasem połowicznego rozpadu wynoszącym 7h i dłuższym czasem połowicznego rozpadu trwającym 37h. Po długotrwałej ekspozycji na aceton zanika szybka faza degradacji białka, natomiast wciąż obserwowana jest faza trwająca 37h. Dane te wskazują, że aceton - substrat CYP2E1, stabilizuje enzym poprzez hamowanie szybkiej fazy jego degradacji [Cederbaum, 2006]. Wyniki badań potwierdzają, iż głównym mechanizmem regulacji CYP2E1 wydaje się być etap potranskrypcyjny w którym zróżnicowane substraty i ligandy zwiększają zawartość CYP2E1 przez ochronę przed szybką degradacją prowadzoną przez wewnątrzkomórkowy szlak proteolityczny [Cederbaum, 2006].

Inny możliwy mechanizm regulacji izoform cytochromu P450, w tym CYP2E1, polega na tkankowo-specyficznej ekspresji tych białek z udziałem czynników transkrypcyjnych. Białka CYP-450 wykazują aktywność w zróżnicowanych hepatocytach, gdzie w ich konstytutywnej ekspresji mogą brać udział czynniki transkrypcyjne takie jak C/EBP, HNF4, HNF1, HNF3 i HNF6. Główna rola w tym zakresie wobec będących przedmiotem pracy izoform przypisywana jest hepatocytowemu czynnikowi jądrowemu HNF1 α , który prawdopodobnie stymuluje ekspresję CYP1A2 [Chung i Bresnick, 1997] i aktywuje ekspresję genu *CYP2E1* w szczurzych hepatocytach [Liu i Gonzales, 1995]. Sugeruje się, że miejsce wiązania czynnika HNF-1 α znajduje się powyżej sekwencji TATA box. Na jego udział w kontroli transkrypcji genu *CYP2E1* wskazują badania transkrypcji *in vitro*. Ponadto wiele cytokin, w tym IL-1 β , IL-6, TNF α i interferon γ obniżają poziom ekspresji CYP1A2, CYP2C, CYP2E1 i CYP3A, w odróżnieniu IL-4, która indukuje ludzki CYP2E1 w hepatocytach [Muntane-Relat i wsp. 1995; Pascussi i wsp., 2000].

1.7. Zwierzęce modele eksperymentalne w badaniach metabolizmu ksenobiotyków

W farmakologii eksperymentalnej konieczne jest poznanie molekularnego mechanizmu biotransformacji ksenobiotyków zwłaszcza w kierunku występowania reakcji niepożądanych, interakcji międzylekowych, ale również podczas rozpoczynania procesu rejestracji nowych preparatów leczniczych. Modele eksperymentalne wykorzystują głównie zwierzęce mikrosomy wątroby zawierające układ cytochromu P450 lub ludzkie rekombinowane enzymy ulegające ekspresji w wirusowym lub bakteryjnym systemie ekspresyjnym [Zuber i wsp., 2002]. Zmiany aktywności izoform cytochromu P450 mogą być przedstawiane na poziomie populacji komórek lub pojedynczych komórek odpowiednio w homogenatach komórek lub tkanek pochodzących od zwierząt doświadczalnych poddawanych analizie. Metody opisywania indukcji izoform cytochromu P-450 w homogenatach i indywidualnych komórkach mogą być zbliżone, jeśli odpowiedź na poziomie poszczególnych komórek jest zbliżona do odpowiedzi na poziomie populacji, np. 50% maksymalnej indukcji w całej wątrobie powinno opisywać 50% indukcję w każdej poddanej działaniu czynnika komórce. Jednak odpowiedzi na czynnik w badaniach populacji komórek *in vivo* i pojedynczych komórek są bardzo odmienne [French i wsp., 2004].

Dla pełnego poznania farmakologiczno-toksykologicznych właściwości analizowanych preparatów prowadzone są intensywnie badania z udziałem zwierząt eksperymentalnych przed podaniem ich człowiekowi. Chociaż zasadność badań na zwierzętach w określaniu efektywności i bezpieczeństwa u człowieka bywa kwestionowana, uważa się z reguły że dane farmakokinetyczne mogą być ekstrapolowane na człowieka [Martignoni i wsp., 2006]. Gryzonię w badaniach biologii molekularnej wykorzystywane są ze względu na ich krótki okres życia, wzrost dużej liczby zwierząt w krótkim okresie czasu i możliwość zrealizowania wielu badań. Zwierzęta eksperymentalne stanowią genotypowo i fenotypowo stosunkowo jednorodną populację nie wykazując znacznych różnic w aktywności badanych izoform. Istnieją natomiast inne racjonalne przesłanki wskazujące na zasadność prowadzenia eksperymentów dotyczących metabolizmu ksenobiotyków z udziałem zwierząt modelowych (szczur). Cytochromy P450 wyizolowane od szczura były jednymi z pierwszych opisanych, przy czym jednym z najstarszych enzymów CYP u tego organizmu jest izoforma CYP1A2 uznawana za wysoce konserwatywną międzygatunkowo, katalizująca reakcję przemiany struktur aromatycznych, głównie aromatycznych amin, policyklicznych aromatycznych węglowodorów i innych płaskich struktur i indukowana przez policykliczne węglowodory aromatyczne takie jak 3-MC lub przez polichlorowane bifenyle. Podobne

wnioski dotyczą CYP2E1, który u wszystkich gatunków jest indukowany przez etanol, aceton i metabolizuje rozpuszczalniki organiczne, nitrozaminy i niektóre leki - paracetamol [Zuber i wsp., 2002].

1.8. Przegląd właściwości farmakologicznych wykorzystanych w pracy badawczej surowców roślinnych

1.8.1. Jeżówka purpurowa

Preparaty *E. purpurea* znajdują się na drugim miejscu co do wielkości sprzedaży wśród produktów zielarskich dostępnych bez recepty i są wykorzystywane w fitoterapii chorób infekcyjnych, przeziębieniach, kaszlu, zapaleniach oskrzeli, grypie, zapaleniu jamy ustnej i gardła. Jest to jeden z najczęściej wykorzystywanych środków leczniczych u dorosłych i dzieci a jego stosowanie deklaruje 10–20% konsumentów ziół. Popularne są trzy gatunki tej rośliny *E. purpurea*, *E. angustifolia* i *E. pallida*, lecz tylko nadziemne części *E. purpurea* i korzenie *E. pallida* zostały zatwierdzone do stosowania wewnętrznego przez niemiecką Komisję E [Gorski i wsp., 2004]. Jeżówka purpurowa, określana również mianem rotacznicy, to wieloletnia bylina należąca do rodziny *Asteraceae*, dawniej *Compositae*. Surowcami stosowanymi powszechnie w lecznictwie są ziele i korzeń jeżówki - *Herba et Radix Echinacea purpurea*. Zbierane w okresie kwitnienia w drugim i trzecim roku uprawy ziele służy w stanie świeżym do produkcji soku i inkraktu lub jest poddawane suszeniu. W składzie chemicznym ziela wymienia się: pochodne kwasu kawowego - kwas kawoilowinowy i małe ilości kwasu cykoriowego, flawonoidy pochodne kwercetyny i kemferolu, polisacharydy takie jak metyloglukuronoarabinoksylany, arabinoramnogalaktyny i kwaśny ksyloglukan, ślady olejku, poliacetyleny, alkiloaminy i alkiloamidy. Pozyskiwane jesienią korzenie jeżówki zawierają pochodne kwasu kawowego - głównie cykoriowy, polisacharydy i glikoproteiny, śladowe ilości olejku (kariofyllen i humulen), poliacetyleny, alkiloamidy i znikome ilości nietoksycznych alkaloidów pirolizydynowych [Strzelecka i Kowalski, 2000]. Działanie lecznicze przypisuje się pochodnym kwasu kawowego, polisacharydom i alkilamidom [Lamer-Zarawska i wsp., 2007; Woelkart i Bauer, 2007; Foti i Wahlstrom, 2008]. Zaleca się stosowanie surowca w terapii wspomagającej i profilaktycznej infekcji górnych dróg oddechowych, przewlekłych i ostrych zakażeń bakteryjnych i wirusowych [Lamer-Zarawska i wsp., 2007]. Alkilamidy posiadają właściwości hamujące aktywność cyklooksygenazy, lipoksygenazy a także wykazują

działanie przeciwwirusowe co wiąże się z redukcją napadów astmy oraz stanów zapalnych [Freeman i Spelman, 2008]. Poleca się również stosowanie surowca jeżówki w leczeniu łagodnego przerostu prostaty i chorobach nowotworowych. Zewnętrznie preparaty jeżówki stosowane są na trudno gojące się rany, egzemy i łuszczycę [Strzelecka i Kowalski, 2000].

Mechanizm działania farmakologicznego jest wielokierunkowy i złożony. Do najważniejszych jego czynników należą: stymulowanie aktywności fagocytarnej makrofagów i monocytów oraz uwalniania przez nie immunomodulatorów, takich jak czynnik martwicy nowotworu α , interferonu β_2 oraz interleukiny-1 co składa się na właściwości immunostymulujące, dezaktywacja hialuronidazy chroniąca skórę przed utratą elastyczności, stymulowanie różnicowania fibrocytów z fibroblastów oraz dezaktywacja wolnych rodników [Gorski i wsp. 2004; Lamer-Zarawska i wsp., 2007; Freeman i Spelman, 2008].

Pomimo, że przetwory jeżówki purpurowej wydają się być tolerowane zarówno w krótkim (8-10dni) jak i długim okresie przyjmowania (2 miesiące), niekontrolowane spożycie stwarza możliwość ryzyka wielu interakcji międzylekowych [Gorski i wsp., 2004]. Z tego względu przetworów *E. purpurea* nie należy podawać z lekami upośledzającymi czynność wątroby: steroidami anabolicznymi, amidaronem, metotreksatem i ketokonazolem a także z lekami immunosupresyjnymi, takimi jak cyklosporyna. Zbyt intensywna i długotrwała stymulacja układu odpornościowego preparatami z jeżówką może prowadzić do immunosupresji. Istnieją również badania *in vivo* wskazujące na zachodzenie interakcji pomiędzy jeżówką a innymi środkami leczniczymi, w tym antybiotykami, lekami immunosupresyjnymi i glikokortykosteroidami oraz substratami enzymów CYP takimi jak leki przeciwzakrzepowe, benzodiazepiny i blokery kanałów wapniowych [Ożarowski i wsp., 2006]. Z systematycznego przeglądu literatury wynika jednak, że dotychczas przeprowadzono niewiele badań nad oddziaływaniem przetworów z jeżówki purpurowej na izoenzymy cytochromu P450, zwłaszcza dotyczących CYP1A2 i CYP2E1. Brak jest wobec tego kompletnych danych na temat pełnego bezpieczeństwa stosowania preparatów jeżówki w aspekcie ryzyka interakcji międzylekowych na etapie izoform cytochromu P450, w tym możliwości modyfikacji izoenzymów odpowiedzialnych za metabolizm substratów prokancerogennych. W świetle potencjalnych konsekwencji zdrowotnych możliwość zachodzenia interakcji z powszechnie stosowanymi środkami leczniczymi wymaga weryfikacji.

1.8.2. Soja zwyczajna

Glycine max to jednoroczna roślina zielna z rodziny *Fabaceae*, dawniej motylkowate (*Papilionaceae*), wywodząca się ze wschodniej Azji, uprawiana również w Europie. W lecznictwie stosowane są nasiona (*Sojae semen*) i olej sojowy (*Sojae oleum*). Nasiona soi zawierają ok. 40% wysokowartościowego białka, do 18% oleju, 32% węglowodanów i ok. 2% lecytyny. Olej sojowy zawiera 80% nienasyconych kwasów tłuszczowych w tym 44-62% kwasu linolowego, 4-11% kwasu linolenowego i 19-30% glicerydów kwasu olejowego a także kwas stearynowy i palmitynowy, fosfolipidy, witaminy i sterole [Strzelecka i Kowalski, 2000]. Poza wymienionymi składnikami w surowcu występują: saponiny, flawonoidy (głównie izoflawony - genisteina i daidzeina), błonnik, witaminy, sole mineralne, cholina, sitosterole, stigmasterol. W badaniach na zwierzętach zmielone nasiona wykazywały działanie przeciwnowotworowe, za które wydają się odpowiadać inhibitory proteaz, fitosterole, saponiny, kwasy fenolowe i izoflawony, natomiast izolowane z nich saponiny przeciwwakrzepowe [Strzelecka i Kowalski, 2000; Lamer-Zarawska i wsp., 2007]. Uważa się, że izoflawony sojowe redukują ryzyko rozwoju raka piersi. Ze względu na strukturę podobną do steroidów i właściwości estrogenów mogą działać jako agoniści receptora estrogenowego i współzawodniczyć z endogennymi receptorami. Soja ma też znaczenie w profilaktyce raka prostaty dzięki zdolnościom izoflawonów do hamowania angiogenezy. Wykazuje również działanie przeciwmiażdżycowe, obniża poziom frakcji LDL cholesterolu i podwyższa cholesterol frakcji HDL. Ponadto izoflawony sojowe są silnymi antyoksydantami a genisteina zwiększa gęstość tkanki kostnej [Lamer-Zarawska i wsp., 2007]. Produkty na bazie tego surowca są często wykorzystywane w łagodzeniu objawów menopauzy u kobiet co jest konsekwencją obecności w soi izoflawonów takich jak daidzeina i genisteina. Wykazano również, że dieta bogata w soję wpływa na obniżenie poziomu cholesterolu [Song i wsp., 2007]. Sugeruje się również możliwość oddziaływania przetworów soi oraz jej składników (genisteiny i daidzeiny) na aktywność enzymów z nadrodziny cytochromu P450 oraz glikoproteiny P związanej z jelitowo-mózgowym transportem leków [Foti i Wahlstrom, 2008].

1.8.3. Czosnek pospolity

Allium sativum jest byliną z rodziny *Alliaceae* wywodzącą się z terenów środkowej Azji, rozpowszechnioną w wielu rejonach świata, w tym w Polsce. Surowcem

wykorzystywanym w leczeniu jest cebula - *Allii sativi bulbus* [Lamer-Zarawska i wsp., 2007]. Czosnek i jego preparaty od kilku lat należą do najintensywniej badanych surowców ze względu na wielostronną aktywność farmakologiczną i szerokie zastosowanie w fitoterapii głównie schorzeń układu odpornościowego i oddechowego, zarówno bakteryjnych jak i wirusowych [Hu i wsp., 2005]. Liczne doniesienia literaturowe wskazują na zróżnicowane właściwości farmakologiczne czosnku, które wydają się być częściowo zależne od procesu jego przygotowania i ekstrakcji, przy czym za główny efekt farmakologiczny surowca odpowiadają jego składniki aktywne - glikozyd alliina występująca w ilości 0,35-1,15%, alkilowe jej pochodne metyloalliina i propyloalliina oraz związki flawonoidowe - kwercetyna i rutyna, aminokwasy, polisacharydy, saponiny i terpeny oraz olejek zawierający dwu- i trójsiarczki [Strzelecka i Kowalski, 2000; Blecharz-Klin i wsp., 2005]. Powstała z przekształceń alliiny - allicyna wykazuje działanie bakteriobójcze, a cysteiniosulfotlenek obniża poziom cholesterolu we krwi. Czosnek posiada właściwości przeciwdrobnoustrojowe i działa stymulująco na układ odpornościowy, stąd jego szerokie zastosowanie w leczeniu zakażeń dróg oddechowych, również w pediatrii [Lamer-Zarawska i wsp., 2007]. Mechanizm działania polega głównie na nasilaniu produkcji przeciwzapalnego czynnika IL-10 i obniżaniu poziom cytokin prozapalnych, takich jak TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IFN- γ i IL-2 [Hodge i wsp., 2002]. Surowiec posiada również właściwości żółciopędne, hipolipidemiczne, hipoglikemiczne, przeciwrzepliwe i obniżające ciśnienie krwi, co ma szczególne znaczenie w geriatricy przy miażdżycy, zakrzepicy, nadciśnieniu tętniczym i nieżycie przewodu pokarmowego. Farmakopea Europejska i WHO aprobują zastosowanie preparatów z cebuli czosnku w leczeniu łagodnych i średnich stanów nadciśnienia [Nowak, 2009a].

Preparaty czosnku zmniejszają napięcie mięśni gładkich jelit, oskrzeli i naczyń krwionośnych, obniżają ciśnienie tętnicze i działają tonizująco w chorobach wieku starczego. Preparaty z czosnku stosowane są w zakażeniach górnych dróg oddechowych, przewodu pokarmowego, miażdżycy i nadciśnieniu [Strzelecka i Kowalski, 2000; Lamer-Zarawska i wsp., 2007]. Ponadto surowiec wykorzystywany jest jako antidotum przy zatruciu metalami ciężkimi. Znane jest również jego oddziaływanie hepatoprotekcyjne [Lawson, 1994]. Obecne w czosnku organiczne związki siarki wykazują właściwości antyoksydacyjne. W komórkach wątroby i nerek szczurów karmionych dietą zawierającą czosnek wykazano w warunkach *in vitro* zmniejszenie tworzenia wolnych rodników [Rietz i wsp. 1995]. Istnieją prace eksperymentalne i epidemiologiczne wskazujące na przeciwnowotworowe właściwości czosnku, co wykazano w badaniach zarówno preparatów z czosnku jak i jego siarkowych związków [Fleischauer i wsp., 2000; Park i wsp. 2002].

Najczęściej badane, oczyszczone związki siarkowe testowane w modelach zwierzęcych w kierunku właściwości przeciwnowotworowych przedstawiono w Tabeli 15.

Tabela 15. Związki organiczne siarki z czosnku testowane w modelu zwierzęcym z indukowanym rozwojem nowotworu [Wargovich, 2006]

Struktura	Nazwa
$\text{CH}_2 = \text{CH}-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH} = \text{CH}_2$	siarczek diallilu (DAS)
$\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$	siarczek dimetylu (DPS)
$\text{CH}_2 = \text{CH}-\text{CH}_2-\text{S}-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH} = \text{CH}_2$	disiarczek diallilu (DADS)
$\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$	disiarczek di-n-propylu (DPDS)
$\text{CH}_3-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH} = \text{CH}_2$	siarczek metylu allilu (AMS)
$\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH} = \text{CH}_2$	siarczek n-propylu allilu (APS)
$\text{CH}_2 = \text{CH}-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{NH}_2-\text{COOH}$	S-allilocysteina (SAC)

Właściwości chemoprewencyjne czosnku nie zostały w pełni poznane, ale sugeruje się, że mogą one polegać na hamowaniu I fazy metabolizmu ksenobiotyków, głównie aktywności cytochromu CYP2E1 zaangażowanego w biotransformację związków endogennych i ksenobiotyków, w tym prokancerogenów i nasilaniu II fazy biotransformacji [Park i wsp. 2002; Munday, 2004]. Siarczek diallilu (DAS) może wywierać zróżnicowany wpływ na izoformy CYP450. Pomimo powszechnej popularności preparatów z tego surowca istnieją badania wskazujące na fakt, iż niekontrolowane dawkowanie *Allium sativum* nie zawsze jest bezpieczne, co przejawia się zmianami nekrotycznymi w obrazie histopatologicznym wątroby i nerek szczurzych po podaniu wyższych dawek surowca [1000 mg/kg] przez okres 30 dni [Banerjee i wsp., 2001].

Badania wskazują, że preparaty czosnku modyfikują parametry farmakokinetyczne paracetamolu, obniżają stężenie warfaryny we krwi i powodują hipoglikemię podczas podawania z chlorpropamidem [Blecharz-Klin i wsp., 2005]. Sugeruje się, że aktywne składniki jeżówki mogą zmieniać metabolizm i efektywność leków będących substratami dla CYP3A4. Preparatów z czosnku nie powinno się przyjmować z alkoholem etylowym, lekami przeciwzakrzepowymi ze względu na zwiększanie ryzyka krwawień. Przy długotrwałym zażywaniu czosnku może dochodzić do stanów hipoglikemicznych co potwierdzają badania kliniczne [Lamer-Zarawska i wsp., 2007]. Na podstawie dostępnej literatury można wnioskować o potrzebie wykonywania badań *in vivo* w zakresie możliwych interakcji preparatów czosnku z lekami syntetycznymi oraz wpływu na metabolizm innych substratów izoform cytochromu P450 dla prowadzenia bezpiecznej farmakoterapii.

1.8.4. Kozłek lekarski

Surowiec pozyskany z *Valeriana officinalis* znalazł szerokie zastosowanie w ziołolecznictwie głównie ze względu na właściwości łagodnie uspokajające i nasenne. *V. officinalis* to bylina rozpowszechniona na terenach Europy i Azji należąca do rodziny *Valerianaceae* obejmującej ponad 250 gatunków. Gatunek ten uznaje się za zbiorowy i wielopostaciowy, przy czym w Polsce spotykane są: *V. exaltata* i *V. angustifolia*. W lecznictwie znalazły zastosowanie dwa surowce tej rośliny zbierane jesienią w drugim roku wegetacji - kłącze i korzeń kozłka (*Valerianae rhizoma et radix*) [Strzelecka i Kowalski, 2000]. Poddany procesowi suszenia w temperaturze do 35°C surowiec zawiera ok. 0,5-1% irydoidów o charakterze estrów - walepotriatów (m.in.: waltrat, acetowaltrat, dihydrowaltrat) i 0,5-2% olejku eterycznego z estrami kwasu walerianowego i izowalerianowego z eugenolem, izoeugenolem i borneolem stanowiące główne składniki nadające zapach suszonego surowca. W składzie chemicznym wyróżnia się także monotereny (kamfen, limonen, pinen, felandren), frakcję seskwiterpenową - głównie czynne farmakologicznie kwas walerenowy, walerenal i waleranon oraz triterpenowy związek walerozyd A i aktynidynę. W zależności od techniki ekstrakcji wyciągi mogą zawierać zróżnicowane ilości wymienionych związków. Odpowiednim składnikom surowca zawdzięczane jest jego działanie uspokajające (walepotriaty, kwas walerenowy i olejek eteryczny) oraz rozkurczające mięśnie gładkie przewodu pokarmowego, układu moczowego i obwodowych naczyń krwionośnych (olejek, waleranon) [Strzelecka i Kowalski, 2000]. Wyciągi alkoholowe z korzenia kozłka lekarskiego są stosowane jako środek uspokajający w stanach napięcia nerwowego, niepokoju oraz w terapii zaburzeń snu i zaburzeniach funkcjonowania układu pokarmowego przy nerwicach wegetatywnych [Strzelecka i Kowalski, 2000; Foti i Wahlstrom, 2008; Hattesoehl i wsp., 2008]. Wykazano, że izolowane walepotriaty, wykorzystywane jako bezpieczny łagodny środek psychotropowy w leczeniu geriatrycznym, mają powinowactwo do receptorów benzodiazepinowych w mózgu, co tłumaczy ich działanie sedatywne i niewielkie anksjolityczne. EMEA postuluje działanie uspokajające oparte o zahamowanie enzymów odpowiedzialnych za rozkład kwasu γ -aminomasłowego (GABA) w ośrodkowym układzie nerwowym i powodujące w ten sposób wzrost jego stężenia w mózgu i obniżenia jego aktywności oraz działanie rozkurczowe wobec mięśni gładkich przewodu pokarmowego i w mniejszym stopniu również ścian naczyń krwionośnych [Lamer-Zarawska i wsp., 2007].

Istnieją doniesienia o potencjalnych interakcjach pomiędzy produktami zawierającymi kozłek lekarski i standardową terapią oraz zwiększaniu ryzyka działań niepożądanych. Podstawę do wyjaśnienia interakcji przetworów *V. officinalis*, głównie frakcji olejku eterycznego i standaryzowanych ekstraktów korzeni z lekami syntetycznymi stanowią badania kliniczne nad farmakologicznymi punktami uchwytu związków biologicznie aktywnych [ESCOP, 2003]. Ze względu na sedację wywoływaną przez preparaty z surowca nie powinno się ich podawać z benzodiazepinami i alkoholem. Poza tym kozłek potencjalnie wpływa na wydłużenie działania środków anestetycznych i wspomagających oddziałujących przez receptor GABA co może prowadzić do nasilenia działania depresyjnego. Kozłek lekarski potęguje działanie nasenne tiopentalu i pentobarbitalu [Lamer-Zarawska i wsp., 2007]. Dane literaturowe sugerują również wpływ preparatów zawierających surowiec na aktywność izoform cytochromu P450, głównie CYP3A4, CYP2C9 i CYP2C19 [Foti i Wahlstrom, 2008].

1.8.5. Zielona herbata

Napary z *Camellia sinensis* są powszechnie stosowanym napojem ze względu na właściwości przeciwutleniające, przeciwnowotworowe i przeciwzapalne oraz z uwagi na działanie sprzyjające utrzymaniu prawidłowej masy ciała [Yang i wsp. 2000; Foti i Wahlstrom, 2008]. Herbata należy do rodziny kameliowatych (*Camelliaceae*) i występuje w dwóch odmianach botanicznych: herbata chińska (*C. sinensis*) i herbata indyjska (*C. assamica*). Surowcem stosowanym w lecznictwie jest są pąki i liście *Theae folium* zawierające 1,2-4,5% kofeiny, teofilinę (do 0,04%), ok. 0,2%-0,5% teobrominy, zasady purynowe: adeninę i ksantynę, garbniki katechinowe w ilości 10%-25%, katechiny i ich galusany, saponiny, flawonoidy - pochodne kemferolu, kwercetyny i mirycetyny oraz niewielkie ilości olejku eterycznego (linalol, geraniol i jasmon) [Strzelecka i Kowalski, 2000, Lamer-Zarawska i wsp., 2007]. Farmakologiczne właściwości zielonej herbaty związane są z obecnością flawonoidów powszechnie nazywanych katechinami o wysokiej aktywności antyoksydacyjnej wykorzystywanej m.in. w profilaktyce schorzeń układu sercowo-naczyniowego [Foti i Wahlstrom, 2008]. Wśród katechin wyszczególnić można głównie epikatechinę (EC), epigallokatechinę (EGC) oraz galusan epigallokatechiny (EGCG) [Frei i Higdon, 2003; Lu i wsp., 2003]. Napar z zielonej herbaty jest składem zbliżony do składu świeżych liści i zawiera 30-42% katechin (w tym głównie EGCG-11%, EC-10%, ECG-2% i EGC-2%), flawonole (5-10%), metyloksantyny 7-9% (w tym głównie kofeina 3-5%,

teobromina, 0,1% i teofilina 0,02%), tanię (4-6%), teogalinę (2-3%), kwas chinonowy (2%), białka (1%), związki mineralne (10%), oraz substancje lotne stanowiące poniżej 0,1% w stałym ekstrakcie. Ponadto zawiera również niewielkie ilości innych polifenoli takich jak procyjanidyny i depsydy a także mikroelementy (glin, mangan, miedź, potas, wapń i fluor) [Ostrowska, 2008]. Najważniejszą substancją czynną herbaty chińskiej wydaje się być galusan epigallokatechiny (EGCG), któremu przypisuje się wiele działań farmakologicznych, w tym przeciwmiażdżycowe, antycholesterolowe, przeciwnowotworowe oraz przeciwenotoksyczne. Ze względu na właściwości zielona herbata stosowana jest, obok schorzeń układu krążenia, w chorobach neurodegeneracyjnych mózgu, cukrzycy typu II i profilaktyce miażdżycy. Potwierdzono bowiem, że długotrwałe spożycie katechin może korzystnie wpływać na profil lipidowy i hamowanie otyłości związanej z dietą wysokotłuszczową. Ze względu na właściwości antyoksydacyjne surowiec zalecany jest również do stosowania w chorobie nowotworowej. Szereg badań *in vivo* i *in vitro* wskazuje na chemoprewencyjne właściwości katechin zawartych w surowcu i jego przetworach oraz działania antyproliferacyjnego w komórkach hepatoma [Hasegawa i wsp., 1995; Qin i wsp., 2000]. W farmacji surowiec wykorzystywany jest jako źródło kofeiny i garbników o właściwościach ściągających. Wśród interakcji wymienia się obniżanie wchłaniania alkaloidów typu morfiny, antydepresantów i neuroleptyków poprzez łączenie się garbników herbaty z substancjami zawierającymi w swojej cząsteczce azot [Lamer-Zarawska i wsp., 2007]. Istnieje również prawdopodobieństwo modulacji procesu biotransformacji ksenobiotyków z udziałem izoenzymów cytochromu P450. Z tego względu zielona herbata i jej katechiny stają się przedmiotem badań w modelu zwierzęcym i w systemie *in vitro* zmierzających do oceny warunków w jakich może dojść do zmiany aktywności wspomnianych enzymów.

1.8.6. Dziurawiec zwyczajny

Hypericum perforatum to występująca na terenach zachodniej Azji, Chinach, Ameryce Północnej i Afryce oraz Środkowej Europie, również w Polsce, bylina z rodziny *Hypericaceae*. Ziele dziurawca zwyczajnego (*Hyperici herba*) w postaci młodych pędów zbieranych dwukrotnie w ciągu roku, stanowi surowiec wchodzący w skład najpopularniejszych preparatów leczniczych oraz medycyny alternatywnej stosowanych głównie w łagodnych i umiarkowanych stanach depresyjnych [Foti i Wahlstrom, 2008]. Wyciąg z surowca stanowi mieszaninę zróżnicowanych składników biologicznie czynnych,

wśród których wyróżnia się związki antranoidowe: hiperycynę i jej pochodne - hiperforynę, glikozydy flawonoidowe: hiperozyd, rutozyd, kwercetynę, ksantony, garbniki katechinowe oraz fenolokwasy (kwas kawowy i chlorogenowy) a także olejek eteryczny i fitosterole [Strzelecka i Kowalski, 2000; Bagdonaitė i wsp., 2012]. Skład surowca a także sposób przygotowywania ekstraktów wpływa na końcową zawartość związków aktywnych oraz wielokierunkowe działanie farmakologiczne.

Wyciągi olejowe lub alkoholowe a także sproszkowane ziele dziurawca charakteryzujące się wysoką koncentracją hiperycyny, pochodnych ksantonu i floroglucyny, wykazują działanie uspokajające i łagodne przeciwdepresyjne w związku z czym zalecane są w okresie klimakterium, w niepokoju nerwowym i stanach lękowych [Strzelecka i Kowalski, 2000; Lamer-Zarawska i wsp, 2007]. Wodne wyciągi z ziela zawierają głównie glikozydy flawonoidowe, fenolokwasy i garbniki katechinowe, które odpowiadają za ściągający i spazmolityczny wpływ na mięśnie gładkie przewodu pokarmowego, żółciowego i moczowego, co tłumaczy ich stosowanie w chorobach wątroby i zaburzeniach wydzielania soków trawiennych, skurczach jelit i wzdęciach, dyskinezie dróg żółciowych, w zastojach krążenia obwodowego i łamliwości naczyń krwionośnych oraz pomocniczo w kamicy żółciowej i moczowej [Strzelecka i Kowalski, 2000; Lamer-Zarawska i wsp, 2007]. Badania farmakologiczne wykazały poprawę sprawności psychicznej, zwiększenie zdolności koncentracji i obniżenie objawów hipochondrycznych po kilku tygodniach zażywania wyciągu z dziurawca [Foti i Wahlstrom, 2008]. W analizach tych potwierdzono wpływ związków aktywnych ziela *H. perforatum* na receptory pre- i postsynaptyczne a także metabolizm neurotransmiterów [Bladt i Wagner, 1993]. Jednocześnie wykazano, że za korzystne efekty w leczeniu depresji i stanów lękowych odpowiada głównie hiperycyna będąca potencjalnym inhibitorem wchłaniania zwrotnego serotoniny, norepinefryny i dopaminy poprzez hamowanie monoaminooksydazy (MAO) i katecholo-O-metylotransferazy (COMT) [Foti i Wahlstrom, 2008; Strzelecka i Kowalski, 2000]. Zewnętrznie napary z surowca są stosowane na trudno gojące się rany, oparzenia i odmrożenia oraz w zapaleniu dziąseł, gardła i jamy ustnej [Lamer-Zarawska i wsp, 2007].

Podawanie wyciągu z dziurawca może generować interakcje farmakologiczne, których mechanizm nie został dotychczas w pełni wyjaśniony. Wśród interakcji farmakologicznych w fazie farmakodynamicznej wskazuje się na ryzyko rozwoju zespołu serotoninowego przy jednoczesnym podawaniu wyciągów z dziurawca wraz z selektywnymi syntetycznymi inhibitorami zwrotnego wchłaniania serotoniny, w tym paroksetyny, sertraliny, wenlafaksyny. Istotne klinicznie są ujemne interakcje z lekami nasercowymi i doustnymi lekami

przeciwwakrzepowymi: digoksyną i warfaryną, z lekami immunosupresyjnymi (cyklosporyną), przeciwastmatycznymi (teofiliną), antykoagulacyjnymi (fenprokumonem) i lekami przeciwpadaczkowymi. Dziurawiec zwyczajny przyjmowany w dawce dobowej 300 mg przez 4 tygodnie oraz w wyższych ilościach obniża stężenie leku immunosupresyjnego o wąskim indeksie terapeutycznym - cyklosporyny A w osoczu poniżej efektywnego zakresu terapeutycznego. Preparaty tworzone z surowca mogą też nasilać działanie oraz farmakokinetykę doustnych środków antykoncepcyjnych [Lamer-Zarawska i wsp, 2007]. Badania kliniczne wskazują że preparaty zawierające w składzie dziurawiec mogą wpływać na efekt terapeutyczny oraz profil bezpieczeństwa leków syntetycznych na zasadzie interakcji z lekami antydepresyjnymi, przeciwpadaczkowymi, jak również z cytostatykami [Ożarowski i Mrozikiewicz, 2004]. EMEA sugeruje, że składniki stosowanych powszechnie wyciągów z dziurawca mogą powodować nie tylko wzrost aktywności izoform cytochromu P450 ale być może aktywować receptory komórkowe związane z transportem i metabolizmem leków w organizmie [Lamer-Zarawska i wsp, 2007]. Wobec tego znaczna liczba prac zarówno *in vitro* jak i *in vivo* koncentruje się wokół obserwacji potencjalnego wpływu długotrwałego i systematycznego stosowania wyciągów *Hypericum perforatum* w interakcjach lekowych na poziomie biotransformacji ksenobiotyków z udziałem CYP450 poprzez nasilenie aktywności układu enzymatycznego cytochromu P450, w tym również izoenzymu CYP1A2, 3A4 i 2C9 [Foti i Wahlstrom, 2008].

1.8.7. Miłorząb dwukłapowy

Preparaty pozyskiwane na bazie wyciągu *Ginkgo biloba* są najpopularniejszymi suplementami diety na rynku [Tada i wsp., 2008]. Miłorząb dwukłapowy (japoński) jest nagonasiennym drzewem z rodziny *Ginkgoaceae* w stanie dzikim występującym na terenie wschodnich Chin, uprawianym w Azji, Ameryce Pn., Nowej Zelandii i Europie, również w Polsce. Surowcem farmaceutycznym są liście miłorzębu dwukłapowego, z których przygotowuje się wyciągi wodno-alkoholowe standaryzowane na zawartość frakcji flawonoidowej i terpenowej. *Ginkgo folium* jest często stosowany głównie ze względu na jego właściwości przeciwutleniające i neuroprotektoryjne [Foti i Wahlstrom, 2008]. Komercyjnie w Niemczech dostępny jest ekstrakt EGb 761 i LI 1370, natomiast w Europie stosowany jest wyciąg GBE z oznaczoną zawartością flawonoidów - 0,5-1,8% glikozydów flawonoidowych oraz terpenów (ginkgolidy - 0,06%-0,23%, bilobalid - 0,26%) [Strzelecka i Kowalski, 2000]. Surowiec zawiera, stanowiące jedną z frakcji czynnych, terpenoidy, a wśród nich laktony

diterpenowe (ginkgolidy A, B, C, J i M), laktony seskwiterpenowe (bilobalid A, elemol i eudesmol), monoterpeny (p-cymen, jonon), steroidy, flawonoidy wśród których zaznacza się obecność flawonoli - glikozydowych i estrowych pochodnych kwercetyny, kemferolu i izoramnetyny oraz charakterystyczne dla tego surowca biflawonoidy - amnetoflawon, bilobetynę i ginkgetynę; pochodne katechiny, proantocyjanidyny; kwasy tłuszczowe, lipidy, kwasy alifatyczne i hydroksykwasy oraz ginol, ginon i kwasy ginkgolowe [Strzelecka i Kowalski, 2000; Lamer-Zarawska i wsp., 2007]. Działanie farmakologiczne wyciągów miłorzębowych uwarunkowane jest obecnością flawonoidów, terpenów i proantocyjanidyn. Wyciągi z liścia wykazują wielokierunkowe właściwości terapeutyczne - usprawniają obwodowe krążenie krwi poprzez zmniejszanie napięcia ścian naczyń krwionośnych i zwiększenie ich elastyczności dzięki właściwościom flawonoidów, katechin i proantocyjanidyn. Surowiec wykazuje również działanie przeciwwagregacyjne a ginkgolidy zmniejszają lepkość krwi. Związki polifenolowe surowca (flawonoidy, proantocyjanidyny, katechiny) posiadają silne właściwości antyoksydacyjne przez co zmiatają wolne rodniki nadtlenkowe [Strzelecka i Kowalski, 2000; Nowak, 2009a]. Ginkgolidy i flawonoidy spowalniają degenerację tkanki nerwowej a bilobalid działa ochronnie na osłonki mielinowe [Lamer-Zarawska i wsp., 2007]. Wyciągi oraz preparaty z liści miłorzębu stosowane są w leczeniu chorób naczyń krwionośnych, zaburzeń obwodowego krążenia krwi, zaburzeń neurologicznych i degeneracyjnych [Strzelecka i Kowalski, 2000]. Wyniki badań eksperymentalnych potwierdzają, że związki aktywne surowca i wyciąg wpływają na receptory cholinergiczne i α -adrenergiczne, hamują wychwyt zwrotny choliny w hipokampie, poprawiają pamięć i koncentrację [Nowak, 2009a]. W związku z powyższym, we wskazaniach wymienia się głównie zespoły otępieniowe z zaburzeniami pamięci, w niewydolności naczyń mózgowych i krążenia w kończynach dolnych oraz dysfunkcji ośrodkowego układu nerwowego. W krajach europejskich wyciąg z surowca jest klinicznie wykorzystywany w niewydolności mózgowej, demencji naczyniowej, chromaniu przestankowym, zaburzeniach równowagi i chorobie Alzheimera [Tada, 2008].

Wśród interakcji wymienia się możliwość krwawień podczas stosowania wyciągu z kwasem acetylosalicylowym. Ze względu na przeciwzkrzepowe właściwości nie poleca się stosowania *Ginkgo biloba* z innymi czynnikami o takich właściwościach jak warfaryna i aspiryna [Foti i Wahlstrom, 2008]. Dodatkowo interakcje obserwowane są przy jednoczesnym podawaniu z cyklosporyną A prowadzące do obniżenia jej neurotoksyczności [Lamer-Zarawska i wsp., 2007]. Interakcje farmakodynamiczne mogą wystąpić również podczas jednoczesnego przyjmowania tego surowca z innymi preparatami roślinnymi

o właściwościach przeciwwzkrzepowych takich jak czosnek i żeń-szeń [Foti i Wahlstrom, 2008]. Dane pochodzące z badań *in vitro* sugerują również interakcje preparatów *Ginkgo biloba* na etapie biotransformacji ksenobiotyków przejawiające się zmianami aktywności izoform cytochromu P450 [Chang i wsp., 2006a; Chang i wsp., 2006b; Foti i Wahlstrom, 2008]. Sugeruje się, że frakcja terpenoidowa popularnego ekstraktu EGb 761 hamuje CYP2C9 podczas gdy flawonoidy tego wyciągu obniżają aktywność CYP2C9, CYP1A2, CYP2E1 i CYP3A4 [Gaudineau i wsp., 2004].

1.8.8. Żeń-szeń

Jednymi z najpopularniejszych produktów ziołowych stosowanych przez amerykańskich i azjatyckich konsumentów są preparaty *Panax ginseng*. Wyróżnia się kilka gatunków żeń-szenia, w tym *Panax ginseng* C.A. Meyer (nazywany azjatyckim) pochodzący głównie z Korei i wschodnich Chin oraz *Panax quinquefolius* L. (żeń-szeń północnoamerykański) z Kanady [Chang, 2002]. Żeń-szeń należy do rodziny araliowatych (*Araliaceae*) zasiedlających tereny Azji, Neopolu, Azji i Ameryki Pn. W celach leczniczych powszechnie wykorzystywany jest korzeń *Ginseng radix* oraz korzeń z zieleń - *Ginseng radix cum herba* [Strzelecka i Kowalski, 2000; Lamer-Zarawska i wsp., 2007]. Liczne badania, w tym również kliniczne, dotyczące aktywności farmakologicznej przetworów z surowca, ugruntowały pozycję korzeni żeń-szenia w lecznictwie. Z surowca pozyskiwanego z 4-6 letnich roślin wyizolowano i opisano około 200 substancji. *Radix Ginseng* charakteryzuje się zawartością 0,5-12% steroidowych saponin triterpenowych - pochodnych damaranu nazywanych ginsenozydami, stanowiącymi główny związek czynny surowca lub wyciągu, 0,5% olejku eterycznego, w skład którego wchodzi głównie seskwiterpeny - elemen i eremofilen, alkoholi (panaksydol, panaksynol, panaksy triol), aminokwasów (arginina, cysteina, tyrozyna, kwas alfa-aminomasłowy), peptydów, choliny, kwasów fenolowych, polisacharydów i flawonoidów [Strzelecka i Kowalski, 2000; Lamer-Zarawska i wsp., 2007]. Wśród związków flawonoidowych żeń-szenia wymieniane są: kemferol, 3-O-glukogalaktozyd kemferolu oraz 3-O-galaktozyd kemferolu (tzw. trifoliny). Działanie lecznicze *P. ginseng* wynika głównie z zawartości oraz wzajemnych proporcji ginsenozydów, gdyż każdy z nich jest odrębnym składnikiem aktywnym wywierającym swoisty, niekiedy przeciwstawny do pozostałych, a także wielokierunkowy efekt [Wolski i wsp., 2008]. Profil ginsenozydów jest charakterystycznym markerem surowca i zależy od wieku i części rośliny. Dotychczas opisano około 50 ginsenozydów, które charakteryzują się różnorodnością

strukturalną odpowiadającą za zróżnicowanie efektów farmakologicznych, w tym za działanie adaptogennie, psychostymulujące i zwiększające wydolność fizyczną organizmu. Z punktu widzenia struktury chemicznej ginsenozydy można podzielić ze względu na typ aglikonu co przedstawiono w Tabeli 16.

Tabela 16. Wybrane ginsenozydy w zależności od rodzaju aglikonu [Wolski i wsp., 2008]

Rodzaj aglikonu	Ginsenozyd
Pochodne 20(S)-protopanaksadiolu	Ra1, Ra2, Ra3
	Rb1, Rb2, Rb3
	Rc, Rd, Rg3, Rh2
	Rs1, Rs2, Rs3
	m-Rb1, m-Rb2
	m-Rc, m-Rd, F2
Pochodne 20(S)-protopanaksatriolu	Re, Rf
	20-gluko-Rf
	Rg1, Rg2
	Rh1
	Notoginsenozyd R2
Pochodne kwasu oleanolowego,	F1
	Ro
Pochodne ocotillolu	Chikusetsaponina IVa
	Pseudoginsenozyd F11
	Pseudoginsenozyd RT2
	24(S)-Pseudoginsenozyd F11
	Pseudoginsenozyd RT4

Uznaje się, że ginsenozydy Rb₁, Rb₂ oraz Rc stymulują receptory GABA, przez co wywierają depresyjny wpływ na funkcjonowanie mózgu, co przejawia się działaniem antypsychotycznym, uspokajającym, nasennym i przeciwłękowym. Natomiast ginsenozydy Rg₁ działają psychostymulująco [Wolski i wsp., 2008; Nowak, 2009b]. Współczesne badania wykazują właściwości immunostymulujące saponin żeń-szenia, co potwierdzają obserwacje wzrostu wytwarzania limfocytów typu T, komórek NK i interleukiny I. Stosowane w lecznictwie wyciągi lub sproszkowany korzeń obniżają poziom cholesterolu, podnoszą ciśnienie krwi przez zwiększenie poziomu adrenaliny i noradrenaliny w surowicy krwi, podnoszą poziom dopaminy i noradrenaliny w pniu mózgu i obniżają zawartość serotoniny. Badania na zwierzętach wskazują na działanie parasympatykotoniczne, przeciwbólne i przeciwgorączkowe, hepatoprotekcyjne, przeciwmiażdżycowe, immunomodulujące i przeciwutleniające [Strzelecka i Kowalski, 2000; Lamer-Zarawska i wsp., 2007]. W oparciu o dostępne badania kliniczne, monografie ESCOP i WHO można uznać, że żeń-szeń jest stosowany w celach tonizujących, rekomendowany w celach zwalczania zmęczenia,

wzmacniania systemu immunologicznego, poprawy wytrzymałości fizycznej i stymulacji apetytu [Chang, 2002; Nowak 2009b]. Mechanizm działania żeń-szenia nie jest znany, ale wykazuje pozytywny wpływ na proces uczenia się, pamięć i nastrój, funkcje układu krążenia, funkcje neuroendokrynne, metabolizm węglowodanów, lipidów oraz funkcje układu odpornościowego [Chang, 2002]. Wykazano również wpływ na syntezę prostaglandyn i zdolności przystosowawcze organizmu do zmiennych warunków środowiska, przy czym nie wszystkie te działania potwierdzono w badaniach klinicznych. U osób starszych preparaty zawierające surowiec wpływają na poprawę koncentracji i pamięć oraz opóźniają procesy starzenia [Strzelecka i Kowalski, 2000]. Doustne przyjmowanie wyciągu żeń-szenia obniża zasięg indukowanego przez podanie DMBA rozwoju nowotworu płuc i skóry u myszy. Należy nadmienić, iż metabolizm tego węglowodoru katalizowany jest przez enzymy z rodziny CYP1 cytochromu P450 a potencjalny mechanizm ochronny może wynikać z hamowania aktywności tych izoform [Chang, 2002].

Odnotowano interakcje żeń-szenia z warfaryną i inhibitorem monoaminooksydazy - fenelzyną. W wyniku interakcji z warfaryną, heparyną, aspiryną i innymi antykoagulantami może mieć miejsce nasilenie ich działania. U zwierząt żeń-szeń zwiększa aktywność dehydrogenazy alkoholowej i aldehydowej co podwyższa klirens alkoholu. Surowiec przyjmowany ze stymulantami może być przyczyną tachykardii lub nadciśnienia. Dobowo sugeruje się przyjmowanie dawki jednorazowej lub w częściach 80-350 mg wyciągu. Według Komisji E doustnie dobowo 1-2 g sproszkowanego surowca [Lamer-Zarawska i wsp., 2007]. Wyniki pochodzące z badań klinicznych wykorzystujących wyciągi żeń-szenia są sprzeczne. Istnieją doniesienia o obniżeniu właściwości przeciwzakrzepowych warfaryny u ochotników stosujących w diecie ten surowiec [Rosado, 2003; Foti i Wahlstrom, 2008]. Inne wyniki prac zespołu Hu i wsp. (2005) pozostają w opozycji do powyższych wskazując na brak wpływu na procesy farmakokinetyczne i farmakodynamiczne podczas jednoczesnego przyjmowania *Panax ginseng* [Hu i wsp., 2005]. Ponadto stosowanie żeń-szenia łącznie z kofeiną może indukować stan nadmiernego pobudzenia [Nowak, 2009b].

W badaniach *in vitro* z zastosowaniem zarówno ekstraktu jak i całkowitych saponin wykazano efekt modulacji wybranych izoform cytochromu P450, jednak nie jest on sprecyzowany w warunkach *in vivo*.

2. CELE PRACY

1. Ocena poziomu transkrypcji genów *CYP1A2* i *CYP2E1* kodujących enzymy I fazy metabolizmu ksenobiotyków w modelu *in vivo* pod wpływem standaryzowanych ekstraktów z roślin leczniczych.
2. Analiza poziomu mRNA genu *AHR* czynnika transkrypcyjnego *CYP1A2* w grupach zwierząt otrzymujących standaryzowane wyciągi roślinne.
3. Określenie istotnych różnic pomiędzy średnimi analizowanych grup celem oszacowania związku pomiędzy ilością transkryptu *CYP1A2* a poziomem ekspresji czynnika AhR.
4. Próba określenia ryzyka zmian metabolizmu substratów badanych izoform, w tym wystąpienia potencjalnych interakcji, w oparciu o analizę molekularnych mechanizmów regulacji aktywności *CYP1A2* i *CYP2E1* pod wpływem zastosowanych substancji roślinnych.

3. MATERIAŁY I METODY

3.1. Materiały

3.1.1. Bufory

- bufor do nanoszenia próbek DNA: 30% glicerol, 0,25% barwnika *Bromophenol blue*
- TBE 10 x stężony: 88 mM TRIS, 89 mM kwas borowy, 2 mM EDTA

3.1.2. Roztwory i odczynniki

- agaroz (ABO, Fermentas, Litwa)
- alkohol etylowy 75% (POCh, Polska)
- β -naftoflawon (Sigma, USA)
- bromek etydyny (10 mg/ml), (Sigma, USA)
- chloroform (POCh, Polska)
- cymetydyna (Sigma, USA)
- DEPC (Sigma, USA)
- dietylotiokarbaminian (Sigma, USA)
- EDTA (POCh, Polska)
- izoniazyd (Sigma, USA)
- izopropanol (POCh, Polska)
- kwas borowy (Sigma, USA)
- marker wielkości KBL (1kb DNA Ladder, Fermentas, Litwa)
- polimeraza Taq (Fermentas, Litwa)
- TEMED (Sigma, USA)
- TriPure Isolation Reagent (Roche Diagnostic, Niemcy)
- TRIS base (Sigma, USA)
- zestaw Fast Start DNA Master Sybr Green I (Roche Diagnostic, Niemcy)
- zestaw SuperScript First Strand Synthesis System (Invitrogen, USA)

3.1.3. Aparatura i sprzęt laboratoryjny

- aparat do elektroforezy poziomej (BioRad, USA)
- aparat do ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym LightCycler (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Niemcy)
- homogenizator tkankowy Power Gen 125 (Fisherbrand, Fisher Scientific, USA)
- komora laminarna Herasafe KS (Kendro, Niemcy)
- komora PCR UV-CLEANER UVC/T-M-AR (Biosan, USA)
- pipety nastawne (Eppendorf, USA; Labmate, Wielka Brytania)
- spektrofotometr BioPhotometer (Eppendorf, USA)
- system wizualizacji i analizy obrazu UV: UVI-KS4000/Image PC (System Biotech Molecular Biology Instruments, USA)
- termomikser Compact (Eppendorf, USA)
- termocykler PTC 200 (MJ Research, USA)
- waga elektroniczna WPE 600 (Radwag, Polska)
- wirówka Centrifuge 5415D/R (Eppendorf, USA)
- wirówka MiniSpin (Eppendorf, USA)
- worteks WL-1 (Biomix, Polska)
- wytwornica lodu płatkowego iShin IF 300-150 (Biocom, USA)
- zamrażarka niskotemperaturowa Joun VXE 380 (Kendromed, Polska)

3.1.4. Materiał biologiczny

3.1.4.1. Standaryzowane preparaty roślinne

W ramach eksperymentu analizującego wpływ standaryzowanych preparatów roślinnych na poziom transkrypcji wybranych izoform cytochromu P450 z wykorzystaniem zwierząt modelowych (szczur), na który uzyskano zgodę Lokalnej Komisji Etycznej nr 43/2005, zgromadzono następujący materiał roślinny o zdefiniowanej zawartości wybranych związków biologicznie aktywnych pozyskany od wymienionych producentów/dostawców:

- płynny wyciąg z ziela jeżówki purpurowej (*Echinacea purpurea*) o zawartości związków polifenolowych w przeliczeniu na kwas kawowy 3,7% (Phytopharm Klęka S.A.);

- suchy wyciąg z nasion soi zwyczajnej (*Glycine max*) o zawartości 37% izoflawonów w przeliczeniu na genisteinę (RP-HPLC-DAD, detekcja przy 262 nm), (Pierre Fabre Sante, Francja);
- granulat czosnku pospolitego (*Allium sativum*) o zawartości 0,81% allicyny, (met. Ph.Eur.V) (PZZ Herbapol S.A., Poznań);
- suchy wyciąg alkoholowy z korzenia kozłka lekarskiego (*Valeriana officinalis*) o zawartości 0,82% sekwiterpenów w przeliczeniu na kwas walerenowy (HPLC) zgodnie z Farmakopeą Francuską X (Phytopharm Klęka S.A.);
- suchy wyciąg z liści zielonej herbaty (*Camellia sinensis*) o zawartości 61,0% katechin i 0,1% kofeiny (HPLC) (TTD International, Australia);
- suchy wyciąg alkoholowy z ziela dziurawca zwyczajnego (*Hypericum perforatum*) o zawartości hiperycyny 0,3% i hiperforyny 0,61% (HPLC), (Phytopharm Klęka S.A.);
- suchy wyciąg alkoholowy z liści miłorzębu dwuklapowego (*Ginkgo biloba*) o zawartości 24,5% glikozydów flawonolowych; 13,0% laktonów terpenowych (Ginkgolidy A+B+C+Bilob.) i 5ppm kwasu ginkgolowego, (Martin Bauer S.p.A.);
- suchy wyciąg alkoholowy z korzenia żeń-szenia (*Panax ginseng*) o zawartości 27,1% ginsenozydów w przeliczeniu na Rg1 (Phytopharm Klęka S.A).

W związku z tym, że skład ekstraktów zależy, obok czynników związanych z surowcem, również od metody ekstrakcyjnej oraz jej warunków, przeprowadza się proces standaryzacji. Doprowadza on przetwór roślinny lub produkt leczniczy roślinny do określonej zawartości składnika lub grupy składników o znanej aktywności terapeutycznej odpowiednio przez dodanie substancji pomocniczych lub przez zmieszanie przetworów roślinnych [Rozporządzenie MZ, 11.08.2005r.].

3.1.4.2. Zwierzęta doświadczalne

Badania wykonano na zwierzętach laboratoryjnych - samcach szczura szczepu Wistar o masie ciała 220-250 g, pochodzących z punktu Hodowli Zwierząt Laboratoryjnych w Brwinowie. Zwierzęta przetrzymywano w zwierzętarni Katedry i Zakładu Farmakologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, w plastikowych klatkach, w pomieszczeniach o temperaturze ok. 20°C i wilgotności 60% z 12-to godzinnym cyklem oświetleniowym. i karmiono standardową paszą oraz udostępniono wodę *ad libitum*. Po zakończeniu fazy

doświadczalnej szczury poddano dekapitacji a następnie, po pobraniu materiału biologicznego wykorzystanego w pracy, oddano do utylizacji.

3.2. Metody

3.2.1. Procedura projektu badawczego z wykorzystaniem modelu *in vivo*

Procedura doświadczalna przebiegała zgodnie z ustawą o ochronie zwierząt (Dz. U. 97.111.724, 1997). Na przeprowadzenie doświadczenia na zwierzętach uzyskano zgodę Lokalnej Komisji Etycznej nr 43/2005. Po trwającym 14 dni okresie aklimatyzacji zastosowane w pracy zwierzęta doświadczalne podzielono losowo na grupy o liczebności 10 sztuk każda. Ze względu na liczebność prób doświadczenie przeprowadzone zostało w dwóch seriach. Część farmakologiczną badań wykonano w Katedrze i Zakładzie Farmakologii UM w Poznaniu. W pierwszej części eksperymentu zwierzęta otrzymywały syntetyczne substancje o charakterze induktorów i inhibitorów aktywności badanych enzymów wątrobowych CYP450 dla ustalenia modelu wzorcowego indukcji bądź inhibicji. Model ten miał posłużyć jako punkt odniesienia do stosowanych w drugim etapie preparatów roślinnych. Każda z grup zwierząt otrzymała przez okres 3 lub 10 dni jedną spośród wymienionych w Tabeli 17. substancji syntetycznych (wzorcowych) w opisanej dawce.

Tabela 17. Zestawienie dawek preparatów syntetycznych użytych w doświadczeniu

Nazwa preparatu	Dawka/droga podania
Induktory	
β -naftoflawon (CYP1A2)	100 mg/kg/ i.p.
Izoniazyd (CYP2E1)	150 mg/kg/ i.p.
Inhibitory	
Cymetydyna (CYP1A2)	100 mg/kg/ p.o.
Dietyloditiokarbaminian (CYP2E1)	200 mg/kg/ i.p.

Cymetydyna podana została dożołądkowo (p.o.), natomiast pozostałe preparaty dootrzewnowo (i.p.). Przygotowanie dawek i ustalenie drogi podania poprzedzono przeglądem literatury w zakresie badań *in vivo* z zastosowaniem wymienionych substancji oraz konsultacjami ze specjalistą w zakresie farmakologii. Wytypowano dawki syntetyków, przy których wykazują one efekt farmakologiczny pod względem modulacji ekspresji analizowanych enzymów.

W drugiej części doświadczenia losowo wydzielone grupy zwierząt otrzymywały jeden spośród wymienionych w Tabeli 18. preparatów roślinnych przez 3 lub 10 dni w jednorazowej dawce dobowej przypisanej poniżej.

Tabela 18. Zestawienie dawek preparatów roślinnych użytych w doświadczeniu

Nazwa rośliny	Zastosowane dawkowanie
<i>Echinacea purpurea</i>	50 mg/kg, p.o.
<i>Glycine max</i>	100 mg/kg, p.o.
<i>Allium sativum</i>	250 mg/kg, p.o.
<i>Valeriana officinalis</i>	300 mg/kg, p.o.
<i>Camellia sinensis</i>	300 mg/kg, p.o.
<i>Hypericum perforatum</i>	300 mg/kg, p.o.
<i>Gingko biloba</i>	200 mg/kg, p.o.
<i>Panax ginseng</i>	30 mg/kg, p.o.

Zwierzęta utrzymywano w pozycji poziomej i podawano preparat za pomocą metalowej sondy. Dawki ustalono na podstawie przeglądu doniesień literaturowych oraz konsultacji z farmaceutami, adekwatnie do najczęściej stosowanych i wykazujących efekty farmakologiczne. Przy określaniu dawek uwzględniono zachowanie możliwości ekstrapolacji wyników pozyskanych z eksperymentu na człowieka. Równoległe, zarówno dla pierwszej jak i drugiej części doświadczenia, wydzielono grupy zwierząt kontrolnych karmionych standardową dietą przez okres odpowiednio 3 i 10 dni.

Po upływie 16h od podania ostatniej dawki preparatu zwierzęta poddano dekapitacji a następnie wypreparowano prawe płaty wątroby, które zamrożono w ciekłym azocie (-196°C) a następnie w temperaturze -80°C. Materiał biologiczny w postaci tkanki wątrobowej szczegółowo oznakowano dla wykluczenia błędów laboratoryjnych na pierwszych etapach badań. Ilość zgromadzonej tkanki umożliwiła wykonanie powtórzeń analiz. Z tkanki otrzymano wysokiej jakości RNA, a następnie zoptymalizowano procedurę odwrotnej transkrypcji z użyciem odpowiednich odczynników. Dalsze prace nad ilościowym pomiarem poziomu ekspresji genów badanych izoenzymów wykonano w Zakładzie Farmakologii i Biologii Doświadczalnej oraz w Zakładzie Badania Jakości Produktów Leczniczych i Suplementów Diety Instytutu Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich w Poznaniu.

3.2.2. Izolacja całkowitego RNA z tkanki wątrobowej

Izolację całkowitego komórkowego RNA z pobranych tkanek przeprowadzono z użyciem odczynnika TriPure Isolation Reagent (Roche) według zmodyfikowanej metody Chomczyńskiego i Sacchi. W tym celu wykorzystano 20 mg tkanki pobranej z organu w jałowych warunkach a następnie materiał biologiczny zalano 1 ml odczynnika TriPure oraz poddano homogenizacji mechanicznej przez około 1 min w celu precyzyjnego zawieszenia komórek wątroby w tym odczynniku. Następnie do zawartości probówek dodano chloroform w objętości równej 1/5 objętości odczynnika TriPure (200 μ l) i probówki wytrząsano przez ok. 15 s a następnie inkubowano w temperaturze pokojowej przez 5 min, po czym ponownie intensywnie wytrząsano przez 15 s i wirowano w warunkach 12 000 x g, 4°C przez okres 15 min. Następnie zebrano górną fazę w ilości ok. 600 μ l (objętość zebranej fazy stanowiła ok. 60% objętości podanego TriPure) w której znajdował się RNA, przeniesiono do świeżej probówki i podano do niej izopropanol w stosunku objętościowym 1:1. Zawartość probówek zmieszano i umieszczono na czas 30 min w temperaturze -80°C. Po rozmrożeniu probówki z zawartością poddano wirowaniu w warunkach 4°C, 12 000 x g przez 10 min. Następnie usunięto supernatant, a osad RNA płukano jednokrotnie w 1 ml 75% etanolu przygotowanego z użyciem wody dejonizowanej i autoklawowanej w obecności DEPC (1ml etanolu na 1ml użytego TriPure), worteksowano 1 min i pozostawiono na lodzie w celu 2-3 min inkubacji. Tak przygotowane próby wirowano przez okres 5 min, w warunkach 7500 x g, 4°C, po czym usunięto etanol pod komorą laminarną, gdzie pozostawiono próby RNA w celu ich wysuszenia na okres 15 min. Po tym czasie do probówek podano 100 μ l wody wolnej od RNaz i w celu pełnego rozpuszczenia RNA probówki umieszczono w termobloku w temperaturze 65°C na czas 5 min. Po upływie inkubacji probówki z zawartością wymieszano i zwirowano a następnie przechowywano w temperaturze -80°C. W końcowym etapie próby RNA poddano analizie jakościowej i ilościowej, po czym wykorzystywano jako matrycę do syntezy cDNA w procesie odwrotnej transkrypcji.

3.2.3. Analiza ilościowa i jakościowa preparatów RNA

Dla oceny ilościowej i jakościowej preparatów RNA posłużono się pomiarem spektrofotometrycznym. Próby RNA rozcieńczono H₂O w proporcji 1 μ l RNA: 99 μ l H₂O,

zworteksowano i zwirowano. Do kalibracji spektrofotometru wykorzystano 100 μ l H₂O. Odczyt przeprowadzano przy trzech długościach fali elektromagnetycznej:

260 nm – maksimum absorpcji dla RNA

280 nm – maksimum absorpcji dla białek

320 nm – absorpcja dla drobin komórkowych (tzw. tło)

Do obliczeń posłużono się wartościami OD₂₆₀ i OD₂₈₀ po odjęciu wartości tła (OD₃₂₀).

Przyjmuje się, że wartość OD₂₆₀ (gęstość optyczna, ang. *optical density*) równa jest 1 dla dsDNA o stężeniu 50 μ g/ml, ssDNA o stężeniu 33 μ g/ml oraz dla RNA o stężeniu 40 μ g/ml.

W związku z tym stężenie RNA obliczano według podanego poniżej wzoru:

$$\text{Stężenie RNA } [\mu\text{g/ml}] = \text{OD}_{260} \cdot 40 \cdot R$$

gdzie:

R - krotność rozcieńczenia.

O wysokiej czystości preparatu, a więc i jego jakości, świadczyła wartość stosunku A₂₆₀/A₂₈₀ mieszcząca się w granicach pomiędzy 1,80 - 2,0. Jakość prób RNA określono również na podstawie analizy elektroforetycznej w 1% żelu agarozowym, w buforze 1 x TBE. Dla wizualizacji RNA przy długości fali 312 nm do żelu podawano bromek etydyny (0,5 μ g/ml). Rozdział elektroforetyczny prowadzony był przez okres 1h, przy napięciu 60V (7,5 V/cm) a następnie wizualizowany na transluminatorze w świetle UV. Próbki RNA przechowywano w temperaturze -80°C.

3.2.4. Synteza cDNA

Reakcja odwrotnej transkrypcji wykonana została według protokołu producenta przy użyciu zestawu SuperScript First Strand Synthesis System (Invitrogen) i z wykorzystaniem termocyklera PTC 200 DNA Engine Gradient Cycler firmy MJ Research, Inc. Reakcje odwrotnej transkrypcji przeprowadzano w 1,5 ml probówkach a całą procedurę wykonywano pod komorą laminarną, na lodzie. Do 2 μ g RNA rozpuszczonego w wodzie wolnej od RNaz podano 1 μ l mieszaniny deoksyrybonukleotydów (dNTP) (stężenie wyjściowe 10 mM), 1 μ l oligo(dT)₂₀ (0,5 μ g/ μ l) i uzupełniono wodą wolną od RNaz do objętości 10 μ l. Zawartość probówki mieszano, probówkę wirowano przez 30 s i umieszczono w termobloku na 5 min w temperaturze 65°C w celu denaturacji RNA. Następnie probówkę przenoszono do lodu na 2 min, wirowano, ponownie umieszczano w lodzie i dodawano następujące składniki: 4 μ l MgCl₂ (stężenie wyjściowe 25 mM), 2 μ l 10x stężonego buforu (First Strand Buffer, Invitrogen), 2 μ l DTT (0,1M, Invitrogen), 1 μ l odwrotnej transkryptazy SuperScript III RT

(200U/ μ l) oraz 1 μ l inhibitora rybonukleaz Rnase OUT (40U/ μ l, Invitrogen). Probówkę wstrząsano, krótko wirowano i umieszczano w termobloku. Syntezę cDNA prowadzono w czasie 50 min w temperaturze 50°C. Po zakończeniu syntezy probówki poddawano działaniu temperatury 85°C przez 5 min w celu zatrzymania reakcji. Następnie podawano 1 μ l RNase H i inkubowano 20 min w temperaturze 37°C. Po zakończeniu procedury probówki z cDNA przechowywano w temperaturze -20°C. W ten sposób uzyskany cDNA posłużył jako matryca do reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym.

3.2.5. Łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym

Zmiany poziomu ekspresji badanych genów wyznaczano w reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym. Reakcję przeprowadzano w szklanych kapilarach, w końcowej objętości 10 μ l, z wykorzystaniem cDNA pozyskanego w reakcji odwrotnej transkrypcji, specyficznych par starterów (TIB Molbiol) oraz zestawu Fast Start DNA Master Sybr Green I (Roche Diagnostic). Do amplifikacji posłużył aparat LightCycler realtime PCR detection system (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), natomiast oprogramowanie LightCycler3 Run Version 5.32 i LightCycler Data Analysis Version 3.5.28 pozwoliło na analizowanie uzyskanych wyników oraz porównanie względnych różnic ilości początkowej matrycy. Poziom poszczególnych transkryptów standaryzowano względem poziomu transkryptu genu referencyjnego *GAPDH* (ang. *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*), którego ekspresja jest stała w warunkach eksperymentu. Skład mieszaniny reakcyjnej na pojedynczą próbę dla poszczególnych genów przedstawiono w Tabeli 19.

Tabela 19. Skład mieszaniny reakcyjnej PCR w czasie rzeczywistym (składniki podano w kolejności dodawania)

Amplifikowany gen	Skład mieszaniny reakcyjnej
<i>CYP1A2</i> <i>CYP2E1</i>	<ul style="list-style-type: none"> • 6,9 μl wody wolnej od RNaz • 0,6 μl MgCl₂ (stężenie końcowe 2,5 mM) • 0,25 μl starter pierwszy (stężenie końcowe 0,5μM) • 0,25 μl starter drugi (stężenie końcowe 0,5μM) • 1μl LightCycler Fast-Start Reaction Mix SYBR Green I, 10 x stężony • 1 μl cDNA
<i>AHR</i> <i>GAPDH</i>	<ul style="list-style-type: none"> • 7,1 μl wody wolnej od RNaz • 0,4 μl MgCl₂ (stężenie końcowe 2,5 mM) • 0,25 μl starter pierwszy (stężenie końcowe 0,5μM) • 0,25 μl starter drugi (stężenie końcowe 0,5μM) • 1μl LightCycler Fast-Start Reaction Mix SYBR Green I, 10 x stężony • 1 μl cDNA

Sekwencje badanych genów z podziałem na eksony i introny uzyskano w bazie danych Ensembl (wg. www.ensembl.org) i na ich podstawie projektowano startery przy użyciu programu Oligo 5.0 (National Biosciences). Startery dla genu *CYP1A2* syntetyzowano według *Michaud i wsp.* [2005]. Sekwencje starterów oraz wielkości produktów przedstawiono w Tabeli 20.

Tabela 20. Sekwencje starterów użytych do reakcji PCR w czasie rzeczywistym

Gen	GenBank	Sekwencja startera Forward (5' → 3')	Sekwencja startera Reverse (5' → 3')	Wielkość produktu (pz)
<i>CYP1A2</i>	NM_012541	CATCTTTGGAGCTGGATTTG	CCATTCAGTGAGGTGTCC	255
<i>AHR</i>	NM_013149	ATAGCTACTCCACTTCAGCC	TCATGCCACTTTCTCCAGTC	244
<i>CYP2E1</i>	NM_031543	CCTTTCCTCTTCCCATCC	AACCTCCGCACATCCTTCC	278
<i>GAPDH</i>	NM_017008	GATGGTGAAGGTCGGTGTG	ATGAAGGGGTCGTTGATGG	108

Ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym obejmowała kilka następujących po sobie etapów i przebiegała w określonych poniżej warunkach (Tabela 21.).

Tabela 21. Parametry reakcji PCR w czasie rzeczywistym

Etap	<i>CYP1A2</i>	<i>AHR</i>	<i>CYP2E1</i>	<i>GAPDH</i>
Denaturacja wstępna	95°C, 600s	95°C, 600s	95°C, 600s	95°C, 600s
Denaturacja	95°C, 8s	95°C, 8s	95°C, 8s	95°C, 4s
Hybrydyzacja starterów	53°C, 8s	55°C, 6s	55°C, 8s	56°C, 8s
Synteza nici komplementarnej	72°C, 8s	72°C, 8s	72°C, 8s	72°C, 8s
Synteza końcowa	70°C, 20s	70°C, 20s	70°C, 20s	70°C, 20s
Liczba cykli	35	35	30	30

Reakcje przeprowadzano w cyklach obejmujących etapy 2, 3 i 4 po czym nastąpiło topienie produktów reakcji polegające na stopniowym wzroście temperatury do wartości 99°C. Ilość transkryptu wyznaczano z krzywej wzorcowej, którą sporządzono poprzez wykorzystanie rozcieńczeń cDNA uzyskanego po odwrotnej transkrypcji mRNA. Uzyskane wyniki pochodzą z co najmniej dwóch powtórzeń reakcji standaryzowanych wobec genu referencyjnego *GAPDH* i przedstawione są w postaci wykresów jako wartość względna w odniesieniu do grupy kontrolnej.

3.2.6. Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji *real-time* PCR

W celu identyfikacji amplifikowanych fragmentów cDNA próby przygotowano poprzez dodanie 3 μ l buforu obciążającego do 10 μ l produktu PCR w czasie rzeczywistym i rozdzielano elektroforetycznie w 1,5% żelu agarozowym w warunkach napięcia 5 V/cm w buforze 1x TBE wobec molekularnego markera masy 100bp (Fermentas). Dla celów wizualizacji uzyskanych produktów reakcji z wykorzystaniem promieniowania ultrafioletowego o długości 312 nm, żel zawierał bromek etydyny (0,5 μ g/ml). Po rozdziale żel fotografowano.

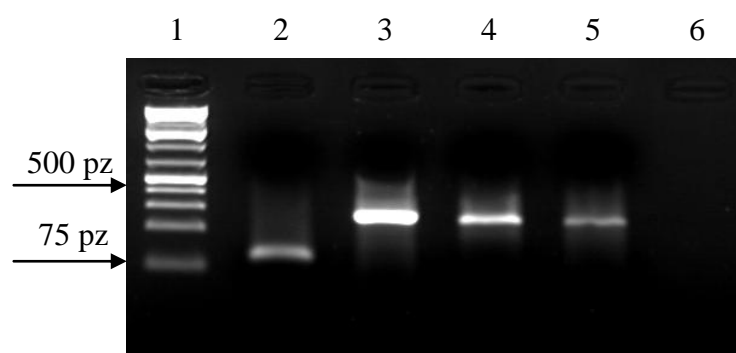
3.2.7. Analiza statystyczna wyników

Wyniki końcowego etapu badań z wykorzystaniem wyciągów roślinnych oraz substancji syntetycznych opracowano w programie Microsoft Excel. Do analizy wykorzystano wyniki pochodzące z co najmniej dwóch niezależnych powtórzeń. Wyniki badań poszczególnych osobników były standaryzowane wobec genu referencyjnego *GAPDH* oraz uśredniane, po czym obliczono wartość średnią dla badanej grupy osobników, wartość odchylenia standardowego oraz SEM. Uzyskane rezultaty badań przedstawiono na wykresach obrazujących poziom ekspresji analizowanych izoform cytochromu P450 w zależności od zastosowanego preparatu i ekstraktu oraz okresu podawania. Ponadto utworzono bazę danych ze średnimi wartościami poziomu mRNA analizowanych genów dla każdej z prób w Edytorze Danych SPSS 17.0 PL dla Windows. Przy pomocy tego programu statystycznego, z wykorzystaniem testu jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA obliczono poziom istotności, przy czym wartość $p < 0,05$ uznano za statystycznie znaczącą. Dla określenia różnic pomiędzy średnimi w badanych grupach wykonano test Tukeya oparty na studentyzowanym rozstępie, który umożliwia porównanie i określenie istotności różnic pomiędzy parami średnich przy jednakowym poziomie istotności.

4. WYNIKI

4.1. Identyfikacja amplikonów badanych genów

W celu identyfikacji długości amplifikowanych fragmentów cDNA, będących produktami reakcji PCR w czasie rzeczywistym dla genów *CYP1A2*, *CYP2E1*, *AHR* oraz genu referencyjnego *GAPDH*, przeprowadzono rozdzielanie elektroforetyczne w 1,5% żelu agarozowym w buforze 1x TBE. Końcowy obraz analizy elektroforetycznej trwającej ok. 1,5h w warunkach napięcia 5 V/cm oceniany w świetle UV przedstawia Rycina 9.



Rycina 9. Analiza elektroforetyczna amplikonów reakcji PCR w czasie rzeczywistym. Rozdzielanie prowadzone w 1,5% żelu agarozowym. Tor1- marker wielkości 1kb; tor2- produkt *GAPDH* (108pz); tor3- produkt *CYP2E1* (278pz); tor4- produkt *CYP1A2* (255pz); tor5- produkt *AHR* (244pz); tor6- kontrola reakcji.

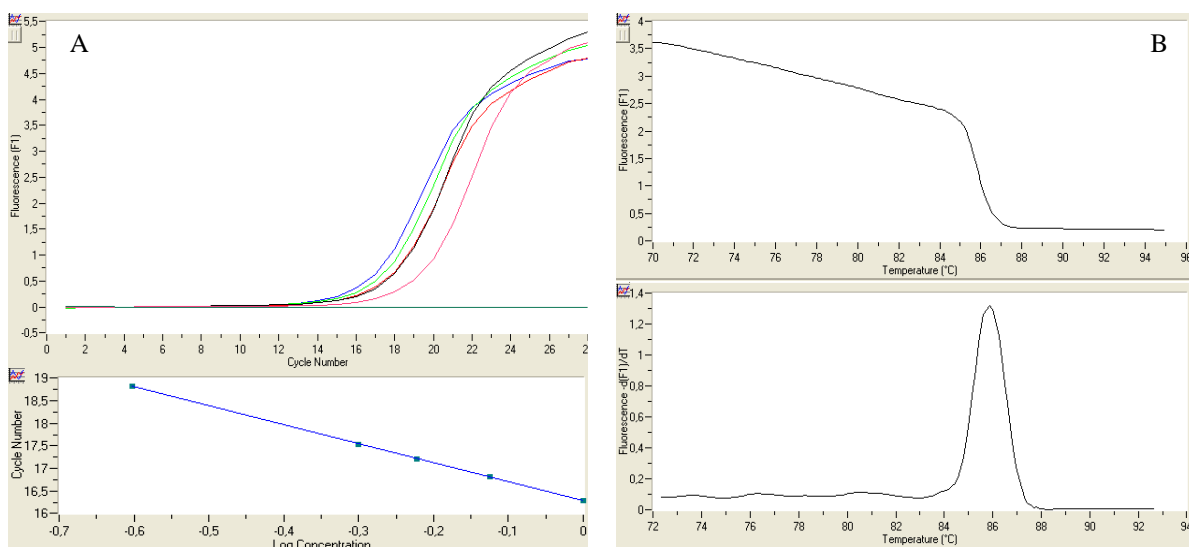
4.2. Wykreślenie krzywych standardowych oraz charakterystyka temperatury topnienia amplikonów badanych genów

Poziomą ekspresję badanych genów oraz genu referencyjnego mierzono z wykorzystaniem reakcji PCR w czasie rzeczywistym przy użyciu par starterów komplementarnych i specyficznych do sekwencji kodującej. Ilość transkryptu każdego z badanych genów wyznaczano z krzywej wzorcowej, którą sporządzono z wykorzystaniem rozcieńczeń cDNA uzyskanego w reakcji odwrotnej transkrypcji. Wyniki uzyskane dla poszczególnych grup badanych zwierząt wyrażone zostały w odniesieniu do wartości dla odpowiednich grup kontrolnych. Poziomą transkrypcję u zwierząt nie otrzymujących żadnego z badanych preparatów określono jako 100%. Wyniki standaryzowano wobec genu referencyjnego *GAPDH* dla którego również wykreślono krzywą standardową. Poniżej przedstawiono wykresy obrazujące wyznaczanie temperatury topnienia (ang. *melting temperature*) produktów amplifikacji, przebieg reakcji amplifikacji i krzywe wzorcowe.

Pojedyncze szczyty krzywych topnienia produktów cDNA badanych genów oraz *GAPDH* wskazują na specyficzną amplifikację.

4.2.1. Krzywa standardowa oraz T_m dla produktu amplifikacji cDNA *GAPDH*

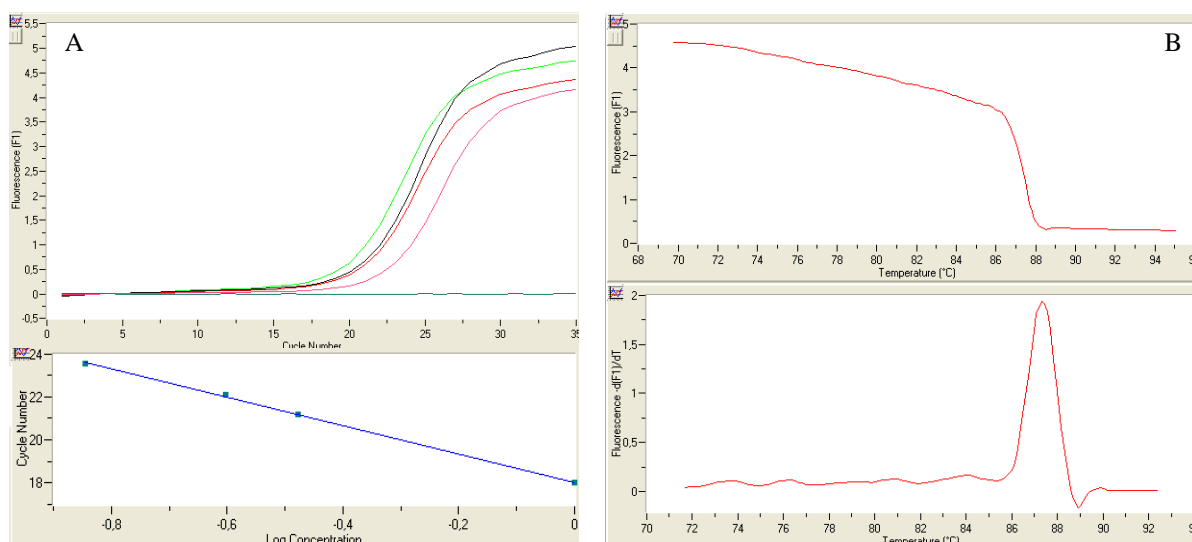
Krzywą standardową dla produktu genu *GAPDH* wyznaczoną na podstawie amplifikacji przy rozcieńczeniach cDNA oraz T_m przedstawiono na Rycinie 10A. Analiza krzywej topnienia wykazała obecność produktu amplifikacji o T_m równej $85,90^{\circ}\text{C}$ i pozwoliła na określenie specyficzności reakcji (Rycina 10B).



Rycina 10. Przebieg reakcji PCR w czasie rzeczywistym dla produktu *GAPDH* przy różnych rozcieńczeniach cDNA oraz krzywa wzorcowa (A). Współczynnik nachylenia krzywej $-3,92$; błąd pomiaru wynosi $0,006$. Wyznaczanie temperatury topnienia produktu reakcji PCR w czasie rzeczywistym dla genu *GAPDH* (B). $T_m = 85,90^{\circ}\text{C}$.

4.2.2. Krzywa standardowa oraz T_m dla produktu amplifikacji cDNA *CYP1A2*

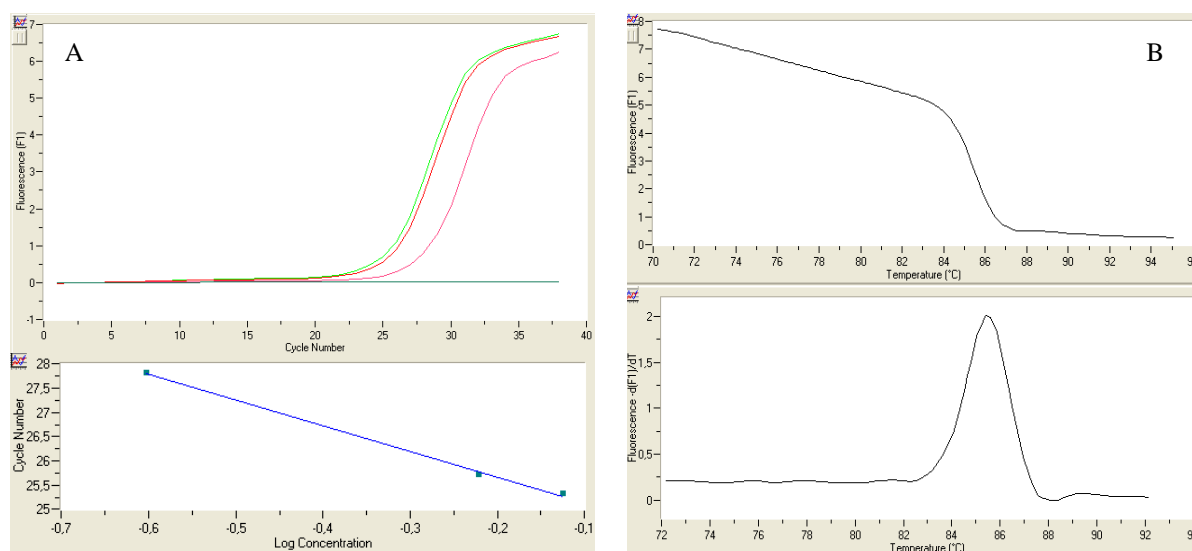
Krzywą standardową dla produktu cDNA genu *CYP1A2* wyznaczoną na podstawie amplifikacji przy rozcieńczeniach matrycy oraz T_m przedstawiono na Rycinie 11A. Analiza krzywej topnienia wykazała obecność produktu amplifikacji o T_m równej $87,29^{\circ}\text{C}$ i pozwoliła na określenie specyficzności reakcji (Rycina 11B).



Rycina 11. Przebieg reakcji PCR w czasie rzeczywistym dla produktu CYP1A2 przy różnych rozcieńczeniach cDNA oraz krzywa wzorcowa (A). Współczynnik nachylenia krzywej $-4,12$; błąd pomiaru wynosi $0,0252$. Wyznaczanie temperatury topnienia produktu reakcji PCR w czasie rzeczywistym dla genu *CYP1A2* (B). $T_m = 87,29^{\circ}\text{C}$.

4.2.3. Krzywa standardowa oraz T_m dla produktu amplifikacji cDNA AhR

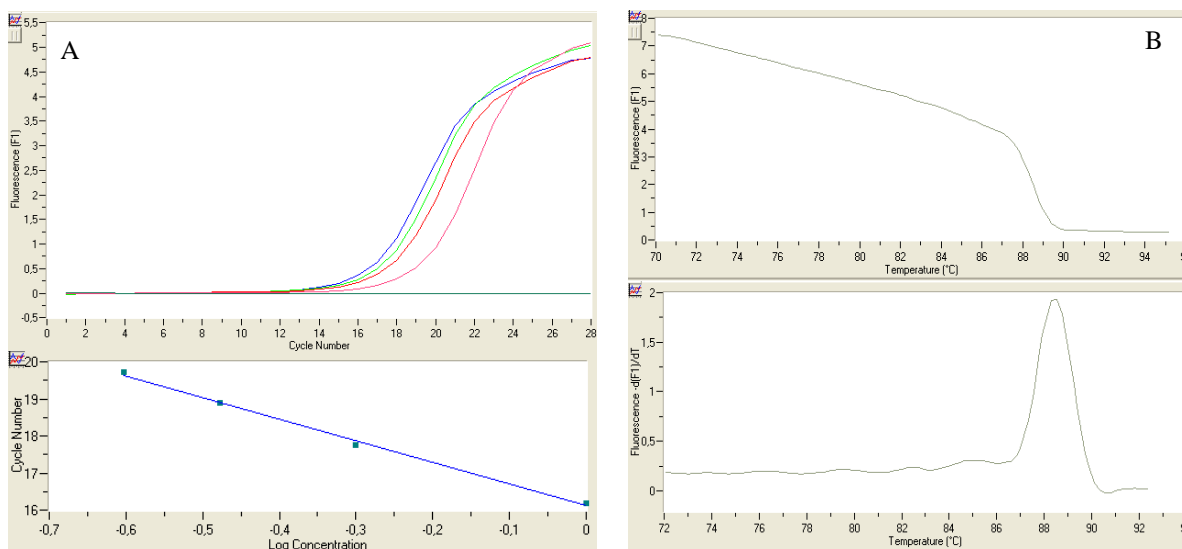
Krzywą standardową dla cDNA AhR wyznaczoną na podstawie amplifikacji produktu przy rozcieńczeniach cDNA oraz T_m przedstawiono na Rycinie 12A. Analiza krzywej topnienia wykazała obecność produktu amplifikacji o T_m równej $85,50^{\circ}\text{C}$ i pozwoliła na określenie specyficzności reakcji (Rycina 12B).



Rycina 12. Przebieg reakcji PCR w czasie rzeczywistym dla produktu AhR przy różnych rozcieńczeniach cDNA oraz krzywa wzorcowa (A). Współczynnik nachylenia krzywej $-3,78$; błąd pomiaru wynosi $0,029$. Wyznaczanie temperatury topnienia produktu reakcji PCR w czasie rzeczywistym dla genu *AHR* (B). $T_m = 85,50^{\circ}\text{C}$.

4.2.4. Krzywa standardowa oraz T_m dla produktu cDNA CYP2E1

Krzywą standardową dla CYP2E1 wyznaczoną na podstawie amplifikacji produktu przy rozcieńczeniach cDNA oraz T_m przedstawiono na Rycinie 13A. Analiza krzywej topnienia wykazała obecność produktu amplifikacji o T_m równej 88,44°C i pozwoliła na określenie specyficzności reakcji (Rycina 13B).



Rycina 13. Przebieg reakcji PCR w czasie rzeczywistym dla produktu CYP2E1 przy różnych rozcieńczeniach cDNA oraz krzywa wzorcowa (A). Współczynnik nachylenia krzywej -4,15; błąd pomiaru wynosi 0,035. Wyznaczanie temperatury topnienia produktu reakcji PCR w czasie rzeczywistym dla genu *CYP2E1*(B). T_m = 88,44°C.

4.3. Analiza poziomu transkryptu CYP1A2, czynnika AhR oraz CYP2E1 pod wpływem syntetycznych substancji wzorcowych

W celu wyjaśnienia mechanizmu indukcji interakcji analizowano wpływ wzorcowych syntetycznych substancji w postaci β-naftoflawonu (100 mg/kg, i.p.) jako induktora oraz cymetydyny (100 mg/kg, p.o.) wykazującej właściwości hamujące wobec enzymu CYP1A2. Jednocześnie dokonano pomiaru transkryptu czynnika AhR. Dla CYP2E1 wykorzystano izoniazyd (150 mg/kg, i.p.) będący induktorem genu oraz dietyloditiokarbamianian (200 mg/kg, i.p.) stanowiący potencjalny inhibitor aktywności tej izoformy. Wyniki standaryzowano wobec genu referencyjnego *GAPDH* i przedstawiono w postaci wykresów jako wartość względną wobec grupy kontrolnej. Kontrolę stanowiły pomiary transkryptu w tkankach zwierząt niepoddanych procedurze doświadczalnej, gdzie wartość stężenia mRNA badanych genów uznano za 100%. Zestawienie wyników pomiaru ekspresji załączono w poniższej Tabeli 22.

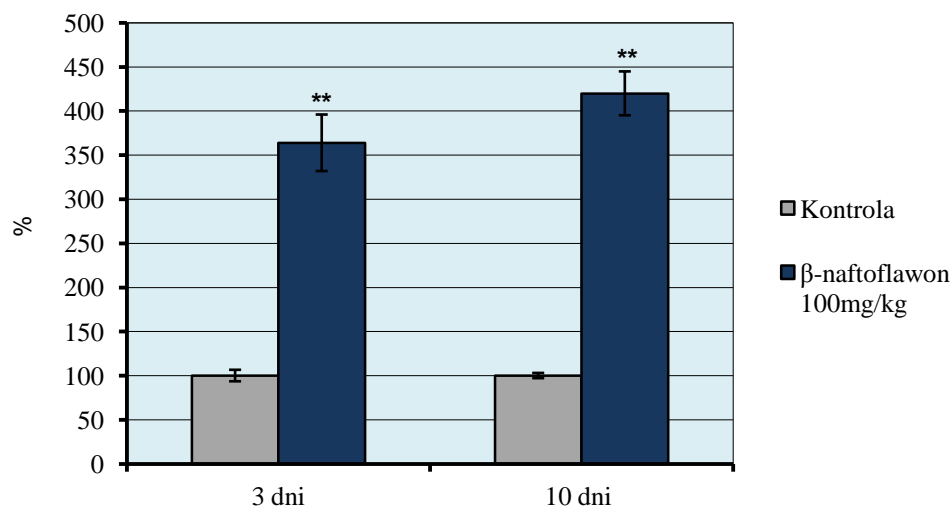
Tabela 22. Wpływ syntetycznych induktorów i inhibitorów izoform CYP na poziom ekspresji badanych genów (n = 10)

Gen	Substancja (induktor/inhibitor)	Czas podawania	Średnia ± SEM (grupa badana)	P*
CYP1A2	β-naftoflawon	3 dni	363,83 ± 32,06	<0,001
		10dni	419,89 ± 24,89	<0,001
CYP1A2	Cymetydyna	3 dni	102,87 ± 7,24	0,714
		10 dni	85,94 ± 8,80	0,208
AHR	β-naftoflawon	3 dni	110,74 ± 12,83	0,468
		10 dni	128,25 ± 5,79	0,096
AHR	Cymetydyna	3 dni	144,64 ± 13,58	0,014
		10 dni	139,55 ± 2,14	<0,001
CYP2E1	Izoniazyd	3 dni	166,43 ± 25,10	0,007
		10 dni	162,67 ± 12,83	0,003
CYP2E1	Dietyloditiokarbamianian	3 dni	85,89 ± 11,01	0,249
		10 dni	73,86 ± 12,32	0,074

*Wartość $p < 0,05$ przyjęto za statystycznie istotną (jednoczynnikowa ANOVA).

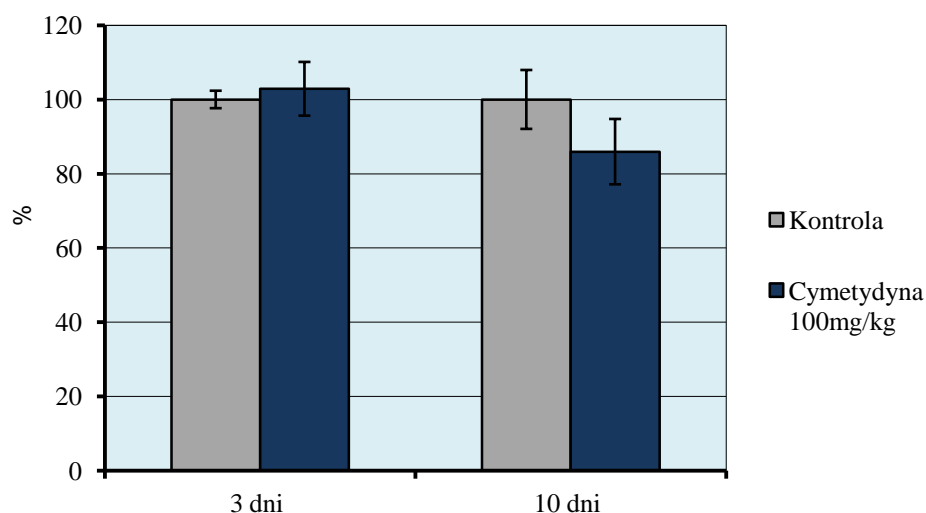
4.3.1. Zmiany poziomu mRNA CYP1A2 pod wpływem β-naftoflawonu oraz cymetydyny

Podanie β-naftoflawonu w dawce 100 mg/kg i.p. przez 3 dni wywołało wzrost poziomu mRNA CYP1A2 obserwowany w grupie zwierząt badanych do wartości ponad 360% w porównaniu do grupy kontrolnej ($p < 0,001$) (Rycina 14.).



Rycina 14. Analiza wpływu β-naftoflawonu na poziom mRNA CYP1A2. Ilość transkryptu oznaczono z wykorzystaniem techniki *real-time* PCR w komórkach wątroby szczurów rasy Wistar. Mierzone zmiany poziomu cDNA odpowiadają zmianom w ilości mRNA CYP1A2 w komórkach. Wartość ilorazu cDNA CYP1A2 do GAPDH w próbce kontrolnej przyjęto jako 100%. Na wykresie przedstawiono średnie wartości dla poszczególnych grup z zaznaczoną wartością SEM. ** $p < 0,001$.

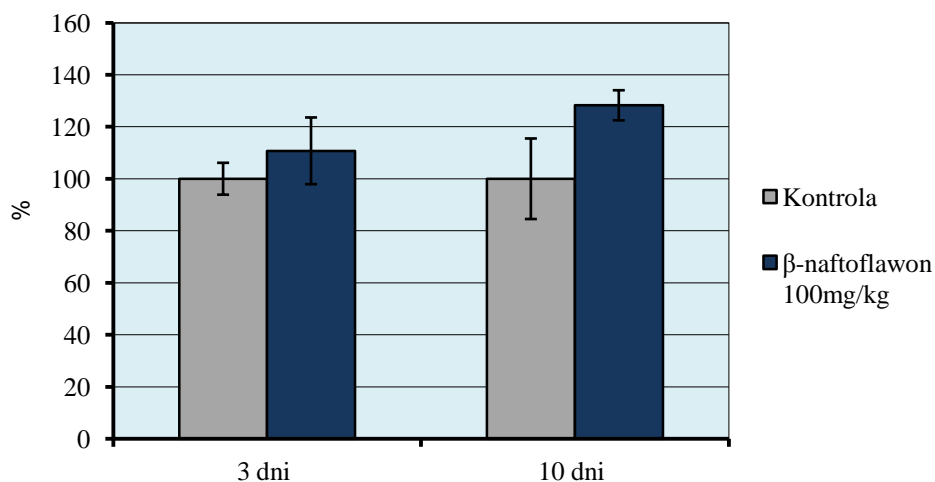
Po 10 dniach podawania β -naftoflawonu efekt indukcji utrzymał się i osiągnął wartość prawie 420% w porównaniu do zwierząt przyjmujących standardową dietę ($p < 0,001$). Cymetydyna w dawce 100 mg/kg, podawana p.o. zwierzętom przez okres 3 dni doświadczenia nie zmieniła poziomu mRNA CYP1A2 w porównaniu do grupy kontrolnej. Natomiast 10 dniowe jej stosowanie wywołało słaby efekt inhibicji na poziomie około 15% poniżej wartości zanotowanej dla zwierząt w grupie kontrolnej (Rycina 15.).



Rycina 15. Analiza wpływu cymetydyny na poziom mRNA CYP1A2. Ilość transkryptu oznaczono z wykorzystaniem techniki *real-time* PCR w komórkach wątroby szczurów rasy Wistar. Mierzone zmiany poziomu cDNA odpowiadają zmianom w ilości mRNA CYP1A2 w komórkach. Wartość ilorazu cDNA CYP1A2 do GAPDH w próbie kontrolnej przyjęto jako 100%. Na wykresie przedstawiono średnie wartości dla poszczególnych grup z zaznaczoną wartością SEM. Wyniki nie uzyskały istotności statystycznej przy $p < 0,05$.

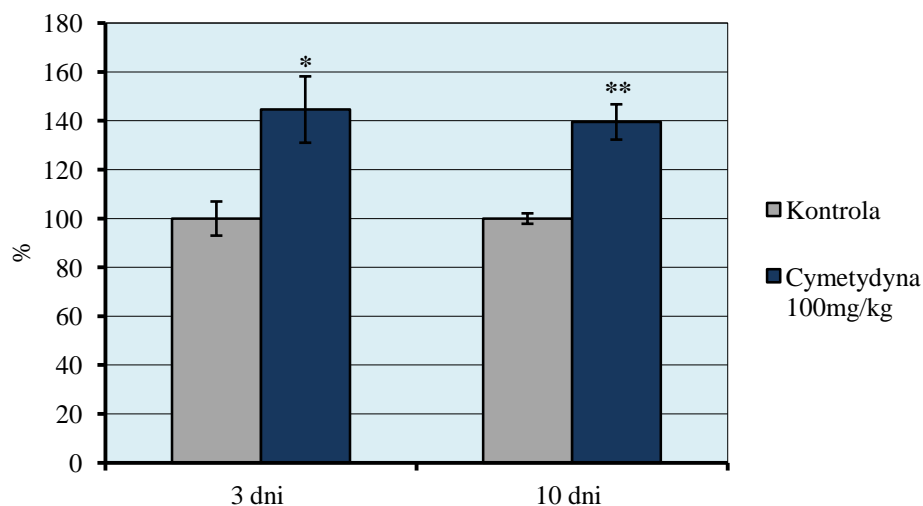
4.3.2. Zmiany poziomu mRNA czynnika AhR pod wpływem β -naftoflawonu oraz cymetydyny

Zaliczany do induktorów aktywności izoformy CYP1A2 β -naftoflawon podawany zwierzętom w dawce 100 mg/kg, i.p. przez 3 dni nie wpłynął istotnie na poziom mRNA genu *AHR*. Dłuższy okres hodowli z tym induktorem spowodował wzrost poziomu mRNA czynnika AhR o około 28% w porównaniu do grupy kontrolnej (Rycina 16.). Nie był to jednak wynik znamienny statystycznie.



Rycina 16. Analiza wpływu β -naftoflawonu na poziom mRNA czynnika AhR. Ilość transkryptu oznaczono z wykorzystaniem reakcji *real-time* PCR w komórkach wątroby szczurów rasy Wistar. Mierzone zmiany poziomu cDNA odpowiadają zmianom w ilości mRNA AHR w komórkach. Wartość ilorazu cDNA AhR do GAPDH w próbie kontrolnej przyjęto jako 100%. Na wykresie przedstawiono średnie wartości dla poszczególnych grup z zaznaczoną wartością SEM. Wyniki nie uzyskały istotności statystycznej przy $p < 0,05$.

Cymetydyna w dawce 100 mg/kg p.o. wpłynęła istotnie statystycznie na poziom transkryptu genu czynnika AhR (Rycina 17.).

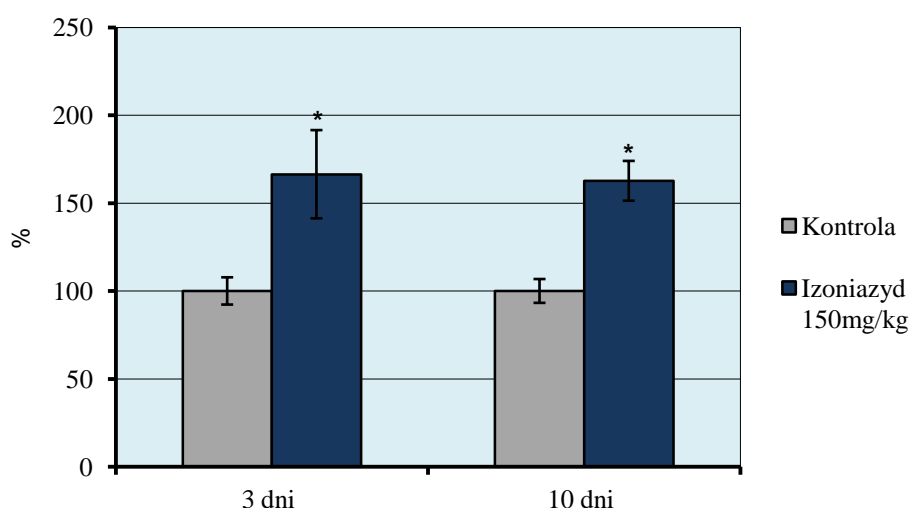


Rycina 17. Analiza wpływu cymetydyny na poziom mRNA genu czynnika transkrypcyjnego AhR. Ilość transkryptu oznaczono z wykorzystaniem techniki *real-time* PCR w komórkach wątroby szczurów rasy Wistar. Mierzone zmiany poziomu cDNA odpowiadają zmianom w ilości mRNA badanego genu w komórkach. Wartość ilorazu cDNA AHR do GAPDH w próbie kontrolnej przyjęto jako 100%. Na wykresie przedstawiono średnie wartości dla poszczególnych grup z zaznaczoną wartością SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$.

Zaobserwowano podwyższony poziom mRNA u zwierząt otrzymujących cymetydynę do wartości około 144% ($p=0,014$) oraz 139% ($p<0,001$) odpowiednio po 3 dniach i 10 dniach doświadczenia.

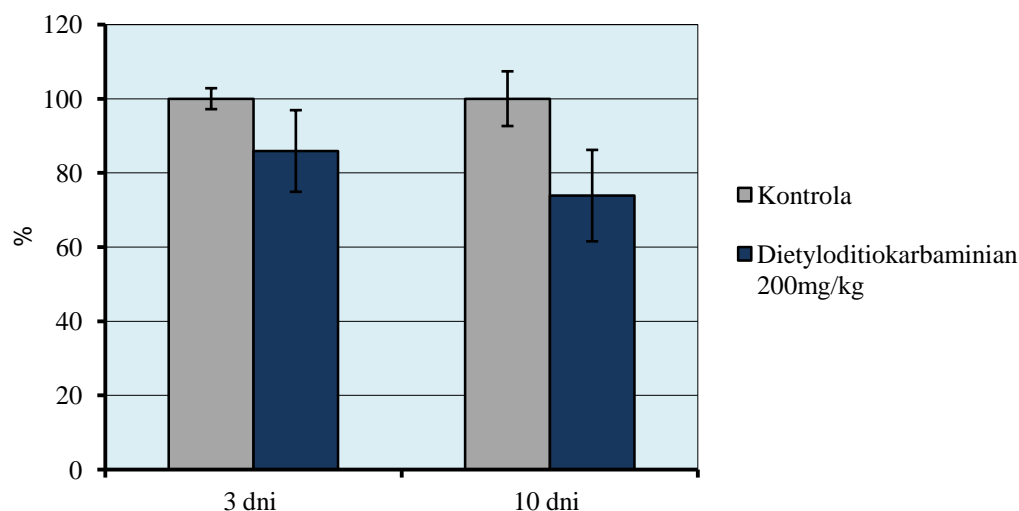
4.3.3. Zmiany poziomu mRNA CYP2E1 pod wpływem izoniazydu oraz dietyloditiokarbaminianu

W komórkach wątroby zwierząt poddanych działaniu izoniazydu przez okres 3 dni w dawce 150 mg/kg i.p. zaobserwowano zwiększone stężenie transkryptu dla badanego genu osiągające wartość ponad 166% w porównaniu z grupą kontrolną ($p=0,007$). Zwierzęta otrzymujące preparat przez 10 dni wykazywały podobną zmianę poziomu transkryptu genu CYP2E1 utrzymującą się na poziomie ponad 162% w porównaniu do grupy zwierząt kontrolnych ($p=0,003$) (Rycina 18.).



Rycina 18. Analiza wpływu izoniazydu na poziom mRNA CYP2E1. Ilość transkryptu oznaczono z wykorzystaniem techniki *real-time* PCR w komórkach wątroby szczurów rasy Wistar. Mierzone zmiany poziomu cDNA odpowiadają zmianom stężeń mRNA CYP2E1 w komórkach. Wartość ilorazu cDNA CYP2E1 do GAPDH w próbce kontrolnej przyjęto jako 100%. Na wykresie przedstawiono średnie wartości dla poszczególnych grup z zaznaczoną wartością SEM. * $p<0,05$.

Zaobserwowano, iż podawanie dietyloditiokarbaminianu w dawce 200 mg/kg i.p. przez okres 3 dni wywołuje nieznaczne obniżenie ilości transkryptu dla badanego genu rzędu ok. 15% co można uznać jedynie za tendencję do hamowania jego ekspresji. Po 10 dniach efekt hamowania nasilił się powodując spadek poziomu transkryptu o ponad 26% wobec grupy kontrolnej (Rycina 19).

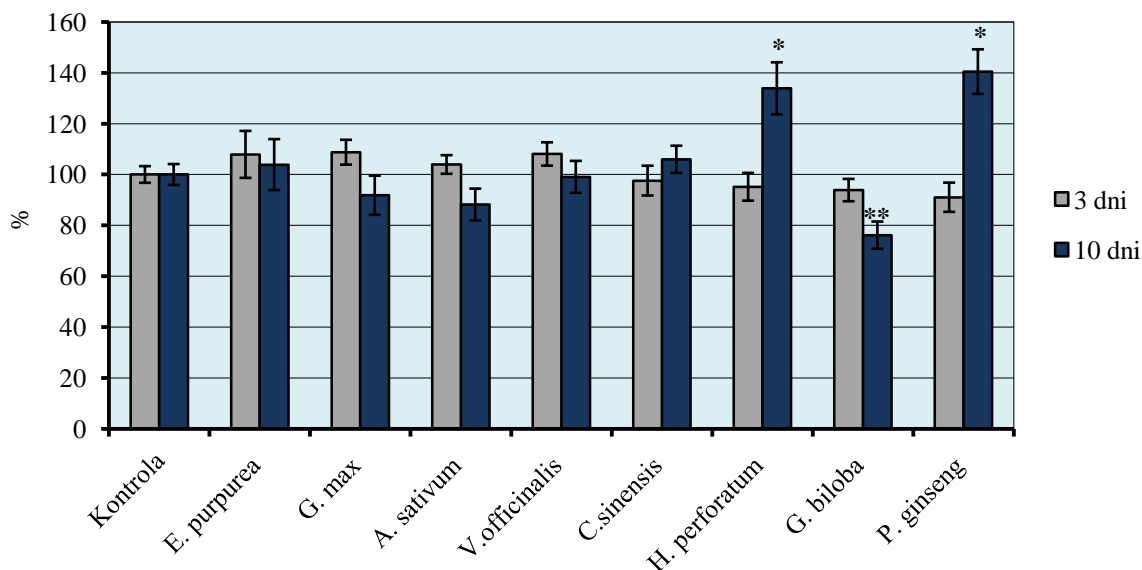


Rycina 19. Analiza wpływu dietyloditiokarbaminianu na poziom mRNA CYP2E1. Ilość transkryptu określono z wykorzystaniem techniki *real-time* PCR w komórkach wątroby szczurów rasy Wistar. Poziom cDNA odpowiada ilości mRNA CYP2E1 w komórkach. Wartość ilorazu cDNA CYP2E1 do GAPDH w próbie kontrolnej przyjęto jako 100%. Na wykresie przedstawiono średnie wartości dla poszczególnych grup z zaznaczoną wartością SEM. Wyniki nie były istotne statystycznie przy $p < 0,05$.

4.4. Analiza wpływu wyciągów roślinnych na poziom transkryptu CYP1A2, czynnika AhR oraz CYP2E1

4.4.1. Ocena poziomu transkryptu genu *CYP1A2* w zależności od zastosowanego w pracy preparatu roślinnego i czasu jego podawania

Wyniki badań wskazują na brak wpływu podawania wyciągu z ziela jeżówki purpurowej (50 mg/kg, p.o.), soi zwyczajnej (100 mg/kg, p.o.), czosnku pospolitego (250 mg/kg, p.o.), kozłka lekarskiego (300 mg/kg, p.o.) i zielonej herbaty w czasie trwania eksperymentu i przy wymienionych dawkach na ekspresję genu *CYP1A2*, mierzoną stężeniem transkryptu w komórkach wątroby szczurów względem grupy kontrolnej karmionej standardową dietą (Rycina 20.).



Rycina 20. Analiza wpływu standaryzowanych preparatów roślinnych na poziom mRNA CYP1A2. Ilość transkryptu oznaczono z wykorzystaniem techniki *real-time* PCR w komórkach wątroby szczurów rasy Wistar po 3 i 10 dniach podawania. Mierzony poziom cDNA odpowiada ilości mRNA CYP1A2 w komórkach. Wartość ilorazu cDNA CYP1A2 do GAPDH w próbie kontrolnej przyjęto jako 100%. Na wykresie przedstawiono średnie wartości dla poszczególnych grup z zaznaczoną wartością SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$.

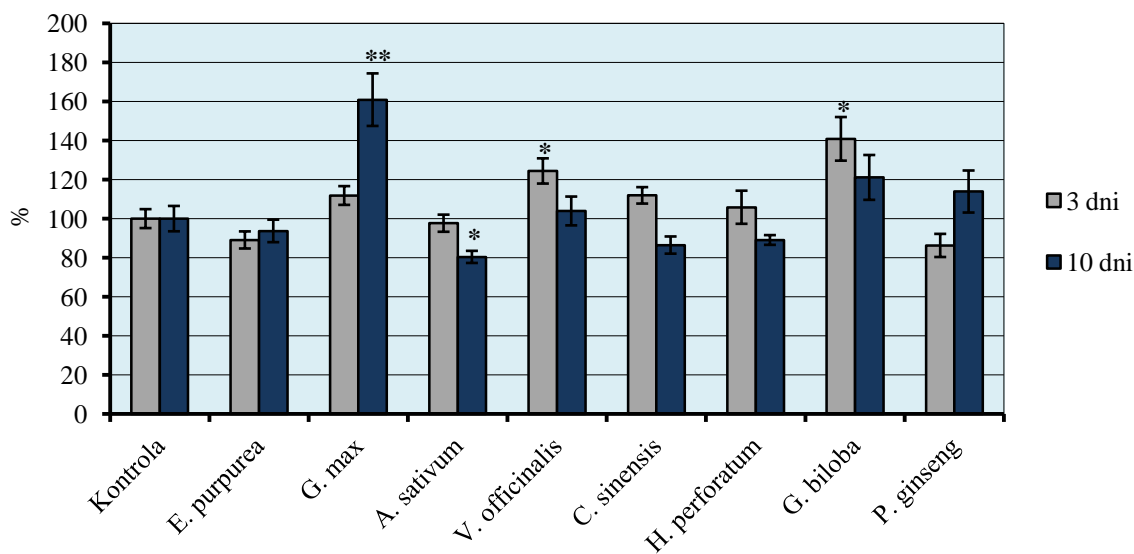
Zanotowano istotnie statystycznie ($p=0,002$) zwiększenie poziomu mRNA CYP1A2 u zwierząt otrzymujących ekstrakt z dziurawca zwyczajnego w dawce 300 mg/kg, p.o. po 10 dniach prowadzenia doświadczenia. Obserwowany efekt utrzymał się na poziomie ponad 133% względem wartości dla grupy kontrolnej. Podobne wnioski dotyczą analizy poziomu ekspresji CYP1A2 techniką *real-time* PCR w grupie zwierząt, którym podano wyciąg z żeń-szenia. W grupie tej po 10 dniach zaobserwowano istotny ($p=0,006$) wzrost ilości transkryptu badanego genu na poziomie 140% wobec grupy kontrolnej. Po 3 dniach dożołądkowego podawania standaryzowanego alkoholowego wyciągu dziurawca zwyczajnego nie zanotowano znaczących różnic w poziomie mRNA CYP1A2. Istotny statystycznie wynik wskazujący na zdolność hamowania izoformy CYP1A2 po 10 dniach stosowania wykazuje standaryzowany suchy wyciąg alkoholowy *Ginkgo biloba* w dawce dobowej 200 mg/kg p.o. U zwierząt przyjmujących preparat stwierdzono obecność transkryptu badanego genu na poziomie ponad 23% niższym niż w grupie kontrolnej ($p < 0,001$). Krótszy okres podawania wyciągu nie wpłynął znacząco na ekspresję badanego genu mierzoną stężeniem transkryptu CYP1A2 (Tabela 23).

Tabela 23. Wpływ standaryzowanych preparatów roślinnych na poziom ekspresji CYP1A2 (n = 10)

Nazwa ekstraktu	Czas podawania	Średnia ± SEM (grupa badana)	P*
<i>E. purpurea</i> (50 mg/kg)	3 dni	107,89 ± 9,24	0,479
	10 dni	103,88 ± 10,02	0,429
<i>G. max</i> (100 mg/kg)	3 dni	108,75 ± 4,89	0,173
	10 dni	91,81 ± 7,70	0,270
<i>A. sativum</i> (250 mg/kg)	3 dni	103,93 ± 3,66	0,449
	10 dni	88,17 ± 6,26	0,095
<i>V. officinalis</i> (300 mg/kg)	3 dni	108,06 ± 4,59	0,188
	10 dni	99,06 ± 6,28	0,890
<i>C. sinensis</i> (300 mg/kg)	3 dni	97,58 ± 5,86	0,744
	10 dni	105,94 ± 5,36	0,366
<i>H. perforatum</i> (300 mg/kg)	3 dni	95,16 ± 5,47	0,480
	10 dni	133,86 ± 10,25	0,002
<i>G. biloba</i> (200 mg/kg)	3 dni	93,86 ± 4,39	0,306
	10 dni	76,14 ± 5,33	<0,001
<i>P. ginseng</i> (30 mg/kg)	3 dni	91,04 ± 5,74	0,013
	10 dni	140,46 ± 8,77	0,006

4.4.2. Ocena poziomu transkryptu genu *AHR* w zależności od zastosowanego w pracy preparatu roślinnego i czasu jego podawania

W badaniu obserwowano brak istotnego wpływu standaryzowanego wyciągu jeżówki purpurowej podawanego zwierzętom przez 3 i 10 dni na poziom mRNA badanego czynnika transkrypcyjnego. W zastosowanej dawce 50 mg/kg p.o. ekstrakt ten nie wykazał zdolności modulacji poziomu ekspresji badanego genu mierzonej ilością jego transkryptu wobec grupy kontrolnej. Wyciąg z soi w dawce 100 mg/kg p.o. wykazał zdolność indukcji badanego genu co przejawiało się zwiększeniem ilości transkryptu AhR o blisko 61% po dziesięciu dniach trwania eksperymentu, przy czym dla wyniku tego uzyskano znamienność statystyczną ($p < 0,001$). Preparat czosnku zwyczajnego po 3 dniach podawania nie zmienił poziomu ekspresji AhR mierzonego techniką PCR w czasie rzeczywistym w wątrobie badanych gryzoni. W wyniku wydłużonego do 10 dni trwania doświadczenia zaobserwowano istotny statystycznie ($p = 0,012$) słaby efekt hamowania transkrypcji analizowanego genu o 20% w porównaniu do grupy zwierząt nie poddanych procedurze eksperymentalnej (Rycina 21.).



Rycina 21. Analiza wpływu standaryzowanych preparatów roślinnych na poziom mRNA AhR. Ilość transkryptu oznaczono z wykorzystaniem techniki *real-time* PCR w komórkach wątroby szczurów rasy Wistar po 3 i 10 dniach podawania. Mierzony poziom cDNA odpowiada ilości mRNA AhR w komórkach. Wartość ilorazu cDNA AhR do GAPDH w próbie kontrolnej przyjęto jako 100%. Na wykresie przedstawiono średnie wartości dla poszczególnych grup z zaznaczoną wartością SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$.

Zastosowanie ekstraktu kozłka lekarskiego w dawce 300 mg/kg p.o. przez 3 dni doświadczenia spowodowało istotne ($p=0,004$) podwyższenie ilości mRNA oznaczanego techniką *real-time* PCR o około 24% względem grupy kontrolnej. Po 10 dniach podawania zwierzętom ekstraktu *V. officinalis* nie obserwowano takiej zależności. Istnienie zależności pomiędzy podawaniem ekstraktu i czasem trwania doświadczenia oraz poziomem transkryptu w hepatocytach badanych zwierząt obserwowano również pod wpływem miłorzębu japońskiego. Suchy wyciąg alkoholowy tego surowca podawany w dawce 200 mg/kg p.o. przez 3 dni wiązał się ze zwiększoną ilością mRNA badanego genu wynoszącą 140% wobec grupy kontrolnej przyjmującej standardową dietę ($p=0,003$). Wydłużenie okresu podawania preparatu do 10 dni wiązało się ze zmniejszeniem efektu indukcji do około 121%. Analiza poziomu transkryptu AhR w zależności od wyciągów *C. sinensis*. i *H. perforatum* w dawce 300 mg/kg p.o, prowadzi do obserwacji świadczących o braku wpływu podawania ekstraktu na ekspresję czynnika AhR na poziomie mRNA. Ekstrakt zielonej herbaty wykazał tendencję do zwiększania ilości mRNA AhR po 3 dniach eksperymentu o niespełna 12% oraz obniżenia tego poziomu o niemal 14% po w dłuższym okresie czasu. Należy podkreślić, że wyniki te nie uzyskały istotności statystycznej (Tabela 24.).

Tabela 24. Wpływ standaryzowanych preparatów roślinnych na poziom ekspresji AhR (n = 10)

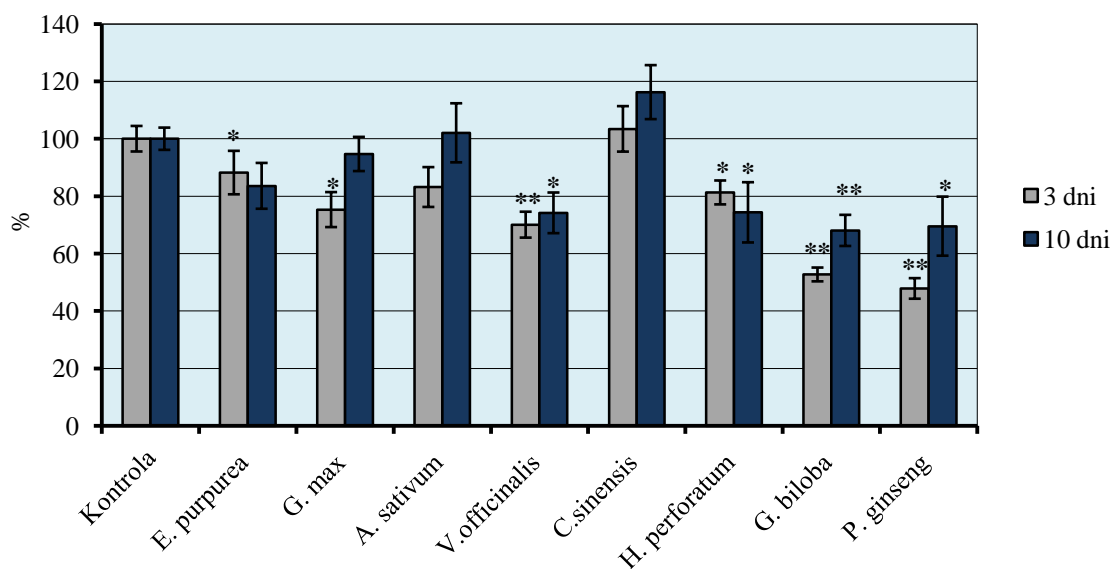
Nazwa ekstraktu	Czas podawania	Średnia ± SEM (grupa badana)	P*
<i>E. purpurea</i> (50 mg/kg)	3 dni	89,08 ± 4,38	0,122
	10 dni	93,69 ± 5,76	0,468
<i>G. max</i> (100 mg/kg)	3 dni	111,84 ± 4,80	0,108
	10 dni	160,92 ± 13,46	<0,001
<i>A. sativum</i> (250 mg/kg)	3 dni	97,649 ± 4,39	0,695
	10 dni	80,39 ± 3,10	0,012
<i>V. officinalis</i> (300 mg/kg)	3 dni	124,42 ± 6,47	0,004
	10 dni	103,92 ± 7,37	0,689
<i>C. sinensis</i> (300 mg/kg)	3 dni	111,92 ± 4,21	0,055
	10 dni	86,46 ± 4,41	0,096
<i>H. perforatum</i> (300 mg/kg)	3 dni	105,82 ± 8,48	0,531
	10 dni	89,06 ± 2,50	0,145
<i>G. biloba</i> (200 mg/kg)	3 dni	140,86 ± 11,17	0,003
	10 dni	121,10 ± 11,49	0,121
<i>P. ginseng</i> (30 mg/kg)	3 dni	86,26 ± 5,92	0,067
	10 dni	113,88 ± 10,77	0,275

Zdolność do nieznacznej modulacji ekspresji genu *AHR* wykazał również ekstrakt żeń-szenia (30 mg/kg, p.o.), który nieistotnie zredukował poziom mRNA badanego czynnika o niespełna 14% poniżej poziomu dla grupy kontrolnej po 3 dniach doświadczenia oraz powyżej tej wartości dla 10 dni. Można więc wnioskować, że wyciąg ten nie powoduje znaczących różnic w transkrypcji lub stabilizacji mRNA badanego genu. Niewielkie zmiany poziomu transkryptu pod wpływem standaryzowanego ekstraktu oszacowano na kilkanaście procent przy braku istotności statystycznej.

4.4.3. Ocena poziomu transkryptu genu *CYP2E1* w zależności od zastosowanego w pracy preparatu roślinnego i czasu jego podawania

Badania wykazały, że w grupie zwierząt przyjmujących wyciąg *E. purpurea* przez okres 3 dni w dawce 50 mg/kg p.o. uzyskano w grupie badanej wartość około 12% poniżej grupy kontrolnej. Wynik ten był istotny statystycznie ($p=0,037$). Wydłużenie czasu działania ekstraktu do 10 dni nie zmieniło istotnie stężenia amplicjonu cDNA genu *CYP2E1* - było ono w grupie badanej niższe o blisko 17%. Uzyskane rezultaty nie świadczą o zdolnościach jeźówki purpurowej do modulowania transkrypcji *CYP2E1* w dawce i okresie czasu wykorzystanych w doświadczeniu. Podobnie pod wpływem granulatu czosnku pospolitego stosowanego w dawce dobowej 250 mg/kg p.o. zanotowano jedynie niewielkie obniżenie

o niespełna 17% ekspresji *CYP2E1* mierzonej stężeniem ampliconu dla tego genu względem grupy kontrolnej. W dłuższym okresie czasu nie obserwowano tej zależności. Ekstrakt zielonej herbaty również nie wykazywał istotnego wpływu na modulację poziomu transkryptu *CYP2E1*. Po 3 dniach stosowania dawki 300 mg/kg p.o. nie obserwowano zmian na poziomie mRNA, natomiast przy 10 dniach zanotowano nieistotny wzrost ekspresji *CYP2E1* o ok. 16% (Rycina 22.).



Rycina 22. Analiza wpływu standaryzowanych preparatów roślinnych na poziom mRNA *CYP2E1*. Ilość transkryptu oznaczono z wykorzystaniem techniki *real-time* PCR w komórkach wątroby szczurów rasy Wistar po 3 i 10 dniach dożołądkowego podawania preparatu. Mierzony poziom cDNA odpowiada ilości mRNA *CYP2E1* w komórkach badanego materiału biologicznego. Wartość ilorazu cDNA *CYP2E1* do GAPDH w próbie kontrolnej przyjęto jako 100%. Na wykresie przedstawiono średnie wartości dla poszczególnych grup z zaznaczoną wartością SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$.

W grupie zwierząt przyjmujących wyciąg *Glycine max* przez okres 3 dni w dawce 100 mg/kg p.o. nastąpił istotny spadek poziomu mRNA badanego genu o 25% w stosunku do wyniku dla grupy kontrolnej ($p = 0,005$). Dotyczył on wszystkich osobników w grupie badanej. Natomiast w dłuższym okresie czasu (10 dni) efekt ten nie utrzymał się. Natomiast istotną redukcję poziomu mRNA obserwowano u zwierząt otrzymujących wyciąg z kozłka lekarskiego, dziurawca zwyczajnego, miłorzębu dwuklapowego lub żeń-szenia już po 3 dniach podawania. *V. officinalis* w dawce 300 mg/kg p.o. przez okres 3 dni istotnie ($p < 0,001$) zmienił poziom mRNA *CYP2E1* redukując jego ilość o ok. 30% względem grupy kontrolnej. W komórkach wątroby zwierząt otrzymujących ekstrakt przez okres 10 dni oznaczono obniżenie ilości transkryptu *CYP2E1* na poziomie o ponad 25% niższym niż w grupie zwierząt karmionych standardową dietą. (Tabela 25.).

Tabela 25. Wpływ standaryzowanych preparatów roślinnych na poziom ekspresji CYP2E1 (n = 10)

Nazwa ekstraktu	Czas podawania	Średnia ± SEM (grupa badana)	P*
<i>E. purpurea</i> (50 mg/kg)	3 dni	88,21 ± 7,57	0,037
	10 dni	83,58 ± 7,99	0,096
<i>G. max</i> (100 mg/kg)	3 dni	75,31 ± 6,10	0,005
	10 dni	94,68 ± 5,95	0,432
<i>A. sativum</i> (250 mg/kg)	3 dni	83,17 ± 6,94	0,065
	10 dni	102,06 ± 10,29	0,843
<i>V. officinalis</i> (300 mg/kg)	3 dni	70,06 ± 4,51	< 0,001
	10 dni	74,177 ± 7,08	0,003
<i>C. sinensis</i> (300 mg/kg)	3 dni	103,429 ± 7,92	0,729
	10 dni	116,23 ± 9,41	0,104
<i>H. perforatum</i> (300 mg/kg)	3 dni	81,29 ± 4,16	0,007
	10 dni	74,35 ± 10,49	0,020
<i>G. biloba</i> (200 mg/kg)	3 dni	52,71 ± 2,40	< 0,001
	10 dni	68,06 ± 5,42	< 0,001
<i>P. ginseng</i> (30 mg/kg)	3 dni	47,84 ± 3,58	< 0,001
	10 dni	69,54 ± 10,28	0,006

Zastosowanie ekstraktu *H. perforatum* wywołało znamienne ($p=0,007$) redukcję mRNA o 18% względem grupy kontrolnej a po 10 dniach wartość ta kształtowała się na poziomie ponad 25% niższym niż wynik dla zwierząt karmionych standardową dietą ($p=0,02$). Pozostałe ekstrakty, *G. biloba* i *P. ginseng*, istotnie obniżyły poziom mRNA CYP2E1 w podobnym stopniu. Miłorząb japoński zredukował ilość transkryptu o ponad 47% po 3 dniach ($p<0,001$) oraz o niemal 32% po 10 dniach ($p<0,001$) podawania dożołądkowego. Wyciąg z żeń-szenia zmniejszył ilość mRNA o ok. 52% oraz ok. 30% odpowiednio po 3 i 10 dniach trwania eksperymentu. Po 3 dniach doświadczenia polegającego na podawaniu wyciągu z żeń-szenia w dawce 30 mg/kg p.o. zaobserwowano znaczne obniżenie poziomu transkryptu CYP2E1 o ponad 52% względem kontroli ($p<0,001$). Podawanie wspomnianej dawki przez okres 10 dni spowodowało istotne statystycznie obniżenie poziomu mRNA CYPE1 o ok. 25% ($p=0,006$).

4.5. Określenie związku pomiędzy poziomem ekspresji CYP1A2 i czynnikiem AhR

Dla oszacowania istotnych różnic między średnimi grupowanymi w układzie analizy wariancji wykorzystano test post-hoc (tzw. test Tukeya). W oparciu o otrzymane wyniki powyższej analizy podjęto próbę określenia zależności między stężeniem mRNA CYP1A2 a poziomem ekspresji czynnika AhR zaangażowanego w indukowaną regulację transkrypcji

tej izoformy. Za pomocą testu możliwe jest dokładniejsze oszacowanie wpływu podawanych wyciągów roślinnych na poziom ekspresji badanych genów. Dla prawidłowej oceny molekularnych mechanizmów zachodzących relacji między ekspresją CYP1A2 i AhR zastosowano substancje wzorcowe. Wyniki testu porównań wybranych par średnich przedstawiono odpowiednio w Tabeli 26. i Tabeli 27.

Tabela 26. Porównanie średnich dla poszczególnych prób w odniesieniu do analizowanych genów po zastosowaniu substancji wzorcowych, (n = 10)

Preparat	Gen	Średnia	Różnica średnich	SEM	P*	Średnia	Różnica średnich	SEM	P*
Induktor CYP1A2		3 dni				10 dni			
β-naftoflawon (100 mg/kg/ i.p.)	CYP1A2	3,64	-3,244 ^a	0,254	<0,001	4,20	-2,999 ^a	0,226	<0,001
	AHR	1,11	-0,067 ^a	0,261	0,994	1,28	-0,352 ^a	0,219	0,388
			3,424 ^b	0,261	<0,001		2,576 ^b	0,219	<0,001
Inhibitor CYP1A2		3 dni				10 dni			
Cymetydyna (100 mg/kg, i.p.)	CYP1A2	1,03	-0,030 ^a	0,126	0,995	0,86	0,158 ^a	0,102	0,421
	AHR	1,45	-0,440 ^a	0,126	0,008	1,40	0,405 ^a	0,102	0,002
			-0,356 ^b	0,122	0,032		-0,466 ^b	0,099	<0,001

^a Różnica średnich między grupą kontrolną a grupą badaną.

^b Różnica średnich między grupą badaną dla CYP1A2 a grupą AHR.

*Wartość $p < 0,05$ przyjęto za statystycznie istotną (test Tukeya).

Wyniki powyższej analizy wskazują, iż wartości średnie dla badanych genów różnią się istotnie statystycznie zarówno po 3 jak i 10 dniach iniekcji β-naftoflawonu jak również cymetydyny. Istotne różnice średnich wykazano między grupami CYP1A2 i AHR jak i grupą kontrolną i badaną dla CYP1A2 po podaniu induktora oraz grupą kontrolną i AHR po podaniu inhibitora. Na podstawie przedstawionych wyników nie można jednoznacznie wnioskować o zależności ekspresji badanej izoformy cytochromu P450 względem ilości transkryptu AhR w tkance wątrobowej u szczurów. Zaobserwowano brak istotnych zmian mRNA czynnika AhR podczas indukcji CYP1A2 oraz znamienne zwiększenie stężenia transkryptu AhR pod wpływem cymetydyny, która nie wywołała zmian ekspresji genu cytochromu P450. Istnieje wobec tego możliwość funkcjonowania ujemnego sprzężenia zwrotnego w mechanizmie regulacji CYP1A2 a także wpływu cymetydyny na AhR i transkrypcję genów docelowych innych niż CYP1A2, w tym też o znaczeniu fizjologicznym, lub też regulacji ekspresji na innym etapie przy braku liganda AhR.

Tabela 27. Porównanie wartości średnich dla poszczególnych prób w odniesieniu do analizowanych genów *CYP1A2* i *AHR* po zastosowaniu standaryzowanych wyciągów roślinnych, (n = 10)

Preparat	Gen	Średnia	Różnica średnich	SEM	P*	Średnia	Różnica średnich	SEM	P*
Nazwa ekstraktu		3 dni				10 dni			
<i>E. purpurea</i> (50 mg/kg, p.o.)	CYP1A2	1,08	-0,077	0,090	0,829	1,04	-0,043 ^a	0,098	0,971
	AHR	0,89	0,116 ^a	0,093	0,601	0,94	0,064 ^a	0,098	0,913
<i>G. max</i> (100 mg/kg, p.o.)	CYP1A2	1,09	-0,086 ^a	0,674	0,587	0,92	-0,099 ^a	0,116	0,829
	AHR	1,12	-0,125 ^a	0,067	0,265	1,61	-0,612 ^a	0,116	<0,001
<i>A. sativum</i> (250 mg/kg, p.o.)	CYP1A2	1,04	-0,038 ^a	0,062	0,923	0,88	0,132 ^a	0,073	0,292
	AHR	0,98	-0,008 ^a	0,061	0,999	0,80	0,20 ^a	0,073	0,047
<i>V. officinalis</i> (300 mg/kg, p.o.)	CYP1A2	1,08	-0,079 ^a	0,071	0,685	0,99	0,105 ^a	0,087	0,999
	AHR	1,24	-0,270 ^a	0,071	0,003	1,04	-0,040 ^a	0,087	0,968
<i>C. sinensis</i> (300 mg/kg, p.o.)	CYP1A2	0,98	0,024 ^a	0,068	0,985	1,06	0,063 ^a	0,073	0,828
	AHR	1,12	-0,137 ^a	0,071	0,241	0,86	0,171	0,073	0,109
<i>H. perforatum</i> (300 mg/kg, p.o.)	CYP1A2	0,95	0,047 ^a	0,085	0,994	1,34	-0,377 ^a	0,091	0,001
	AHR	1,06	-0,064 ^a	0,085	0,872	0,89	0,111 ^a	0,091	0,617
<i>G. biloba</i> (200 mg/kg, p.o.)	CYP1A2	0,94	0,060 ^a	0,103	0,936	0,76	0,266 ^a	0,105	0,071
	AHR	1,41	-0,447 ^a	0,105	0,001	1,21	-0,215 ^a	0,105	0,188
<i>P. ginseng</i> (30 mg/kg, p.o.)	CYP1A2	0,91	0,088 ^a	0,099	0,813	1,40	-0,451 ^a	0,154	0,028
	AHR	0,86	0,152 ^a	0,097	0,409	1,14	-0,141 ^a	0,154	0,794
			-0,063 ^b	0,097	0,914		0,405 ^b	0,154	0,058

^a Różnica średnich między grupą kontrolną a grupą badaną.

^b Różnica średnich między grupą badaną dla CYP1A2 a grupą AHR. * $p < 0,05$ (test Tukeya).

Na podstawie uzyskanych wyników nie można jednoznacznie wnioskować o związku między poziomem ekspresji badanej izoforny a AhR uczestniczącym w molekularnym mechanizmie regulacji transkrypcji CYP1A2 w obecności ekstraktów z roślin leczniczych, bez silnego liganda tego czynnika. Analiza przedstawionych wyników wskazuje na istotne różnice po zastosowaniu substancji roślinnych między niektórymi rozpatrywanymi grupami. Zestawione wartości średnie dla poszczególnych badanych genów *CYP1A2* i *AHR* różnią się znamienne statystycznie w wybranych przypadkach. Ma to miejsce podczas dłuższego czasu podawania *G. max* w dawce 100 mg/kg, p.o. gdzie obserwowano brak znaczących zmian w poziomie transkryptu genu *CYP1A2* przy jednoczesnym istotnym wzroście ilości mRNA dla czynnika AhR. Może to sugerować zdolność składników soi do nasilania ekspresji innych genów docelowych AhR. Po 10 dniach podawania *H. perforatum* (300 mg/kg, p.o.), zwiększonemu stężeniu transkryptu CYP1A2 nie towarzyszyła zmiana ekspresji *AHR*. Po 3 dniach

doświadczenia w obu grupach nie zanotowano żadnego efektu, lecz uzyskano również istotną różnicę średnich dla obu porównywanych grup. W przypadku ekstraktu *G. biloba* w dawce 200 mg/kg, p.o. stosowanego zarówno przez 3 dni jak i 10 dni obserwowano istotne różnice między grupami badanymi. Efekt ten wynikał ze zwiększenia ilości transkryptu czynnika AhR przy braku zmian CYP1A2 w krótszym okresie czasu oraz jego redukcji po wydłużeniu doświadczenia. Ponadto istotne różnice opisano również dla średnich z grup badanych otrzymujących *V. officinalis* (300 mg/kg, p.o.) i *C. sinensis* (300 mg/kg, p.o.) przez 3 dni. Obserwacje dotyczyły odpowiednio niewielkiego wzrostu AhR bez zmian CYP1A2 po podaniu kozłka oraz braku zmian poziomu transkryptu obu genów w grupie zwierząt otrzymujących zieloną herbatę.

5. DYSKUSJA

5.1. Zasadność zastosowanego modelu zwierzęcego i metodologii badawczej

Modele zwierzęce są powszechnie stosowane w badaniach przedklinicznych leków w celach opisanego ich metabolizmu w organizmie żywym, określenia efektywności i bezpieczeństwa a w konsekwencji ekstrapolacji uzyskanych obserwacji na człowieka. Doświadczenia prowadzone z udziałem zwierząt eksperymentalnych umożliwiają także analizę interakcji międzylekowych i działań niepożądanych, w tym na poziomie funkcjonowania enzymów cytochromu P450. W wielu przypadkach, ze względu na etyczne i techniczne ograniczenia, jest to jedyna droga prowadzenia badań *in vivo* z możliwością pobrania tkanek narządów. Dla realizacji tych projektów istotne jest określenie różnic międzygatunkowych w budowie enzymów metabolizujących leki, ich ekspresji oraz aktywności katalitycznej. Analiza ta jest pomocna w podjęciu decyzji o wyborze gatunku modelowego do badań, a w konsekwencji umożliwia prognozowanie podobnych zależności u człowieka na podstawie mechanizmów obserwowanych w zwierzęcym modelu eksperymentalnym.

Przegląd danych literaturowych sugeruje, iż indukcja i inhibicja enzymów cytochromu P450 jest porównywalna u wszystkich gatunków zwierząt a nadrodzina ta jest jedną z najbardziej konserwatywnych międzygatunkowo. Wśród izoform za najbardziej zachowawcze uznaje się CYP1A1/2 oraz CYP2E1 co potwierdza m.in. analiza homologii sekwencji [Nelson i wsp., 1996; Guengerich, 1997; Zuber i wsp., 2002]. Dzięki znacznym podobieństwom w fizjologii, enzymologii i molekularnych mechanizmach wpływających na metabolizm ksenobiotyków, w badaniach nad izoformami CYP powszechnie wykorzystywany jest model szczurzy. Fakt ten popierają obserwacje aktywności CYP1A2 oraz możliwości jej indukcji zarówno w ludzkiej wątrobie jak i wątrobach zwierząt eksperymentalnych [Gonzalez i Gelboin, 1994]. W oparciu o dostępną literaturę wnioskować można, że ekspresja genów CYP jest regulowana w podobny sposób zarówno u człowieka jak i gryzoni, czego przykładem jest analizowany w pracy czynnik AhR dimeryzujący z ARNT w odpowiedzi na PAH [Cresteil, 1987; Gonzalez, 1992; Hankinson, 1995; Rich i Boobis, 1997]. Natomiast porównanie sekwencji DNA ludzkiego i szczurzego genu *CYP2E1* wskazuje na wysoki stopień podobieństwa (80-94%) obszaru obejmującego 150 pz miejsca startu polimerazy RNA [Song i wsp., 1986; Umeno i wsp., 1988], co może wskazywać na

istnienie wysoce konserwatywnego regionu regulatorowego będącego miejscem wiązania czynników transkrypcyjnych. Ponadto wybór gryzoni do tego typu badań jest powszechny i poparty względami praktycznymi, takimi jak ich krótki okres życia, szybki wzrost i wysoka płodność. Ze względu na fakt, iż u ssaków ponad 90% reakcji fazy I biotransformacji ksenobiotyków katalizowanych jest przez cytochromy P450, z czego znaczna część przebiega w wątrobie, analiza ekspresji wybranych w pracy genów w tkance wątrobowej u szczura jest w pełni uzasadniona.

Na podstawie przeglądu literatury wnioskować można, że analizy indukcji lub hamowania izoform cytochromu P450 prowadzone w oparciu o techniki hybrydizacyjne (Southern i Western blot), test immunoenzymatyczny ELISA oraz badania aktywności enzymatycznej nie odzwierciedlają precyzyjnie ilościowych zmian transkryptu badanych genów. Ocena taka jest możliwa przy wykorzystaniu techniki *real-time* PCR poprzedzonej reakcją odwrotnej transkrypcji. Technika ta jest wysoce czułym sposobem amplifikacji i ilościowej oceny zdefiniowanego fragmentu kwasu nukleinowego z możliwością detekcji produktu reakcji w czasie rzeczywistym. Analiza pozwala na monitorowanie kinetyki reakcji i określenie początkowej ilości analizowanego DNA. Jest to również technika w oparciu o którą można wnioskować o wpływie analizowanego czynnika, w tym związków aktywnych farmakologicznie, na zmiany na poziomie transkryptomu i syntezy białka. Analiza ekspresji genów metodą PCR w czasie rzeczywistym jest znacznie bardziej czuła niż testy ELISA i metody hybrydizacji. W pracy doktorskiej technika PCR w czasie rzeczywistym posłużyła jako precyzyjne narzędzie skringu w celu oszacowania wpływu standaryzowanych wyciągów roślinnych na poziom transkryptu enzymów wątrobowych CYP1A2 i CYP2E1 oraz czynnika transkrypcyjnego AhR. W celu namnożenia specyficznych produktów reakcji pochodzących z cDNA badanych genów zastosowano odpowiednie pary starterów i wysokiej jakości odczynniki. Reakcje prowadzono w precyzyjnym i czułym aparacie LightCycler® ze systemem kapilarowym. Do detekcji amplikonu posłużył fluorochrom SYBR Green I interkalujący w dwuniciowy DNA, którego wzbudzenie i maksimum absorpcji występuje przy odpowiednio 494 nm i 521 nm. Specyficzność metody potwierdziły analizy krzywych topnienia produktów. Optymalizacja metody pozwoliła na uzyskanie wysokiej powtarzalności wyników badanych prób, które analizowano względem standardu wewnętrznego w odniesieniu do prób niepoddanych procedurze doświadczalnej. Ponadto poziom transkryptu badanych genów normalizowano względem genu *GAPDH* należącego do rodziny tzw. *housekeeping gene* o stabilnej ekspresji. Umożliwiło to kontrolę równoległych reakcji pod względem ilości i jakości matrycy.

5.2. Wpływ wyciągów roślinnych na metabolizm substratów izoenzymów CYP1A2 i CYP2E1 w oparciu o zmiany ekspresji genów na podstawie uzyskanych wyników i doniesień literaturowych

Wysoka popularność rynkowa preparatów pochodzących z surowców zielarskich skłania do podejmowania projektów w kierunku oceny bezpieczeństwa i potencjalnych możliwości ich wpływu na enzymy cytochromu P450. Modulacja aktywności i zawartości tych enzymów w mikrosomach wątroby może być istotna dla zdrowia człowieka ze względu na ich zdolność do inaktywacji ale również aktywacji szerokiego zakresu ksenobiotyków i składników żywności. Biorąc pod uwagę rodzaj substratów metabolizowanych przez enzymy z podrodziny CYP1A oraz izoformę CYP2E1, zmiany ich ekspresji mogłyby prowadzić do nasilania właściwości mutagennych, kancerogennych i embriotoksycznych niektórych z nich oraz modyfikować efektywność biotransformowanych przez nie leków a także wpływać na przemiany substancji psychoaktywnych - kofeiny i etanolu. Szerokie spektrum czynników syntetycznych i naturalnych, wiążących się i aktywujących szlak transdukcji sygnału AhR, jest wciąż definiowane. Wielu autorów sugeruje wręcz, że indukcja wspomnianych enzymów CYP związanych z metaboliczną aktywacją uważana jest za wskaźnik narażenia na toksyczne lub/i kancerogenne czynniki zawarte w diecie i środowisku [Lewis i wsp., 1998]. Znaczenie zmian ekspresji genów CYP jest istotne również z punktu widzenia stosowania cytostatyków, gdyż izoformy CYP1A2 i CYP2E1 w mikrosomach wątroby odgrywają dominującą rolę m.in. w aktywacji dekarbazyny (DTIC) stosowanej w terapii pacjentów z czerniakiem [Reid i wsp. 1999]. Wykazano, że inhibitorami reakcji N-demetylacji DTIC są α -naftoflawon hamujący aktywność CYP1A, kwercetyna (CYP1A2), chlorzoksazon (CYP1A2 i CYP2E1) i disulfiram (CYP2E1) [Koprowska i Czyż, 2011].

W ostatnich latach obserwuje się znaczny progres w badaniach mających na celu wyjaśnienie zróżnicowanych szlaków i mechanizmu działania receptorów zaangażowanych w regulację wątrobowej frakcji enzymów P450 u ssaków. Indukcja i inhibicja enzymów CYP przez naturalne składniki diety, suplementy i lek roślinny może skutkować efektami ubocznymi i wpływać na metabolizm substratów określonych izoform. Może to mieć miejsce również pod wpływem stosowania preparatów z roślin leczniczych, gdyż dane literaturowe wskazują na możliwość udziału wybranych związków aktywnych w nich zawartych w klinicznie istotne interakcjach z lekami syntetycznymi. W związku z tym istotą prowadzonych badań była analiza zdolności wpływu standaryzowanych wyciągów z zielonej herbaty, soi, jeżówki purpurowej, żeń-szenia, kozłka lekarskiego, miłorzębu dwuklapowego,

dziurawca zwyczajnego oraz granulatu czosnku na ekspresję izoform CYP *in vivo*. Uzyskane obserwacje mają umożliwić wnioskowanie o możliwościach modyfikacji przemian ksenobiotyków prowadzonych przez CYP1A2 i CYP2E1 w organizmie żywym oraz dokonanie ekstrapolacji na człowieka. Wykorzystanie w pracy standaryzowanych wyciągów surowców zielarskich będących mieszaniną zróżnicowanych składników aktywnych biologicznie zamiast izolowanych związków było działaniem zamierzonym. Celowość takiej analizy autorka uzasadnia faktem powszechnego przyjmowania przez pacjentów złożonych preparatów/suplementów a nie poszczególnych ich składników. Wobec tego zachodzi możliwość wzajemnego oddziaływania oraz istnienia niezidentyfikowanych dotychczas składników wyciągów mających łącznie zdolność modulacji enzymów biotransformacji ksenobiotyków.

Celem niniejszej pracy stała się ocena poziomu transkrypcji genów *CYP1A2* i *CYP2E1* kodujących enzymy I fazy metabolizmu ksenobiotyków oraz czynnika transkrypcyjnego AhR u szczurów poddanych działaniu standaryzowanych wyciągów z roślin leczniczych. Ideą pracy było uzupełnienie deficytu informacji na temat możliwości modyfikacji ekspresji i aktywności badanych genów na poziomie regulacji ich transkrypcji. Na podstawie uzyskanych wyników oraz w świetle dostępnej literatury podjęto próbę określenia molekularnego podłoża interakcji preparatów pochodzenia roślinnego i substratów metabolizowanych przez CYP1A2 i CYP2E1. W celu analizy zjawiska indukcji interakcji oceniono wpływ syntetycznych substancji wzorcowych będących induktorami i inhibitorami aktywności badanych genów. Wobec izoformy CYP1A2 zastosowano β -naftoflawon będący syntetyczną pochodną naturalnie występującego flawonoidu uznawaną za silny specyficzny induktor CYP1A i wykorzystywany w badaniach farmakologicznych i farmakokinetycznych [Yokouchi i wsp., 2007]. W badaniach zespołu Edwards i wsp. [2003] potwierdzono, przy użyciu specyficznych przeciwciał, podwyższenie poziomu apoproteiny CYP1A2 do wartości 160% względem próby kontrolnej. Przedmiotem analiz były mikrosomy wątroby pozyskane od 11 dawców i inkubowane przez 72h z BNF w stężeniu 50 μ M. Autorzy postulują indukcję na drodze mechanizmu zależnego od receptora Ah [Edwards i wsp., 2003]. Podobne wyniki zaobserwowano w innym badaniu na kulturach ludzkich hepatocytów [Meunier i wsp., 2000]. Indukcyjny wpływ β -naftoflawonu na izoformy CYP1A na etapie białka mierzonego techniką Western blot obserwowano w badaniach na szczurach otrzymujących w diecie 0,04% BNF przez okres 7 dni. Uzyskano odpowiednio 12-krotne zwiększenie poziomu CYP1A1 oraz 2,7-krotne zwiększenie intensywności prążka dla CYP1A2. Autor na podstawie swych analiz uznał BNF za agonistę czynnika AhR [Stresser i wsp. 1994]. Ocena wpływu podawania

β -naftoflawonu w dawce 25 mg/kg i.p. dziennie przez okres 2 dni na enzymy CYP1A w modelu szczurzym podjęta została przez zespół *Iba i wsp.* [1999]. W efekcie BNF podniósł aktywność, poziom transkryptu i białka CYP1A, przy czym efekt indukcji był wyższy u samców w porównaniu do samic. Wyniki sugerujące indukcję transkrypcji po podaniu β - naftoflawonu samcom szczura szczepu Wistar potwierdzają rezultaty pracy doktorskiej, w której zastosowano znacznie wyższą dawkę 100 mg/kg i.p. i wydłużono czas podawania induktora odpowiednio do 3 i 10 dni. W grupie zwierząt badanych po 3 dniach podawania zanotowano znamienne statystycznie ($p < 0,001$), blisko 3,6-krotny wzrost poziomu mRNA genu *CYP1A2* w porównaniu do grupy kontrolnej. Podobny efekt obserwowano po 10 dniach stosowania induktora, gdzie poziom indukcji wzrósł do wartości niemal 420%. Doniesienia literaturowe sugerują, że β -naftoflawon w dawce 40 mg/kg stosowany dootrzewnowo przez 3 dni może powodować nawet 20-krotny wzrost poziomu mRNA *CYP1A2*, przy czym wielkość próby w tym doświadczeniu była znacznie niższa ($n=4$) niż w pracy doktorskiej ($n=10$) [*Yu i wsp.*, 2005].

W celu oceny potencjalnego udziału czynnika AhR w indukcji *CYP1A2* przez β -naftoflawon dokonano pomiaru poziomu mRNA genu dla tego receptora. Nie wykazano istotnych statystycznie zmian w poziomie transkryptu genu czynnika AhR przy dawce 100 mg/kg i.p. po trzech dniach podawania zwierzętom. Warto jednak zauważyć, iż dłuższy okres hodowli z tym induktorem *CYP1A2* (10 dni) spowodował wzrost poziomu mRNA o około 28% w porównaniu do grupy kontrolnej. Powyższe rezultaty, mimo iż nie są istotne statystycznie, mogą sugerować udział wspomnianego czynnika w procesie indukcji izoenzymów z podrodziny *CYP1A* przez ten związek. Potwierdzają one obserwacje zespołu *Oinonen i wsp.* [1994] wskazujące na zwiększenie ilości mRNA genu *AHR* pod wpływem BNF przy braku zmian na poziomie białka u szczurów. Natomiast istnieją również doniesienia sugerujące możliwość indukcji *CYP1A2* na drodze mechanizmu niezależnego od receptora AhR. Uważa się, że β -naftoflawon może oddziaływać również z innym niż AhR receptorem cytoplazmatycznym o zbliżonej do niego sekwencji aminokwasowej lecz innej stałej sedymentacji [*Brauze i Malejka-Giganti*, 2000]. Podanie β -naftoflawonu w dawce dobowej 80 mg/kg przez zespół *Kishida i wsp.* [2008] znacznie indukowało mRNA *CYP1A1* i *CYP1A2* a także wywołało wzrost stężenia transkryptu receptora AhR w wątrobie u szczurów. Ponieważ czynnik AhR wraz z ARNT, AhRR, HIF1 α należą do rodziny regulatorów transkrypcji helix-loop-helix/PAS uczestniczących w kaskadzie odpowiedzi na ksenobiotyk, celowe jest przytoczenie pracy zespołu *Brauze i wsp.* [2006]. W badaniu analizowano wpływ podawania i.p. ligandów czynnika AhR na ekspresję

wspomnianych genów w wątrobie u szczurów. Analiza ilościowa PCR w czasie rzeczywistym nie wykazała zmian w poziomie mRNA ARNT i HIF1alpha po podaniu β -naftoflawonu, 3-MC i TCDD. Ekspresja AhRR uległa zmianie po podaniu TCDD natomiast nie pod wpływem 3-MC i β -naftoflawonu. Ekspresja mRNA AhR i markerów jego aktywacji, CYP1A1 i NQO1, znamienne wzrosła po podaniu TCDD, 3-MC oraz, w mniejszym stopniu, BNF. Wyniki te wskazują, że wiązanie ligandów do AhR wpływa na transkrypcję zarówno CYP1A1 i NQO1 jak i AhR [Brauze i wsp., 2006]. Uzasadnionym wydaje się założenie, że β -naftoflawon jest uznawany za ligand wykazujący wysokie powinowactwo do AhR oraz innych białek wiążących PAH [Brauze i Malejka-Giganti, 2000]. Uznać można, że poziom indukcji AhR zależy od potencjału induktora enzymów metabolizmu ksenobiotyków.

Przeгляд literatury pozwala wnioskować, że zastosowana w pracy doktorskiej cymetydyna hamuje metabolizm wielu substratów enzymów CYP w warunkach *in vivo* i *in vitro* zarówno u szczurów jak i u człowieka. Cymetydyna może wywołać inhibicję izoform CYP1A, CYP2C9, CYP2D6, i CYP3A4, przy czym klinicznie istotne znaczenie ma zdolność wpływu na aktywność CYP3A4 i CYP1A2, co wykazano w analizach *in vitro* na ludzkich mikrosomach wątrobowych [Martinez i wsp., 1999]. Klinicznie istotne interakcje z lekiem występują zwykle przy dziennej dawce na poziomie 1g lub obecności inhibitorów tego enzymu. Najistotniejsze z nich dotyczą substratów o wąskim indeksie terapeutycznym takich jak teofilina, prokainamid i R-warfaryna. Na podstawie wyników *in vitro* sugeruje się, że hamowanie CYP przez cymetydynę wykazuje charakter kinetyki kompetytywnej lub mieszanej kompetytywnej/niekompetytywnej i zależy od jej stężenia w wątrobie [Levine i wsp., 1998; Cremer i wsp., 1989]. W oparciu o wcześniej prowadzone badania uznano cymetydynę za odwracalny i nieselektywny inhibitor enzymów CYP [Levine i wsp., 1998]. Wyniki pracy doktorskiej zwracające uwagę na molekularne podłoże wskazują, że zastosowanie cymetydyny *in vivo* w dawce 100 mg/kg p.o. zarówno przez okres 3 i 10 dni doświadczenia nie wpłynęło istotnie na poziom mRNA CYP1A2 względem grupy kontrolnej. W dłuższym czasie (10 dni) obserwowano niewielką tendencję do redukcji poziomu transkryptu badanego genu o niespełna 15% poniżej wartości zanotowanej dla zwierząt w grupie kontrolnej. Podobne wnioski pochodzą z badania zespołu Levine i wsp. [1998], gdzie pośrednio wykazano brak wpływu cymetydyny na aktywność izoform CYP1A w badaniach na modelu szczurzym. Zastosowana wówczas dawka 150 mg/kg i.p cymetydyny nie zmieniła indukowanej β -naftoflawonem aktywności O-deetylazy 7-etoksyrezorufiny (EROD) i O-demetylazy metoksyrezorufiny (MROD) będących markerem CYP1A w mikrosomach wątroby [Levine i wsp., 1998]. Brak hamującego wpływu cymetydyny na izoenzymy

z podrodziny CYP1A na poziomie białka i mRNA w ludzkich hepatocytach *in vitro* wykazały również badania *Curi-Pedrosa i wsp.* [1994]. Brak istotnego spadku ekspresji ocenianej EROD można tłumaczyć obserwacjami *Cremer i wsp.* [1989], gdzie największą zdolność hamowania aktywności CYP1A2 mierzonej utlenianiem teofiliny obserwowano po podaniu doustnym inhibitora. Na tej podstawie w pracy doktorskiej dawka 100 mg/kg podawana była p.o., jednak nie wywołała ona istotnych zmian na poziomie mRNA CYP1A2. Jednocześnie obserwowano istotny statystycznie wzrost stężenia mRNA genu *AHR* w hepatocytach, gdzie osiągnęło ono odpowiednio wartość około 144% ($p=0,014$) oraz 139% ($p<0,001$) w odniesieniu do grupy zwierząt nie poddanych procedurze eksperymentalnej, odpowiednio po 3 i 10 dniach doświadczenia. Przegląd literatury wskazuje na brak innych doniesień o badaniach nad wpływem cymetydyny na wspomniany czynnik. Jednocześnie obserwowana tendencja do wzrostu transkryptu AhR bez zmian poziomu mRNA genu CYP1A2 sugeruje możliwość potranskrypcyjnych modyfikacji mRNA badanego czynnika transkrypcyjnego, co jest powszechnym mechanizmem regulującym ekspresję genów w komórkach eukariotycznych. Istnieje możliwość jego degradacji lub zmian białka i kolejnych etapów mechanizmu indukcji lub istnienie innej pośredniej drogi regulacji CYP1A. Ponadto zwiększony poziom mRNA AhR może wiązać się z aktywacją ekspresji innego genu docelowego pod wpływem podanego leku, gdyż czynnik ten pełni istotną funkcję fizjologiczną w utrzymaniu homeostazy w organizmie i przemianach związków endogennych.

Pierwsze wnioski wskazujące na udział izoniazydu w zwiększaniu aktywności CYP2E1 poprzez mechanizm potranslacyjny, na drodze stabilizacji białka i bez udziału kaskady sygnałowej zależnej od receptora, pochodzą z prac *Koop i wsp.* [1985]. Wpływ izoniazydu na stabilizację białka określono jako analogiczny do regulacji pod wpływem etanolu i imidazolu zachodzącej poprzez hamowanie fosforylacji i degradacji białka [*Eliasson i wsp.*, 1990]. Analiza zdolności indukcyjnych izoniazydu wobec CYP2E1 podjęta przez zespół *Park i wsp.* [1993] prowadziła do podobnych wniosków o zwiększeniu efektywności translacji, ilości białka oraz aktywności w oparciu o pomiary hydroksylazy aniliny. Zmian tych nie obserwowano na poziomie mRNA CYP2E1. Dowodów na poparcie tej tezy dostarczył autorom fakt, iż wcześniejsze podanie cykloheksamidu i fluorku sodu hamujących translację znosiło efekt izoniazydu, co sugerowało, że indukcja ma miejsce na drodze aktywacji translacji mRNA CYP2E1. Ponadto wykazano, że dwa strukturalne analogi izoniazydu - kwas izonikotynowy i jego amid wykazywały niższą zdolność indukcji CYP2E1. Na podstawie tych obserwacji autorzy sugerują, iż dla selektywności indukcji CYP2E1 oraz siły oddziaływania, wydaje się być istotna grupa hydrazydowa i pierścień pirydynowy

izoniazydu [Park i wsp., 1993]. Wpływ izoniazydu na poziom białka CYP2E1 i aktywność enzymatyczną u szczurów po podaniu 200 mg/kg i.p. przez okres 5 dni analizowano w pracy Poloyac [2004]. Wykazano, że w wątrobie zwierząt z grupy badanej ilość białka wzrosła ponad 2,5 podobnie jak aktywność mierzona tworzeniem 6-hydroksychlorzoksazonu. Efekt indukcji potwierdziło tkankowo specyficzne nasilenie hydroksylacji kwasu arachidonowego. Badania *in vivo* na modelu szczurzym z wykorzystaniem izoniazydu jako induktora w dawce 100 mg/kg i.p. przez okres 4 dni potwierdziły zmiany aktywności izoformy CYP2E1 mierzone reakcją hydroksylacji p-nitrofenolu metodami spektrofotometrii. Analiza białka metodą Western blot prowadziła do podobnego wniosku. Nie podjęto natomiast pomiarów ilości transkryptu badanego genu [Karamanakos i wsp., 2009]. Autorzy zakładają jednak możliwość regulacji ekspresji enzymu CYP2E1 również na etapie syntezy i stabilizacji transkryptu [Powell i wsp., 1998]. Istnieje niewiele doniesień literaturowych mówiących o wpływie izoniazydu na stężenie mRNA CYP2E1. W komórkach wątroby zwierząt poddanych działaniu izoniazydu przez okres 3 i 10 dni w dawce 150 mg/kg i.p. w ramach pracy doktorskiej zaobserwowano znamienne (odpowiednio $p=0,007$ oraz $p=0,003$) zwiększenie stężenia transkryptu genu CYP2E1 do wartości ponad 160% w porównaniu z grupami kontrolnymi. Biorąc pod uwagę rezultaty uzyskane w pracy oraz obserwacje innych autorów można domniemać o wpływie izoniazydu na stabilizację mRNA w komórce. Wykorzystanie dawki izoniazydu u szczurów niższej niż badana w pracy doktorskiej - 100 mg/kg i.p. - przez wydłużony okres 21 dni zdaniem zespołu Yue i wsp. [2004] nie wywołało istotnych zmian poziomu mRNA CYP2E1 przy nasilonej aktywności tego enzymu. Należy jednak zauważyć, że stężenie transkryptu badano reakcją klasycznego PCR z wykorzystaniem cDNA i wizualizowano w żelu agarozowym, co jest analizą nieporównywalnie mniej czułą od zastosowanej w pracy doktorskiej *real-time* PCR. Wobec wyników powyższych badań oraz na podstawie prac Powell i wsp. [1998] można wnioskować o istnieniu korelacji między białkiem a aktywnością mierzoną przemianami chlorzoksazonu i p-nitrofenolu będących substratami CYP2E1. Nie wykazano jednak takiej zależności dla poziomu transkryptu i aktywności katalitycznej białka. Uzyskane rezultaty są potwierdzeniem kompleksowej regulacji ekspresji CYP2E1 [Powell i wsp., 1998].

Główny metabolit disulfiramu, dietyloditiokarbaminian, uznawany jest za selektywny inhibitor aktywności katalitycznej CYP2E1 na drodze mechanizmu podstawowego w ludzkich mikrosomach wątroby [Guengerich i wsp., 1991] oraz *in vitro* i *in vivo* u szczurów [Brady i wsp., 1991a]. Jest on stosowany głównie w badaniach zmierzających do określenia udziału wspomnianego enzymu w biotransformacji ksenobiotyków. W pracy doktorskiej

zastosowano dietyloditiokarbaminian jako substancję wzorcową w celu określenia zmian na etapie transkrypcji. Wcześniejsze analizy aktywności prowadzone przez zespół *Kharasch i wsp.* [1993] wykazały, że pojedyncza dawka disulfiramu (500 mg) podana zdrowym ochotnikom zmniejsza aktywność CYP2E1 o około 85% i wydłuża czas eliminacji chlorzoksazonu u szczurów *in vivo*, czyli prowadzi do szybkiej i selektywnej inaktywacji wątrobowej frakcji CYP2E1 ocenianej analizą reakcji 6-hydroksylacji chlorzoksazonu [*Kharasch i wsp.*, 1993]. Podobnie, badania *in vivo* na modelu szczurzym zespołu *Karamanakos i wsp.* [2009] z wykorzystaniem disulfiramu w dawce 75 mg/kg i.p. jako inhibitora przez okres 4 dni wykazały redukcję poziomu białka i aktywności izoformy CYP2E1 mierzone odpowiednio techniką Western blot i metodami spektrofotometrii (reakcja hydroksylacji p-nitrofenolu). Nie wykonano natomiast pomiarów ilości transkryptu badanego genu. W pracy doktorskiej zaobserwowano, iż podawanie dietyloditiokarbaminianu w dawce 200 mg/kg i.p. przez okres 3 dni wywołuje nieznaczne i nieistotne obniżenie ilości transkryptu dla genu *CYP2E1* rzędu ok. 15% co można uznać jedynie za tendencję do hamowania jego ekspresji. Po 10 dniach efekt nasilił się powodując spadek poziomu transkryptu o ponad 26% wobec grupy kontrolnej, przy czym wynik ten nie był również znamieny ($p < 0,05$). Efekt redukcji poziomu mRNA o wartość 38% u szczurów uzyskał również zespół *Martini i wsp.* [1997] pod wpływem pojedynczej dawki 100 mg/kg disulfiramu podanej dootrzewnowo. Natomiast w pracy autorstwa *Pratt-Hyatt i Hollenberg*, [2010] odnotowano zmniejszenie aktywności CYP2E1 *in vitro* w obecności NADPH w sposób zależny od czasu i stężenia inhibitora. Autorzy pracy w której wykorzystano DDC uznają, że inaktywacja CYP2E1 przebiega poprzez kowalencyjne wiązanie adduktu z enzymem. Dalsza analiza pozwoliła uznać, że dietyloditiokarbaminian może tworzyć wiązanie disiarczkowe z jedną z ośmiu cystein obecnych a apoproteinie CYP2E1. Badania nad hamującym wpływem dietyloditiokarbaminianu na CYP2E1 wciąż trwają.

5.2.1. Wpływ *Echinacea purpurea* na poziom transkryptu i aktywność CYP1A2 i CYP2E1

W monoterapii przyjmowanie jeżówki wiąże się z niewielkim ryzykiem dla konsumenta [*Freeman i Spelman*, 2008]. Natomiast niekontrolowane stosowanie jej preparatów podnosi prawdopodobieństwo występowania klinicznie istotnych interakcji z substratami enzymów CYP, w tym lekami immunosupresyjnymi, przeciwzakrzepowymi, benzodiazepinami i blokerami kanału wapniowego, co może skutkować poważnymi

konsekwencjami zdrowotnymi [Gorski i wsp., 2004]. Pomimo tego interakcje między przetworami z jeżówki purpurowej a lekami syntetycznymi nie są dotychczas kompleksowo opisane.

Badania z wykorzystaniem bakulowirusowych wektorów ekspresyjnych CYP wykazały, że wyciąg z jeżówki słabo hamuje aktywność CYP1A2, CYP2C19, CYP2D6 i CYP3A4 *in vitro* [Modarai i wsp., 2007]. Autorzy twierdzą, że alkiloamidy odpowiedzialne za właściwości immunomodulacyjne jeżówki mogą hamować CYP3A4, CYP2C19 i CYP2D6. Natomiast w przeciwieństwie do wpływu całego ekstraktu, nie redukują one aktywności CYP1A2. W związku z powyższym za obserwowany efekt mogą odpowiadać inne składniki obecne w preparatach *Echinacea* [Modarai i wsp., 2007]. W kolejnym badaniu *in vitro* wykazano, że izolowane hydrofobowe alkiloamidy z jeżówki w stężeniu 25 μ M wykazały zdolność hamowania aktywności CYP2E1 mierzonej za pomocą substratu p-nitrofenolu w ludzkich mikrosomach wątroby. Aktywność tego enzymu nie uległa zmianie pod wpływem kwasu kawowego [Raner i wsp., 2007]. Autor sugeruje, że ekstrakty przygotowywane przy użyciu rozpuszczalników z wysoką zawartością etanolu zawierają zazwyczaj znaczne ilości hydrofobowych alkiloamidów i wywierają wyższy wpływ hamujący na enzymy CYP, natomiast ekstrakty wodno-etanolowe większe ilości bardziej hydrofilowych pochodnych kwasu kawowego.

Wyniki badań *in vivo* w modelu szczurzym uzyskane w poniższej pracy potwierdzają na poziomie transkryptu sugestie wskazujące na brak efektu modulacji CYP1A2 przy stosowaniu suplementacji jeżówką. W pracy wykazano brak związku pomiędzy trwającym 3 oraz 10 dni podawaniem wyciągu jeżówki purpurowej standaryzowanego na zawartość kwasu kawowego (3,7%) w dawce 50 mg/kg p.o. a poziomem transkryptu CYP1A2 w komórkach wątroby szczurów z grupy badanej względem grupy kontrolnej. Brak wpływu obserwowano również na poziomie mRNA czynnika AhR. W pracy doktorskiej nie obserwowano indukcji transkrypcji lub stabilizacji mRNA mierzonych stężeniem transkryptu CYP2E1 u szczurów otrzymujących dziennie 50 mg/kg p.o. względem grupy kontrolnej. Przy wspomnianej dawce zanotowano niewielką redukcję mRNA, która po 3 dniach podawania ekstraktu wyniosła około 12% ($p=0,037$) natomiast po 10 dniach odpowiednio 17%. Uzyskane rezultaty wskazują, że zastosowany wyciąg nie zawiera silnych agonistów i antagonistów szlaku sygnałowego AhR oraz nie podnosi poziomu konstytutywnej ekspresji AhR. Należy zauważyć, iż badania nad możliwością zmian ekspresji i/lub aktywności izoformy CYP2E1 są istotne ze względu na możliwość tworzenia reaktywnych form tlenu i nasilania toksyczności substratów oraz tworzenia adduktów DNA generowanych przez ten

enzym. Nie stwierdzono dotychczas, który ze składników aktywnych przetworów z jeżówki mógłby odpowiadać za obserwowane w pracach efekty.

Gorski i wsp. [2004] zwraca uwagę na ograniczoną liczbę badań *in vivo* dotyczących interakcji jeżówki z innymi środkami stosowanymi w terapii. Analiza wpływu przyjmowania przetworów z jeżówki na aktywność CYP1A2 w badaniach klinicznych opiera się głównie o parametry farmakokinetyczne. Istnieją prace oparte na pomiarze cDNA wskazujące, że nalewki z jeżówki mogą hamować aktywność CYP3A4, natomiast wpływ na CYP1A2 nie jest znany. Zespół *Gorski i wsp.* [2004] przeprowadził badania określające wpływ przyjmowania komercyjnie dostępnego wyciągu z korzenia *E. purpurea* zawierającego powyżej 1% fenoli w dawce 4 x 400 mg przez 8 dni na metabolizm kofeiny, tolbutamidu i dekstrometofanu - specyficznych markerów izoform CYP1A2, CYP2C9 i CYP2D6 w surowicy krwi i moczu u 12 badanych osób. Wykazano, że przyjmowany wyciąg w zastosowanej dawce był dobrze tolerowany przez organizm i nie powodował niekorzystnych efektów ubocznych. Dodatkowo oceniono wpływ przyjmowania jeżówki na aktywność CYP3A poprzez dożylne i doustne przyjmowanie midazolamu. Zanotowano istotne obniżenie klirensu markera aktywności CYP1A2 - kofeiny o 27% na podstawie czego można wnioskować, iż krótkotrwałe przyjmowanie jeżówki prowadzi do hamowania aktywności katalitycznej CYP1A2 w badaniach *in vivo*, co może mieć znaczenie dla substratów o wąskim indeksie terapeutycznym takich jak teofilina i klozapina. Czas półtrwania kofeiny nie uległ zmianie po podaniu jeżówki [*Gorski i wsp.*, 2004].

W badaniach *Gurley i wsp.* [2004] opartych o analizę metabolizmu kofeiny i chlorzoksazonu odpowiednio katalizowanych przez CYP1A2 i CYP2E1 u 12 zdrowych ochotników wykazano, że *Echinacea purpurea* podawana doustnie w dawce 800 mg 2x dziennie przez 28 dni nie zmienia istotnie aktywności tych enzymów. Nie zaobserwowano istotnych zmian w stosunku stężeń paraksantyny i kofeiny w surowicy krwi. Jest to zależność podobna do obserwowanej w pracy doktorskiej. Autor wskazuje jednak, że roztwór 5-10% komercyjnie dostępną nalewki z korzeni *E. pallida* i *E. ngustifolia* oraz nadziemnej części *E. purpurea* hamuje metabolizm CYP3A4 natomiast wpływ jeżówki na aktywność katalityczną innych izoform, w tym CYP1A2, CYP2C9, CYP2D6 nie jest w pełni znany [*Gorski i wsp.*, 2004].

Warto podkreślić, że na końcowy efekt właściwości przetworów *E. purpurea* wobec enzymów CYP450 wpływ mają technika przygotowywania ekstraktu oraz stan i skład surowca. Wykazano, że składniki hydrofobowe, w tym alkilamidy, wywołują większą inhibicję izoform CYP450 niż hydrofilowe takie jak fenylopropanoidy [*Raner i wsp.*, 2007].

Postuluje się, że efekt hamowania CYP1A2 zależy od zróżnicowania międzyosobniczego a podawanie przetworów jeżówki może spowodować wzrost stężenia teofiliny w osoczu. Ze względu na fakt, iż jest to substrat CYP1A2 o wąskim zastosowaniu medycznym niewielkie zmiany osiągające 20% jego klirensu są uważane za klinicznie istotne [Gorski i wsp., 2004]. W związku z powyższym zmiany ekspresji i aktywności mogą mieć szczególne znaczenie dla pacjentów cierpiących na astmę i zapalenie oskrzeli, którzy jednocześnie korzystają z właściwości przetworów jeżówki wraz z standardową terapią.

Na podstawie badań klinicznych wykazano, że wpływ popularnych suplementów zawierających jeżówkę u zdrowych ochotników na CYP1A2, CYP2D6, CYP2E1 i CYP3A4 jest niewielki a ryzyko interakcji relatywnie niskie. Jednak badania dotyczące bezpieczeństwa wciąż trwają [Gorski i wsp., 2004; Gurley i wsp., 2004; Freeman i Spelman, 2008]. Freeman i Spelman zwracają uwagę na fakt, że brak zweryfikowanych doniesień o interakcjach tego surowca z lekiem syntetycznym. Biorąc pod uwagę szacowane ryzyko związane z przyjmowaniem produktów *Echinacea* (1 na 100 000), liczbę dawek spożywanych rocznie określaną na powyżej 10 mln, fakt krótkoterminowego stosowania i liczbę zdarzeń niepożądanych (<100), produkty jeżówki purpurowej nie wydają się stanowić istotnego zagrożenia dla konsumentów [Freeman i Spelman, 2008].

5.2.2. Wpływ *Glycine max* na poziom transkryptu i aktywność CYP1A2 i CYP2E1

Badania epidemiologiczne i eksperymentalne dostarczają danych potwierdzających korzystny wpływ izoflawonów sojowych, będących źródłem fitoestrogenów, na organizm człowieka. Dieta sojowa wydaje się zmniejszać częstotliwość występowania chorób przewlekłych, takich jak otyłość, miażdżyca, i cukrzyca. Ponadto doniesienia literaturowe sugerują istnienie związku między wysokim spożyciem produktów sojowych a obniżonym ryzykiem zapadalności na niektóre typy nowotworów, co obserwowano w populacji azjatyckiej, w tym raka piersi, jajnika, prostaty i jelita grubego [Singhal i wsp., 2007]. Prowadzone w tym zakresie badania na zwierzętach wydają się potwierdzać zmniejszoną częstość chemicznie indukowanych przypadków raka piersi, prostaty i jelita, jednak mechanizm tego oddziaływania nie został w pełni poznany. Z drugiej strony dane uzyskane z badań oczyszczonych izoflawonów stosowanych w stężeniach farmaceutycznych, podawanych gryzoniom, wskazują na ryzyko wystąpienia zaburzeń rozrodczych zarówno u kobiet jak i mężczyzn [Delclos i wsp., 2001; Singhal i wsp., 2009]. Dowiedziono, że flawonoidy mogą wpływać na stężenie niektórych leków w surowicy krwi powodując

nasilenie lub brak efektu terapeutycznego, co może stanowić konsekwencję ich zdolności do modulacji aktywności enzymów CYP głównie na etapie transkrypcji i stabilizacji mRNA [Kishida i wsp., 2004]. Na podstawie badań *in vitro* składników soi zaobserwowano ich potencjalny hamujący wpływ na aktywność enzymów z nadrodziny cytochromu P450 i uznano daidzeinę, genisteinę i glicytnę za inhibitory niekompetycyjne CYP2A6. Ponadto hydrolizowane ekstrakty sojowe mogą hamować CYP2C9 i CYP3A4 w ludzkich mikrosomach wątroby [Foti i Wahlstrom, 2008].

Dotychczas niewiele wiadomo na temat mechanizmów, dzięki którym preparaty soi regulują ekspresję izoform CYP1A oraz CYP2E1 a także ich efekcie na szlak sygnałowy czynnika AhR. Badania *in vitro* i *in vivo* zmierzają do wyjaśnienia oddziaływania izoflawonów na zróżnicowanie substratowe i aktywność enzymów metabolizujących ksenobiotyki [Anzenbacher i Anzenbacherova, 2001]. Istnieją prace wskazujące, że genisteina może hamować tworzenie adduktów DNA *in vitro* powstałych w wyniku ekspozycji na benzo[a]piren poprzez obniżenie aktywności CYP1A1. Podobne wnioski dotyczą obniżenia indukowanej 3-MC aktywności CYP1A1 oraz wywołanej DMBA ekspresji CYP1A1 i AhR u szczurów karmionych izolatem białka sojowego [Rowlands i wsp., 2001; Ronis i wsp., 2001; Singhal i wsp., 2007]. Rezultaty badań z użyciem ludzkich mikrosomów wątroby wykazały supresję aktywności CYP1A2, CYP2A6, CYP2D6 i CYP2C9 oraz CYP3A4 pod wpływem hydrolizowanego ekstraktu sojowego, co obserwowano w oparciu o metabolizm substratów tych enzymów, odpowiednio: fenacetyny, kumaryny, dekstrometofanu, warfaryny i testosteronu. Niehydrolizowany ekstrakt soi wywołał nieznaczną inhibicję CYP1A2, CYP2A6 i CYP2D6 i słabą aktywację CYP3A4 [Anderson i wsp., 2003]. Mechanizm odpowiedzialny za możliwe oddziaływania aktywnych składników preparatów sojowych na ekspresję genów z podrodziny CYP1A oraz jego związek z czynnikiem AhR nie jest jasny.

Uzyskane w pracy doktorskiej wyniki obrazują wpływ standaryzowanego ekstraktu sojowego (100 mg/kg p.o.) na poziom mRNA CYP1A2 i CYP2E1 oraz czynnika transkrypcyjnego AhR zaangażowanego w regulację ekspresji CYP1A2 w modelu *in vivo* z wykorzystaniem techniki *real-time* PCR. W pracy doktorskiej wykazano brak zmian w poziomie konstytutywnym mRNA CYP1A2 w wątrobie szczurów otrzymujących standaryzowany wyciąg alkoholowy o zawartości 37% izoflawonów w przeliczeniu na genisteinę w dawce dobowej 100 mg/kg p.o., niezależnie od okresu podawania (3 lub 10 dni). Jednocześnie w grupie zwierząt otrzymujących ekstrakt przez 10 dni obserwowano istotne ($p < 0,001$) zwiększenie ilości transkryptu genu *AHR* o ok. 61%, przy czym w krótszym

okresie czasu (3 dni) nie zanotowano takiej zależności. Wyciąg *Glycine max* po 3 dniach podawania wywołał istotne obniżenie poziomu mRNA genu *CYP2E1* o 25% w stosunku do wyniku dla grupy kontrolnej ($p=0,005$). Efekt ten dotyczył wszystkich osobników w grupie badanej. W dłuższym okresie czasu nie obserwowano żadnych zmian na poziomie mRNA *CYP2E1*. Podobne obserwacje dotyczące transkryptu *CYP1A2* odnotowano w badaniach na szczurach rasy Sprague Dawley otrzymujących wyciąg z fermentowanych nasion soi w dawce 300 mg/kg diety o zawartości 155 mg/g genisteiny i 127 mg/g daidzeiny przez 4 tygodnie. Brak modyfikacji stężenia mRNA dotyczył głównych wątrobowych izoform cytochromu P450, w tym również *CYP1A1* i *CYP2E1*. Wyniki te mogą sugerować, że izoflawony sojowe stosowane w dłuższym okresie czasu nie powodują indukcji enzymów CYP na poziomie transkrypcji i potranskrypcyjnej stabilizacji mRNA [Kishida i wsp., 2004]. Do podobnych wniosków doszedł zespół Helsby i wsp., który wykazał, że daidzeina i metabolit genisteiny - ekwol nie wpływają na aktywność i poziom białka *CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP3A1* i *CYP2E1* u myszy po podaniu dootrzewnowym do dawki 40 mg/kg masy ciała [Helsby i wsp., 1997]. W rezultacie późniejszych badań zespół ten sugeruje, że izoflawony sojowe i ich metabolity mogą nieznacznie, w sposób nieistotny statystycznie, zredukować zawartość białka i aktywność *CYP1A2*, lecz uznaje on również że nie jest to wystarczający argument na wyjaśnienie chemoprewencyjnych właściwości izoflawonów sojowych [Helsby i wsp. 1998; Kishida i wsp. 2004]. Stosowanie izolatu białka sojowego zawierającego wysokie dawki (430 mg/kg) izoflawonów, w tym 276 mg/kg genisteiny i 132 mg/kg daidzeiny, redukuje zarówno konstytutywną, jak i indukowaną DMBA, aktywność *CYP1A1* (EROD) *in vivo* [Singhal i wsp., 2007]. Obniżenie ilości apoproteiny *CYP1A1* i mRNA oraz osłabienie wiązania dimeru AhR z ARNT do sekwencji XRE obserwowano jedynie w grupie zwierząt narażonych na działanie indukcyjne DMBA pod wpływem diety zawierającej izoflawony. Konstytutywny poziom białka AhR określany w lizacie tkanki wątrobowej uległ redukcji dopiero po 20 dniach stosowania izolatu i towarzyszył mu brak zmian mRNA w grupie otrzymującej tę dietę. Badania *in vitro* tego samego zespołu wykazały redukcję białka i mRNA *CYP1A1* odpowiednio o 25% i 50% po inkubacji szczurzych komórek wątrobowych w medium zawierającym surowicę zwierząt indukowanych DMBA oraz 25% spadek ilości białka AhR przy braku zmian mRNA tego czynnika [Singhal i wsp., 2007]. Autorzy wnioskuje o regulacji genu *AHR* na poziomie potranskrypcyjnym, w tym możliwości stymulowania obrotu białka AhR w komórce ze wskazaniem na jego proteosomalną degradację pod wpływem składników aktywnych soi [Singhal i wsp., 2007]. Ten sam zespół zaobserwował brak wpływu genisteiny i daidzeiny w stężeniach obecnych w izolacie białkowym soi na mechanizm transdukcji

sygnału czynnika AhR. Ponadto autorzy zwracają uwagę na możliwość regulacji tego szlaku na etapie białka XAP2 [Singhal i wsp., 2008]. Dla pełnej interpretacji wyników badań istotne jest poznanie zarówno mechanizmów kontroli ekspresji enzymów CYP450 na etapie transkrypcji jak i potranskrypcyjnych. W przypadku przedstawionych w pracy izoform nie bez znaczenia jest stabilność transkryptów i białek w komórce. Dowiedziono, że okres półtrwania mRNA CYP1A2 i CYP2E1 wynosi > 24h, natomiast dla najczęściej opisywanego enzymu CYP1A1 jest to wartość jedynie 2,4h. Wobec tego transkrypt ten jest uznawany za jeden z najmniej trwałych o najkrótszym czasie połowicznego rozpadu [Lekas i wsp., 2000]. Fizjologiczna funkcja czynnika AhR, uzasadniona konstytutywną ekspresją, nie jest szczegółowo poznana i wymaga dalszych badań. W ostatnich latach opisano nową klasę ligandów AhR określanych jako selektywne modulatory AhR (SAhRM), która nie pośredniczy w aktywacji genów odpowiedzi na ksenobiotyk a stymuluje i utrzymuje zależną od czynnika AhR, niekanoniczną aktywność związaną z supresją genów ostrej fazy reakcji zapalnej w wątrobie [Narayanan i wsp., 2012]. Z tego punktu widzenia selektywna indukcja tego czynnika miałyby uzasadnienie terapeutyczne [Murray i wsp., 2010]. Wobec tego być może ekstrakt z soi stanowi źródło naturalnie występujących ligandów wykazujących potencjalne właściwości selektywnego modulatora receptora AhR. Składnikami typowanymi do tej funkcji są izoflawony, które mogłyby w ten sposób wpływać na procesy fizjologiczne poprzez aktywację AhR [Medjakovic i wsp., 2010]. Wobec powyższego, obserwowany w pracy doktorskiej wzrost poziomu mRNA AhR pod wpływem zastosowanego w pracy ekstraktu z soi bez zmian ekspresji CYP1A2 byłby uzasadniony.

5.2.3. Wpływ *Allium sativum* na poziom transkryptu i aktywność CYP1A2 i CYP2E1

Aktywność farmakologiczna preparatów i wyciągów z czosnku związana jest z obecnością bogatych w siarkę składników aktywnych - allicyny i alliiny oraz flawonoidów takich jak kwercetyna i rutyna. Istnieją doniesienia sugerujące, że produkty będące przetworami tego surowca mogą modyfikować parametry farmakokinetyczne leków, w tym paracetamolu, prowadząc do nasilania jego toksyczności [Izzo i Ernst, 2001]. Ponadto związki siarkowe zawarte w czosnku są badane w kierunku zdolności do redukcji indukowanych w modelach zwierzęcych nowotworów, na drodze modyfikacji enzymów detoksykacyjnych, w tym CYP2E1 [Davenport i Wargovich, 2005; Wargovich, 2006]. W związku z pracami sugerującymi możliwość zachodzenia interakcji oraz modyfikacji metabolizmu substratów

izoform CYP1A2 i CYP2E1, podjęto próbę analizy w modelu *in vivo*, stanowiącą przedmiot niniejszej pracy doktorskiej.

Istnieją doniesienia sugerujące spadek aktywności CYP2E1 i poziomu białka tego enzymu pod wpływem siarczku diallilu (DAS), disiarczku diallilu (DADS) oraz wzrost aktywności i poziomu białka CYP2B1 [Brady *i wsp.*, 1991b; Park *i wsp.*, 2002]. Supresja CYP2E1 obserwowana była również w szczurzych mikrosomach izolowanych od zwierząt otrzymujących olejek z czosnku w dawce 500 mg/kg, przy czym po 24, 48 oraz 72h otrzymywania preparatu w zakresie dawek 200-1000 mg/kg zanotowano niewielką redukcję białka tego enzymu i brak wpływu na mRNA [Kwak *i wsp.*, 1995]. Natomiast w badaniu zespołu Greenblatt *i wsp.*, [2006] polarne składniki czosnku takie jak allina, nie wykazywały istotnego hamowania aktywności enzymów CYP *in vitro*. Słaby efekt redukcji uzyskano jedynie dla S-metylo-L-cysteiny i S-allilo-L-cysteiny wobec CYP3A4, choć zdaniem autora brak jest doniesień z badań klinicznych potwierdzających istotne ryzyko interakcji z udziałem substratów tego enzymu. Istnieją również sugestie wskazujące na zdolność składników czosnku do indukcji aktywności CYP3A4 lecz są one niewystarczające [Foti *i Wahlstrom*, 2008]. W innym badaniu *in vitro* w wyniku inkubacji mikrosomów z sulfonem diallilu w obecności systemu generującego NADPH, nastąpiła inaktywacja CYP2E1 zależna od czasu, stężenia i przebiegająca zgodnie ze wzorem typowej inhibicji samobójczej [Brady *i wsp.*, 1991c]. Siarczek diallilu (DAS) ulega przekształceniom do sulfotlenku diallilu (DASO) oraz sulfonu diallilu (DASO₂) przez izoformę CYP2E1. Uważa się, że sulfon diallilu jest przekształcany dalej przez ten izoenzym do reaktywnych form pośrednich, które modyfikują grupę hemową enzymu CYP2E1 [Yang *i wsp.*, 1992].

Doświadczenia wykonane na zwierzętach potwierdzają chemoprewencyjne właściwości czosnku w stosunku do szeregu kancerogenów. Według doniesień literaturowych siarczek diallilu wykazuje niską aktywność przeciwnowotworową, jednak jego metabolity generowane przez CYP2E1: DASO oraz DASO₂ takie działanie posiadają [Yang *i wsp.*, 2001]. Składniki te redukują toksyczność indukowaną substratami CYP2E1 acetaminofenem, czterochlorkiem węgla i N-nitrozodimetyloaminą u gryzoni. Uznawane są za inhibitory kompetycyjne CYP2E1. Ponadto DASO₂ jest samobójczym inhibitorem CYP2E1 ponieważ wiążąc się nieodwracalnie w jego miejscu aktywnym, niszczy aktywność katalityczną. Wyniki badań pracy doktorskiej mające na celu pomiar mRNA izoform CYP1A2 i CYP2E1 oraz czynnika AhR techniką *real-time* PCR w wątrobie gryzoni w zależności od podawania wyciągu czosnku pospolitego w dawce 250 mg/kg p.o. wskazują na brak znaczących zmian w poziomie transkrypty CYP1A2 po 3 i 10 dniach stosowania.

Obserwowano natomiast redukcję mRNA czynnika AhR o 20% ($p=0,012$) po 10 dniach doświadczenia przy niewielkim, około 12% obniżeniu ilości CYP1A2. Biorąc pod uwagę fakt, iż czynnik ten reguluje również ekspresję CYP1A1, należałoby określić poziom transkryptu tej izoformy. W przypadku CYP2E1 zanotowano jedynie nieznaczne, niespełna 17% hamowanie CYP2E1 po 3 dniach stosowania ekstraktu czego nie potwierdzono po wydłużeniu czasu trwania doświadczenia do 10 dni. Należy nadmienić, że wyniki te nie wykazują istotności statystycznej przy $p<0.05$. Badania nad wpływem określonych siarkowych składników organicznych czosnku na mRNA CYP1A2 i CYP2E1 w wątrobie u szczurów realizował również *Davenport i Wargovich* [2005]. Nie wykazano wówczas istotnego wpływu żadnego analizowanych związków: DAS, DADS, AMS, DPS, DPDS, PMS i SAC przy zróżnicowanych dawkach 200 mg/kg, 100 mg/kg i 50 mg/kg na poziom transkryptu wspomnianych izoform. Jest to wynik podobny do otrzymanego w pracy doktorskiej. Natomiast badania białka wykazały, że podanie dożołądkowe dobowych dawek 200 mg/kg DAS, DADS oraz 2-propenyl siarczku metylu (AMS) obniżyło poziom wątrobej frakcji białka CYP2E1 odpowiednio o 45%, 25% i 47% ($p<0.01$) co obserwowano po 1, 4 i 8 tygodniach leczenia. Siarczek dipropylu (DPS), disiarczek dipropylu (DPDS), PMS i SAC nie wpłynęły na białko frakcji wątrobowej tej izoformy. DAS w dawce 200 mg/kg zwiększył poziom białka CYP1A2 o 282% ($p<0.01$), podczas gdy inny składnik siarkowy siarczek allilo-metylowy (AMS) zwiększył białko CYP1A2 o 70% ($p<0.05$). Efekt wydłużonego podawania 200 mg/kg DAS i AMS zarówno po 1,4 i 8 tygodniach wywołał istotną redukcję o ponad 50%, ($p<0.05$) białka wątrobowej frakcji CYP2E1. Przewlekłe podawanie 200 mg/kg DAS i AMS prowadziło do zależnego od czasu zwiększania ilości białka izoform CYP1A do poziomu istotnie wyższego niż w sytuacji zastosowania pojedynczej dawki każdego ze składników. Po 8 tygodniach podawania DAS i AMS wzrost ilości białka CYP1A2 osiągnął poziom odpowiednio wyższy o 50% i 240% [*Davenport i Wargovich*, 2005]. Podobnie dłuższe podawanie dawek 50 and 100 mg/kg DAS obniżyło poziom białka wątrobowej CYP2E1 odpowiednio o 39% i 52% ($p<0.05$). DAS w dawce 50 mg/kg istotnie podniósł poziom białka CYP1A1 i CYP1A2 o odpowiednio 146% i 173%. Interesujące jest, że nie obserwowano takiej zależności dla dawki 100 mg/kg DAS na CYP1A1 i CYP1A2. Krótkotrwałe podawanie DAS może powodować szybką redukcję aktywności CYP2E1, przy czym silna supresja występuje po 4 tygodniach stosowania. Autorzy rozważają możliwość zachodzenia interakcji z lekami lub innymi substratami CYP2E1 o niskiej masie cząsteczkowej, a przy długoterminowym stosowaniu także do uszkodzenia wątroby [*Wargovich*, 2006]. Prace nad efektem sproszkowanego czosnku w diecie na aktywność

i białko CYP2E1 u szczurów z indukowanym dietylonitrozaminą procesem hepatokancerogenezy prowadził zespół *Park i wsp.* [2002]. Zwierzęta otrzymujące przez okres 8 tygodni dietę zawierającą 2.0 i 5.0% czosnku wykazywały niższą aktywność CYP2E1 oraz poziom białka tego enzymu a także zmniejszone ogniska zmian indukowanych podaniem i.p. dietylonitrozaminy [*Park i wsp.*, 2002]. Zdaniem *Le Bon i wsp.* [2003] dieta wzbogacona o 5% sproszkowanego czosnku stosowana u szczurów przez 2 tygodnie wywołuje redukcję CYP2E1 oraz nieznaczny wzrost aktywności CYP1A2 (EROD) [*Le Bon i wsp.*, 2003]. Natomiast olejek z czosnku (100 mg/kg) stosowany przez 1 i 60 dni nie wywoływał uszkodzenia wątroby, natomiast redukował istotnie aktywność i poziom białka zarówno CYP2E1 jak i CYP1A2 u myszy, co wskazywało na jego właściwości hepatoprotekcyjne [*Zeng i wsp.*, 2009]. Wynik wskazujący na redukcję aktywności O-deetylazy 7-etoksyrezorufiny uzyskano u myszy karmionych DAS (200 mg/kg) lub DASO₂ (50 mg/kg) [*Yang i wsp.*, 1994]. Podobnie odnotowano znaczący spadek aktywności mikrosomalnego enzymu NDMA (demetylaza N-nitrozodimetyloaminy) będącego miarą funkcjonowania CYP2E1 u szczurów pod wpływem siarczku diallilu. Wiązało się to ze spadkiem poziomu białka CYP2E1 w mikrosomach, co wykazano technikami immunodetekcji [*Brady i wsp.*, 1991c; *Yang i wsp.*, 1992]. Trisiarczek diallilu (DATS) podawany w dawce 500 μmol/kg i.g. przez 5 dni także hamuje aktywność i zmniejsza poziom białka CYP2E1 oraz wykazuje właściwości hepatoprotekcyjne u szczurów z indukowanym przez czterochlorek węgla ostrym uszkodzeniem wątroby [*Hosono-Fukao i wsp.*, 2009].

Interpretując badania w modelu zwierzęcym należy zauważyć, że dawki związków siarkowych w nich stosowanych są znacznie wyższe niż obecne w preparatach przyjmowanych przez człowieka, w związku z czym ryzyko działań niepożądanych i interakcji na poziomie badanych izoform wymaga weryfikacji w analizach klinicznych. Jednocześnie korzyści płynące z monoterapii również są znacznie słabsze. Badania kliniczne z wykorzystaniem czosnku są nieliczne, przy czym kilka z nich wskazuje na hamowanie aktywności izoenzymów CYP *in vivo*. Zespół *Gurley i wsp.* [2005a] podczas badań na grupie starszych pacjentów wykazał, że długoterminowe stosowanie olejku z czosnku w dawce 500 mg 3x dziennie przez okres 28 dni prowadziło do istotnego obniżenia aktywności CYP2E1, co monitorowano redukcją o 22% stosunku 6-hydroksychlorzoksazonu do chlorzoksazonu w surowicy. Nie obserwowano natomiast istotnie statystycznych zmian metabolizmu kofeiny, co wskazywać może na brak zmian aktywności CYP1A2 [*Gurley i wsp.*, 2005a]. U młodszych osób w pracy tego zespołu, w tych samych warunkach pod wpływem czosnku obserwowano zmniejszenie aktywności o 39% [*Gurley i wsp.*, 2002]. W badaniach tych nie

wykonywano analiz poziomu mRNA. Inne prace nie wykazują istotnych zmian aktywności CYP2D6 i CYP3A4 po suplementacji diety preparatami czosnku [Markowitz i wsp., 2003]. Hamowanie aktywacji wielu ksenobiotyków przez CYP2E1 i redukcja tworzenia wolnych rodników oraz acetaldehydu sprawia że siarkowe związki czosnku posiadają wysoki terapeutyczny potencjał. Z tego względu identyfikacja najbardziej efektywnych inhibitorów CYP2E1 może prowadzić w kierunku rozwoju suplementów diety czy leków wzbogaconych o te składniki lub zasugerować inżynierię genetyczną prace w kierunku zmiany zawartości związków siarkowych czosnku. Jednak podczas rozważań należy wziąć pod uwagę fakt, iż większość z obserwowanych efektów występuje przy dawkach znacznie wyższych niż standardowo przyjmowane przez człowieka. Biologiczna aktywność czosnku i jego składników w niższych stężeniach zbliżonych do poziomu konsumpcji pozostają celem przyszłych badań [Yang i wsp., 2001].

5.2.4. Wpływ *Valeriana officinalis* na poziom transkryptu i aktywność CYP1A2 i CYP2E1

Obecne na rynku farmaceutycznym przetwory z korzenia kozłka lekarskiego cieszą się dużym zainteresowaniem zwłaszcza w terapii zaburzeń snu i łagodnych stanów nerwicowych. Wśród składników wyciągów tego surowca nie określono głównego związku aktywnego. Badania z zastosowaniem izolowanych komponentów nie wyjaśniają w pełni obserwowanych właściwości farmakologicznych, które są prawdopodobnie efektem działania synergistycznego kilku składników. Ze względu na możliwość zachodzenia interakcji pomiędzy przetworami z *V. officinalis* a lekami syntetycznymi podejmowane są badania kliniczne w celu wskazania farmakologicznych punktów uchwytu związków biologicznie aktywnych [ESCOP, 2003]. Istnieje niewiele doniesień literaturowych opisujących badania interakcji przetworów z kozłka lekarskiego z substratami izoform cytochromu P450. Przegląd literatury wskazuje, iż wyciąg z korzenia kozłka hamuje aktywność CYP3A4 w badaniach *in vitro* nawet o wartość 88%. Kwas walerenowy wykazuje znacznie mniejszą zdolność hamowania CYP3A4 i słaby efekt inhibicji wobec CYP2C9 i CYP2C19 [Foti i Wahlstrom, 2008]. Badanie *in vitro* wykonane przez zespół Hellum i wsp. [2007] na ludzkich pierwotnych hepatocytach nie wykazało zależności dawki ekstraktu z aktywnością CYP1A2.

Wyniki badań *in vivo* przedstawione w niniejszej pracy wskazują na brak istotnego wpływu wyciągu z *V. officinalis* w dawce 300 mg/kg p.o. stosowanego przez 3 dni oraz 10 dni na poziom transkryptu genu CYP1A2 oznaczanego techniką PCR w czasie rzeczywistym

względem grupy kontrolnej karmionej standardową dietą. Warto nadmienić, że 3 dniowe podawanie wspomnianej dawki wyciągu z surowca spowodowało natomiast istotne ($p=0,004$), lecz niewielkie podwyższenie ilości mRNA AhR oznaczanego techniką PCR w czasie rzeczywistym względem grupy kontrolnej. Po 10 dniach podawania zwierzętom ekstraktu *V. officinalis* nie obserwowano takiej zależności. Ponadto w komórkach wątroby zwierząt otrzymujących ekstrakt obserwowano istotną ($p<0,001$) redukcję ilości transkrypty CYP2E1 o ok. 30% po 3 dniach badania oraz o ponad 25% po 10 dniach doświadczenia względem grup kontrolnych. Ze względu na brak dostępnych danych z badań na modelu zwierzęcym utrudnione jest wnioskowanie o zależności efektu od dawki i standaryzacji ekstraktu. Podobny do uzyskanego w pracy doktorskiej efekt w badaniu klinicznym zanotował *Gurley i wsp.* [2005b], po 28 dniowym okresie podawania kozłka w dawce dobowej 375 mg [*Gurley i wsp.*, 2005b]. Podczas takiej suplementacji nie wykazano zmian aktywności CYP1A2 i CYP2E1 mierzonych metabolizmem kofeiny i chlorzoksazonu w badaniu klinicznym u ochotników. Brak wpływu produktu kozłka lekarskiego na fenotyp wspomnianych enzymów CYP zdaniem autora może wynikać z niskiej zawartości kwasu walerenowego. Obserwacje z opisanego badania klinicznego potwierdzają uzyskany w niniejszej pracy doktorskiej wynik świadczący o braku indukcji CYP1A2 przez przetwory z kozłka w dawkach opisanych powyżej na poziomie transkrypty i aktywności. Badanie kliniczne potencjalnych interakcji tego surowca z innymi preparatami wykazało niewielki wpływ na aktywność CYP3A4 i brak efektu wobec CYP2D6 po trwającym 14 dni przyjmowaniu kozłka w ilości 1g/dzień na próbie 12 osób [*Donovan i wsp.*, 2004a].

Na podstawie przeglądu literatury można uznać, że kozłek lekarski nie generuje istotnych interakcji na poziomie aktywności badanych izoform cytochromu P450 po dłuższym stosowaniu w dawce dobowej 375 mg. Natomiast wyniki przeprowadzonego doświadczenia w modelu szczurzym jako pierwsze wskazują na istnienie możliwości oddziaływania ekstraktu kozłka na ekspresję CYP2E1, co ze względu na rodzaj biotransformowanych przez tę izoformę substratów, mogłoby potencjalnie świadczyć o właściwościach chemoprewencyjnych jego przetworów w monoterapii. Jednocześnie sugerują istnienie ryzyka zachodzenia interakcji przy jednoczesnym stosowaniu z paracetamolem, chlorzoksazonem i innymi lekami metabolizowanymi przez CYP2E1. Konieczne jest więc prowadzenie dalszych szerokich badań w tym zakresie, zwłaszcza ze względu, że ekstrakt ten może wykazywać właściwości modulujące wobec innych enzymów cytochromu P450.

5.2.5. Wpływ *Camellia sinensis* na poziom transkryptu i aktywność CYP1A2 i CYP2E1

Herbata zielona stanowi około 20% światowej produkcji odmian herbaty. Spośród aktywnych związków zawartych w roślinnych ekstraktach wzmożoną uwagę kieruje się na związki polifenolowe pozyskiwane z łodygi i liści, wykorzystywane jako naturalne antyoksydanty przeciwko indukowanej lekami toksyczności, w tym tworzeniu wolnych rodników. Właściwości prozdrowotne, w tym przeciwnowotworowe wykazane w badaniach epidemiologicznych, przypisuje się głównie katechinom oraz produktom ich kondensacji - teaflawinom i tearubiginom [Yang i wsp., 1996; Frei i Higdon, 2003]. Wyniki badań potwierdzają, że ekstrakt herbaty posiada silniejsze działanie antyoksydacyjne niż suma efektu działania pojedynczych składników aktywnych. Ponadto uznaje się, że obok mechanizmów opartych na hamowaniu aktywności enzymów uczestniczących w wytwarzaniu wolnych rodników tlenkowych, wychwytywaniu wolnych rodników oraz chelatowaniu jonów metali przejściowych, preparaty z surowca mogą modulować aktywność enzymów cytochromu P450 odpowiedzialnych za detoksykację i aktywację czynników prokancerogennych. Przegląd literatury wskazuje, że wiedza na temat potencjalnych interakcji składników zielonej herbaty i szlaku zależnego od AhR oraz wpływu na ekspresję genów CYP1A jest ograniczona. Istnieją jednak doniesienia pochodzące z badań *in vitro* i na zwierzętach analizujące wpływ *C. sinensis* i poszczególnych związków polifenolowych na enzymy metabolizmu ksenobiotyków. Wśród dowodów wskazujących na istotnienie chemoprewencyjnych właściwości ekstraktów z surowca znajdują się prace z wykorzystaniem modeli zwierzęcych z indukowanym rozwojem nowotworu, w tym poprzez mechanizm transdukcji sygnału AhR [Williams i wsp., 2000]. Należy jednak podkreślić, że brak jest doniesień *in vivo* opartych o analizę poziomu konstytutywnej transkrypcji badanych w pracy doktorskiej izoform cytochromu P450. Analiza dostępnej literatury wskazuje, że jest to jedyna dotychczas praca oceniająca wpływ ekstraktu z zielonej herbaty *in vivo* na poziom ekspresji CYP1A2, CYP2E1 oraz AhR techniką PCR w czasie rzeczywistym.

Wnioski pochodzące z prac *in vitro* dostarczają niejednokrotnie niepełnych i sprzecznych informacji na temat efektu wyciągów z surowca na CYP1A2 i CYP2E1. W badaniach Williams i wsp. [2000] podjęto analizę wpływu komercyjnie dostępnego ekstraktu zielonej herbaty oraz poszczególnych katechin na funkcję czynnika AhR i ekspresję genów CYP1A w ludzkiej linii komórkowej HepG2 i kulturach pierwotnych hepatocytów. Wykazano, że zastosowany ekstrakt, zawierający ponad 81% katechin, hamuje w sposób zależny od stężenia, indukowane przez TCDD wiązanie AhR do DNA i transkrypcję CYP1A,

co potwierdzono redukcją mRNA mierzonego techniką Northern blot dla genów *CYP1A1* i *CYP1A2* w ludzkich hepatocytach. Spośród katechin EGCG wykazywał właściwości antagonisty AhR, choć jego zdolność hamowania odpowiedzi na TCDD była niższa niż całego ekstraktu. Autorzy uznają, że zastosowany wyciąg wykazuje charakter mieszanego agonisty-antagonisty aktywności AhR. Rezultaty tej pracy wskazują, że modulacja ekspresji CYP1A nie jest właściwością pojedynczych katechin obecnych w ekstrakcie zielonej herbaty a wynikiem kompleksowego działania wszystkich składników. Można więc wnioskować że ekstrakt z zielonej herbaty zawiera niski poziom agonistów AhR lub też agonistów o niskim powinowactwie [Williams i wsp., 2000]. Odmienne wyniki uzyskano w badaniach *in vitro* zespołu Yang i Raner [2005], gdzie inkubacja komórek HepG2 z ekstraktem zielonej herbaty standaryzowanym na zawartość 50% polifenoli przez 6h wywołała indukcję CYP1A1, 1A2, 2C i 2E1 w sposób zależny od stężenia mierzoną techniką RT-PCR. Indukcję obserwowano również na poziomie białka izoform CYP1A, natomiast ilość enzymu CYP2E1 nie znalazła się w zakresie oznaczalności metody Western blot, zarówno przed jak i po inkubacji z zieloną herbatą. Zauważono natomiast spadek aktywności CYP1A i CYP2E1 pod wpływem ekstraktu. Różnicę pomiędzy zmianami mRNA i białka a aktywnością autorzy tłumaczą wpływem ekstraktu jako słabego agonisty powodującego niewielki wzrost poziomu enzymów CYP1A oraz jednoczesnej obecności w wyciągu składników je inaktywujących [Yang i Raner, 2005]. Inkubacja z poszczególnymi katechinami (EGC, EGCG, EG i ECG) prowadzona w tym samym badaniu nie wpłynęła na poziom ekspresji CYP1A1 i CYP1A2 mierzonej stężeniem mRNA a mechanizm ich oddziaływania nie jest w pełni wyjaśniony. Ponadto badania nad możliwością wpływu flawonoidów zawartych w diecie na aktywację transkrypcji CYP1A2 wskazują, że ekstrakt zielonej herbaty hamuje indukowaną aktywność AP-1 *in vitro*. Zespół Shih i wsp. [2000] sugeruje, że obecność miejsc wiązania czynników transkrypcyjnych z rodziny AP-1 w regionie flankującym sekwencji genu CYP1A2 może wskazywać na udział tych białek w regulacji ekspresji ludzkiej izoformy tego enzymu [Shih i wsp., 2000].

Wyniki własne, na podstawie badań w modelu szczurzym, wskazują na brak istotnego wpływu standaryzowanego ekstraktu zielonej herbaty w dawce 300 mg/kg p.o. na poziom ekspresji mierzonej techniką PCR w czasie rzeczywistym. Jednocześnie nie wykazano znaczących zmian w poziomie mRNA AhR u zwierząt otrzymujących suchy wyciąg alkoholowy z zielonej herbaty o zawartości 61% katechin. Niewielkie zwiększenie ilości transkryptu o niespełna 12% po 3 dniach oraz obniżenie tego poziomu o około 14% w dłuższym okresie czasu (10 dni) sugeruje istnienie przejściowej stymulacji transkrypcji

badanego czynnika. Zgodnie z sugestiami *Nikaidou i wsp.* [2005] wyciąg zielonej herbaty zawiera zarówno agonistów jak i antagonistów czynnika AhR, przy czym galusan epigalokatechiny uznawany jest za potencjalny inhibitor tego receptora [*Nikaidou i wsp.*, 2005]. Istnieje teoria, zgodnie z którą EGCG nie wiąże się do miejsca aktywnego AhR lecz oddziałuje bezpośrednio z białkiem opiekuńczym Hsp90, co powoduje zmiany konformacyjne AhR migrującego do jądra lecz pozbawionego zdolności wiązania DNA [*Palermo i wsp.*, 2005]. Dłuższe, trwające 4 tygodnie podawanie 2,5% roztworów zielonej herbaty szczurom do woli powoduje wzrost aktywności CYP1A1 w mikrosomach wątroby szczurzej po ich inkubacji ze specyficznym substratem. Nie zaobserwowano natomiast żadnych zmian aktywności CYP1A2 co byłoby zgodne z wynikiem uzyskanym w pracy doktorskiej na poziomie mRNA [*Niwattisaiwong i wsp.*, 2004]. Analizowany w pracy doktorskiej ekstrakt zielonej herbaty nie wykazywał istotnego wpływu na modulację poziomu transkryptu *CYP2E1*. Standaryzowany wyciąg podawany przez okres 3 dni w dawce 300 mg/kg p.o. nie spowodował zmian poziomu mRNA *CYP2E1* natomiast wydłużenie doświadczenia do 10 dni wywołało statystycznie nieistotne zwiększenie ekspresji *CYP2E1* o ok. 16%. Efekt indukcji mRNA *CYP2E1 in vitro* zanotował wcześniej inny zespół [*Yang i Raner*, 2005]. Ponieważ *CYP2E1* nie jest genem regulowanym przez receptory jądrowe PXR, VDR i GR, nie jest możliwe uzasadnienie wpływu zielonej herbaty na drodze podobnej do *CYP2C*, którego indukcję zanotowano również w badaniu wspomnianego zespołu. Obok regulacji ekspresji *CYP2E1* na drodze stabilizacji białka postuluje się istnienie czynników mogących oddziaływać także na etapie transkrypcji. Chociaż mechanizm ten pozostaje niewyjaśniony, niektórzy autorzy wskazują na udział cytokin poprzez aktywator transkrypcji - czynnik SP1 [*Peng i Coon*, 2000]. Inne doniesienia sugerują wpływ zielonej herbaty na aktywność wybranych enzymów CYP, w tym indukcję *CYP1A1* i *CYP1A2* oraz brak zmian *CYP2E1* obserwowane u szczurów po podaniu zróżnicowanych ekstraktów *Camellia sinensis* [*Bu-Abbas i wsp.*, 1994; *Sohn i wsp.*, 1994]. Szczury otrzymujące do woli świeży 2,5% ekstrakt wodny zielonej herbaty przez 4 tygodnie wykazywały zwiększony poziom aktywności MROD (*CYP1A2*) oraz w mniejszym stopniu EROD (*CYP1A1*) a także podwyższoną ilość apoproteiny *CYP1A2* [*Bu-Abbas i wsp.*, 1994]. Do podobnych wniosków prowadzą *Maliakal i wsp.* [2001], gdzie zanotowano wzrost aktywności *CYP1A1* i *CYP1A2* mierzone w mikrosomach wątroby po 4-tygodniowym okresie podawania 2-3% wyciągu z herbaty szczurom rasy Wistar [*Maliakal i wsp.*, 2001]. Autorzy tych prac uznają, iż wpływ ekstraktu zielonej herbaty na *CYP1A* wynika z kompleksowego działania zróżnicowanych polifenoli. Kolejne wydłużenie czasu podawania zwierzętom 2% roztworu zielonej herbaty do

6 tygodni wiązało się z istotnym wzrostem aktywności CYP1A1, CYP1A2 i CYP2B1 a także enzymu II fazy - UDP-glukuronylotransferazy ale nie zmieniło poziomu aktywności CYP2E1, CYP3A4 i S-transferazy glutationu [Sohn i wsp., 1994]. Można wnioskować, że hamowanie aktywności P450 może być związane z obecnością składników polifenolowych a obserwowana w niektórych badaniach indukcja CYP1A2 z obecnością kofeiny w ekstrakcie [Yang i Raner, 2005]. Brak efektu indukcji w badaniach pracy doktorskiej może wynikać z niewielkiej zawartości tego składnika (0,1%) w zastosowanym wyciągu. Na podstawie badań prowadzonych przez Xu i wsp. [1996] wynika, że trwające 8 tygodni podawanie wyciągu zielonej herbaty (2%w/v) redukuje tworzenie adduktów DNA pod wpływem kancerogennej heterocyklicznej aminy, co oznaczono w wątrobie u szczurów. Technika Western blot wykazała nieznaczną indukcję izoformy CYP1A2 w porównaniu do indukcji CYP1A1 [Xu i wsp., 1996].

Obserwacje pochodzące z pojedynczych badań klinicznych wykazują brak wpływu ekstraktu z zielonej herbaty podawanego w kapsułkach zawierających dawkę dobową $4 \times 211 \pm 25$ mg katechin i mniej niż 1 mg kofeiny przez 14 dni na aktywność CYP2D6 oraz CYP3A4 [Donovan i wsp., 2004b]. Nie zanotowano również zmian aktywności CYP1A2 pod wpływem ekstraktu zielonej herbaty zawierającego 80% - 98% katechin, w tym głównie galusanu epigallokatechiny (EGCG) w 50% -75%, po 4 tygodniach w dawce 800 mg EGCG [Chow i wsp., 2006]. W konsekwencji można uznać, że powtarzalne przyjmowanie katechin zielonej herbaty, głównie w celu wspomaganie utraty wagi, w dawkach opisanych w pracy zwykle nie prowadzi do istotnych zmian w przemianach substratów badanych izoform. Zwrócić należy jednak uwagę na fakt, że dostępnych jest niewiele badań nad bezpieczeństwem ich stosowania, które jednocześnie nie analizują zagadnienia w sposób kompleksowy.

5.2.6. Wpływ *Hypericum perforatum* na poziom transkryptu i aktywność CYP1A2 i CYP2E1

Na podstawie przeglądu bibliograficznego można wnioskować, iż dziurawiec zwyczajny jest najczęściej badanym surowcem roślinnym w kierunku jego potencjalnych interakcji z substratami izoform cytochromu P450. Możliwość modyfikacji aktywności badanych w pracy enzymów cytochromu P450 potwierdzają doniesienia o modulacji metabolizmu teofiliny przez CYP1A2 u pacjentów stosujących wyciąg z dziurawca, co stwarza konieczność zwiększania dawki dobowej leku. Ponadto w literaturze opisuje się

zmiany metabolizmu amitryptyliny (CYP2D6 i CYP1A2) i klozapiny u osób stosujących lek roślinny lub suplementację oparte o ten surowiec. Trudno jest ocenić jednoznacznie, który ze składników ekstraktu dziurawca zwyczajnego jest odpowiedzialny za efekty modulacji CYP450. Prace doświadczalne na liniach komórkowych dostarczają niejednoznacznych informacji na temat potencjału poszczególnych składników aktywnych zawartych w surowcu, przy czym efekt niektórych z nich nie został dotychczas opisany. W badaniach zespołu *Komoroski i wsp.* [2004] z zastosowaniem pierwotnych kultur ludzkich hepatocytów wykazano, że hiperycyna i hiperforyna stosowane w stężeniach do 5 μM nie zmieniają istotnie aktywności i zawartości białka izoformy CYP1A2 po 48h inkubacji. Jednocześnie obserwowano wzrost stężenia transkrypty CYP1A2 po inkubacji z hiperforyną oraz obniżenie ekspresji tego genu pod wpływem hiperycyny. W oparciu o analizy białka i aktywności enzymu CYP1A2 zespół sugerował, iż zachodzenie klinicznie istotnych interakcji *in vivo* między badanymi składnikami wyciągu z dziurawca a substratami badanego genu jest mało prawdopodobne [*Komoroski i wsp.*, 2004]. Inne doświadczenie w modelu *in vitro* prowadzone przez *Obach* [2000] wykazało, że surowy ekstrakt St. John's wort wywołuje inhibicję izoenzymu CYP1A2 a otrzymane wyniki skierowały uwagę autora na zawarty w ekstrakcie związek flawonoidowy I3 i II8-biapigeninę uznawane za silne kompetytywne inhibitory tego enzymu ($K_i = 0,95 \mu\text{M}$). Efekt hamowania zanotowano również w przypadku kwercetyny, niekompetytywnego inhibitora aktywności CYP1A2 ($K_i = 3,3 \mu\text{M}$). Wobec faktu, iż dane z badań *in vitro* nie odzwierciedlają w pełni sytuacji *in vivo*, niezbędne jest prowadzenie analiz skutków działania ekstraktów z dziurawca w modelu zwierzęcym. Wykazano, że po jednorazowej aplikacji 300, 600 i 1800 mg alkoholowego wyciągu *Hypericum perforatum* najwyższe średnie stężenie dla hiperycyny wynosi 1,5ng/ml, 4,1 ng/ml i 14,2 ng/ml a półokres trwania odpowiednio 24,8-26,5 godziny i 9 godzin dla hiperycyny i hiperforyny. Wydalanie produktów metabolizmu następuje prawdopodobnie z żółcią, przy czym nie stwierdzono obecności przemiany tych związków w moczu. Wyciągi alkoholowe dziurawca mają bardzo niską toksyczność, po podaniu doustnym DL 50 dla szczura i myszy, (powyżej 500 mg/kg masy ciała), przy czym nie stwierdza się zmian teratogennych, embriotoksycznych i fetotoksycznych u płodów [*Lamer-Zarawska i wsp.*, 2007].

Wyniki pracy doktorskiej, w której oceniano wpływ podawania standaryzowanego alkoholowego wyciągu dziurawca zwyczajnego w dawce 300 mg/kg p.o. wskazują na możliwość zachodzenia interakcji z lekami metabolizowanymi przez badaną izoformę w okresie dłuższym niż 3 dni stosowania przetworów z surowca. Pod wpływem podawania ekstraktu u zwierząt po 10 dniach doświadczenia autorka obserwowała istotny statystycznie

($p=0,002$) wzrost poziomu mRNA CYP1A2 o ok. 33% przy jednoczesnym braku wpływu na ekspresję czynnika AhR na poziomie transkryptu. Jest to potwierdzenie *in vivo* obserwacji indukcyjnego wpływu ekstraktu na mRNA CYP1A2 pochodzących z badania *in vitro* zespołu *Krusekopf i Roots* [2005] w linii komórkowej HepG2. W doświadczeniu tego zespołu efekt zwiększenia stężenia transkryptu uzyskano również pod wpływem izolowanej hiperforyny. Nie można natomiast wnioskować o udziale składników aktywnych *Hypericum perforatum* w regulacji mRNA AhR, co sugeruje konieczność przeprowadzenia dodatkowych badań w kierunku oceny ekspresji innych białek kaskady transdukcji sygnału tego czynnika, w tym jądrowego translokatora ARNT oraz represora AhRR. Ponadto można przypuszczać, że wyciąg z dziurawca zwyczajnego nie wpływa na konstytutywną ekspresję czynnika AhR i nie zawiera składników będących potencjalnym selektywnym modulatorem AhR. Indukcję CYP1A2 na poziomie białka pod wpływem dziurawca zwyczajnego u szczurów rasy Wistar obserwowano w pracy *Shibayama i wsp.* [2004]. Wykazano wówczas, że najwyższy poziom stężenia białka osiągający wartość 358% względem grupy kontrolnej występował po 10 dniach stosowania dawki 400 mg/kg handlowego preparatu St John's Wort podawanego z użyciem sondy. Niższa dawka 40 mg/kg nie zmieniła poziomu enzymu. Ponadto wykazano, że efekt zależny był od czasu podawania preparatu, przy czym wydłużenie doświadczenia powyżej okresu 10 dni skutkowało stopniowym zmniejszeniem efektu stymulacji CYP1A2 [*Shibayama i wsp.*, 2004].

Badania *in vivo* w modelu szczurzym, będące przedmiotem niniejszej pracy, sugerują możliwość redukcji transkryptu CYP2E1 pod wpływem wyciągu z *H. perforatum*. Wyniki wskazują jednoznacznie, że stosowanie dziurawca zwyczajnego przez okres zarówno 3 dni jak i 10 dni w dawce 300 mg/kg p.o. wywołuje znamienne statystycznie obniżenie poziomu mRNA dla genu CYP2E1 o około 18% po 3 dniach podawania ($p=0,007$) oraz o ponad 25% po 10 dniach trwania projektu ($p=0,020$) w porównaniu do grup zwierząt karmionych standardową dietą. Przegląd literatury wskazuje na brak prac z zakresu oceny surowca pod kątem ekspresji CYP2E1 z wykorzystaniem zastosowanego w pracy modelu zwierzęcego. Zespół *Bray i wsp.* [2002a] przeprowadził projekt na myszach Webster, w którym analizowano wpływ czterodniowego podawania ziela dziurawca zwyczajnego w dawce dobowej 435 mg/kg a także jego składników aktywnych - hipercyny i hiperforyny w ilości dobowej odpowiednio 1 mg/kg i 10 mg/kg. Wyniki skłoniły do wnioskowania o braku zmian w całkowitej zawartości wątrobowej frakcji CYP-450 pod wpływem zastosowanego surowca. Podobnie nie obserwowano zmian w aktywnościach katalitycznych, w tym O-deetylacji 7-etoksyrezorufiny (CYP1A2) i hydroksylacji p-nitrofenolu (CYP2E1) a także

w poziomie białka obu izoform [Bray i wsp., 2002a]. Zespół ten podjął również analizę wpływu dobowych dawek 140 mg/kg oraz 280 mg/kg St. John's wort zawierającego 0,3% całkowitych hiperycyn i 2,3% hiperforyny na aktywność i ekspresję izoenzymów cytochromu P450 w czasie 1, 2 oraz 3 tygodni podawania. Zaobserwowano brak zmian w aktywności CYP1A oraz dwukrotne podwyższenie aktywności i 2,5-krotny wzrost ilości białka CYP2E1 po 3 tygodniach doświadczenia niezależnie od stosowanej dawki [Bray i wsp., 2002b]. Autorzy ci nie wykonali analiz transkryptów badanych genów, natomiast w oparciu o wyniki aktywności oraz ocenę białka sugerują, że długoterminowe przyjmowanie jeżówki może predysponować niektórych konsumentów do nasilania toksyczności leków lub zwiększonego ryzyka niektórych nowotworów.

W badaniu klinicznym Wenk i wsp. [2004] wykazano niewielki wzrost aktywności CYP1A2 po 14 dniach przyjmowania 3x300 mg dziennie ekstraktu St. John's wort w grupie kobiet w porównaniu do badanych mężczyzn, co pozwala autorom sugerować potencjalny związek wystąpienia interakcji ze zróżnicowaniem płci. Autor podkreśla że wpływ St John's Wort na CYP1A2 jest niejasny. Gurley i wsp. [2005a] w badaniu prowadzonym na grupie starszych pacjentów (6 mężczyzn i 6 kobiet) wykazał, że długoterminowe stosowanie ekstraktu dziurawca o zawartości 0,3% hiperycyn w dawce 300 mg 3xdziennie przez okres 28 dni prowadziło do wzrostu aktywności CYP2E1 o czym świadczyło zwiększenie o 26% wartości wskaźnika mierzonego stosunkiem stężenia 6-hydroksychlorzoksazonu do chlorzoksazonu w surowicy. W tym samym badaniu nie obserwowano istotnie statystycznych zmian aktywności CYP1A2 określanej metabolizmem kofeiny [Gurley i wsp., 2005a]. Wcześniejsza praca tego zespołu wykazała również efekt indukcji CYP2E1 pod wpływem *Hypericum perforatum* u osób w młodym wieku przy takich samych warunkach doświadczenia [Gurley i wsp., 2002]. Ze względu na fakt, że nie poznano dotychczas czynnika transkrypcyjnego dla CYP2E1, mechanizm regulacji przez składniki ekstraktu może odbywać się na etapie potranskrypcyjnym, potranslacyjnym lub na drodze oddziaływania z nieznanym dotychczas regulatorem ekspresji tego enzymu. Ponadto, poza hiperforyną, za zróżnicowany efekt wyciągu mogą odpowiadać również inne jego składniki. Badanie kliniczne randomizowane, kontrolowane za pomocą placebo, z udziałem 56 ochotników zespołu Arold i wsp. [2005] wykazało nieznaczną i nieistotną indukcję CYP1A2 po 10 dniach przyjmowania ekstraktu *H. perforatum* w dawce 240 mg dziennie zawierającej 3.5 mg hiperforyny. Substratem na podstawie którego przemian oceniano aktywność enzymu była kofeina. Jest to wynik zbliżony do rezultatu uzyskanego na szczurach w pracy doktorskiej. Natomiast obserwacje zespołu Morimoto i wsp. [2004] dotyczące efektu *Hypericum*

perforatum na farmakokinetykę teofiliny u zdrowych 12 ochotników otrzymujących dawkę 3x 300 mg przez 15 dni wskazują na brak istotnych zmian w osoczu. Autorzy podsumowując uznają, że prawdopodobieństwo zmiany stężenia teofiliny w osoczu pod wpływem zastosowanego okresu przyjmowania dziurawca zwyczajnego jest niskie [Morimoto i wsp., 2004].

W oparciu o wyniki analizowanych prac badawczych można wnioskować o związku ryzyka wystąpienia interakcji z wielkością dawki i czasem stosowania ekstraktu *H. perforatum*. Niskie dawki stosowane krótkotrwale mogą wywołać nieznaczną indukcję izoenzymu CYP1A2 i powodować niewielkie zmiany w parametrach farmakokinetycznych substratów tej izoformy. Niezależnie od postulowanego mechanizmu oddziaływania składników wyciągu z opisanego surowca na CYP2E1 brak jest doniesień o istotnych interakcjach na tym podłożu. Być może wynika to z niedostatecznego zgłaszania podejrzanych przypadków lub niewielkiej liczby leków syntetycznych będących w znacznym stopniu substratami CYP2E1 i jednocześnie podawanych doustnie. Jednak stosowane anestetyki wziewne, takie jak enfluran czy sewofluran są metabolizowane przez CYP2E1 a ich fluorowcowane pochodne mogą powodować uszkodzenia wątroby. Dlatego istotne jest analizowanie potencjalnej możliwości występowania interakcji substratów CYP2E1 z zieleń dziurawca zwyczajnego [Gurley i wsp., 2005a]. W oparciu o dostępne dane można również wnioskować, że wpływ dziurawca na aktywność CYP1A2 i CYP2E1 nie jest w pełni poznany i wymaga dalszych analiz.

5.2.7. Wpływ *Ginkgo biloba* na poziom transkryptu i aktywność CYP1A2 i CYP2E1

Ekstrakt z liści *Ginkgo biloba* (EGb) jest uznawany za jeden z najpopularniejszych suplementów diety pochodzenia roślinnego, głównie ze względu na właściwości poprawiające funkcje kognitywne. Aktywność EGb jest wielokierunkowa i wynika z synergistycznego działania składników wyciągu, głównie flawonoidów z proantocyjanidynami, terpenoidów (ginkgolidy), bilobalidu i kwasów organicznych. Zarówno wymienione grupy, jak i czynne w modelach farmakologicznych, poszczególne związki chemiczne, nie wykazują właściwości całego ekstraktu [Bodalski i Bodalska, 2006]. Jednak dotychczas niewiele wiadomo na temat potencjalnych interakcji *G. biloba* ze stosowanymi klinicznie lekami. Opisano przypadki samoistnych krwawień u pacjentów przyjmujących miłorząb dwukłapowy, w tym u osób stosujących go łącznie z aspiryną lub warfaryną. Na tej podstawie uznaje się, że zawarte w ekstrakcie ginkgolidy mogą hamować czynnik aktywujący płytki [Zou i wsp., 2002].

Analizy *in vitro* sugerują hamujący wpływ EGb na wybrane izoformy cytochromu P450, natomiast prace *in vivo* wskazują na możliwość modyfikacji metabolizmu ksenobiotyków zarówno w kierunku indukcji jak i inhibicji. Przegląd danych literaturowych wskazuje więc na potrzebę dalszych prac w zakresie oceny bezpieczeństwa stosowania preparatów z miłorzębu dwuklapowego.

Doniesienia poprzedzające realizację pracy doktorskiej sugerowały możliwość wpływu wyciągu miłorzębu na główne ludzkie izoformy cytochromu P450. W pierwszych pracach obserwowano brak efektu bilobalidu, ginkgolidów A, B, i C na aktywność CYP1A2 oraz silne hamowanie przez kwasy ginkgolowe i umiarkowaną supresję powodowaną inkubacją z izoramnetyną [Zou i wsp., 2002]. Ze względu na fakt, że kwasy ginkgolowe mogą wywoływać reakcje alergiczne, obecne na rynku preparaty EGb są ich pozbawione. Doświadczenie Gaudineau i wsp. [2004] prowadziło do wniosku o hamującym wpływie ekstraktu EGb761 na CYP1A2 ($K_i = 106 \pm 24$ $\mu\text{g}/\text{mL}$) i CYP2E1 ($K_i = 127 \pm 42$ $\mu\text{g}/\text{mL}$), przy czym za efekt ten wydała się być odpowiedzialna frakcja flawonoidowa [Gaudineau i wsp., 2004]. Ocena właściwości związków czynnych, głównie flawonoidów z liści miłorzębu, wobec CYP450 w modelu *in vitro*, prowadzona przez von Moltke i wsp. [2004], potwierdziła, że aglikony flawonowe - kwercetyna, kemferol i apigenina posiadają właściwości potencjalnych inhibitorów ludzkiego izoenzymu CYP1A2 [von Moltke i wsp. 2004]. Kuo i wsp., [2004] wskazują, że kemferol i izoramnetyna posiadają wyższą niż kwercetyna i zależną od stężenia zdolność hamowania CYP1A w szczurzych mikrosomach wątroby. Na podstawie obserwacji zespół sugeruje możliwość kompetycyjnego hamowania aktywności CYP1A1 i CYP1A2 przez ekstrakt [Kuo i wsp., 2004]. Podobnie, dane pochodzące z badań Chang i wsp. [2006b], potwierdzają możliwość zachodzenia interakcji preparatów miłorzębu dwuklapowego o znacznej zawartości trilaktonów terpenowych i glikozydów flawonowych na etapie biotransformacji ksenobiotyków przejawiające się hamowaniem aktywności CYP1A1, CYP1A2 i CYP1B1. Zmiany te obserwowano jako redukcję O-dealkilacji 7-etoksyrezorufiny w pierwotnej kulturze szczurzych hepatocytów [Chang i wsp., 2006b]. Inkubacja z izolowanymi składnikami aktywnymi ekstraktu pozwoliła autorom uznać, że za efekt ten odpowiadają aglikony: kwercetyny, kemferolu i izoramnetyny. Autorzy ci postulują mieszany mechanizm inhibicji, przy czym twierdzą, że za redukcję aktywności CYP1A2 odpowiada głównie kwercetyna ($K_i = 418 \pm 50$ nM). Z drugiej strony istnieją opinie, że *G. biloba* może wywierać zależny od stężenia sprzeczny i dwufazowy wpływ na metabolizm CYP1A2 w kulturach pierwotnych ludzkich hepatocytów. W niskich stężeniach (2.19 $\mu\text{g}/\text{ml}$) obserwowana jest indukcja aktywności CYP1A2 na poziomie 140%

względem kontroli, natomiast przy wyższych wartościach stężeń efekt jest odwrotny [Hellum i wsp., 2007]. Podjęte przez zespół Jeuken i wsp. [2003] próby typowania agonistów AhR wśród ekstraktów i suplementów diety sugerują, że *Ginkgo biloba* stymuluje wiązanie AhR do DNA i może wpływać na ekspresję genów docelowych tego czynnika. Kontynuacją tej obserwacji jest praca Li i wsp. [2009] będąca próbą wyjaśnienia hipotezy o możliwości indukcji ludzkich wątrobowych enzymów metabolizmu leków i transporterów na drodze aktywacji PXR, CAR i AhR przez bioaktywne terpenoidy i flawonoidy wyciągu z miłorzębu dwuklapowego. Pierwotna hodowla ludzkich hepatocytów oraz linia komórkowa HepG2 posłużyły jako model *in vitro* dla badań aktywacji receptorów i indukcji enzymów. Wykazano m.in., że kwercetyna i kempferol aktywują PXR, CAR i AhR natomiast bilobalid nie wpływał na receptory ksenobiotyków. Wykazano również, że flawonoidy indukowały ekspresję CYP1A2 w komórkach tej linii ale podobnego rezultatu nie uzyskano dla pierwotnej hodowli hepatocytów ludzkich. Można więc wnioskować, że terpenoidy i flawonoidy wyciągu z miłorzębu wykazują zróżnicowaną zdolność indukcji poprzez selektywną aktywację wyżej wymienionych receptorów [Li i wsp., 2009].

Badania *in vivo* zmierzające do wyjaśnienia wpływu surowca *G. biloba* na farmakokinetykę teofiliny metabolizowanej przez CYP1A2 wskazują, że podawanie komercyjnie dostępnego wyciągu GBE w dawce 10 mg/kg i 100 mg/kg szczurom (6sztuk) przez okres 5 dni powoduje istotny statystycznie wzrost klirensu całkowitego (osoczowego) tego substratu podanego w dawce 10 mg/kg dożylnie odpowiednio o około 30% i 70% w porównaniu do grupy kontrolnej. Po podaniu doustnym teofiliny w dawce 10 mg/kg wartość AUC uległa redukcji o 40% po wcześniejszym podawaniu GBE w dawce 100 mg/kg. Rezultaty te sugerują możliwość indukcji aktywności CYP1A2 i zwiększenia klirensu teofiliny u szczurów [Tang i wsp., 2007]. Podobnie, w oparciu o testy aktywności O-demetylazy metoksyrezorufiny (MROD) i hydroksylazy aniliny (ANHD) uznane za markery odpowiednio CYP1A2 i CYP2E1 zaobserwowano, że podawanie wyciągu *Ginkgo biloba* zawierającego 25,2% flawonoidów i 6,2% terpenoidów w dawce 200 mg/kg dożoładkowo powoduje istotną 2,3-krotną indukcję MROD (CYP1A2) oraz 1,4-krotną indukcję ANHD (CYP2E1) w mikrosomach wątroby. Przy dawce 100 mg/kg nie zanotowano istotnych zmian w aktywności CYP2E1 i 1,4-krotny wzrost CYP1A2 [Yang i wsp., 2003]. Ten sam zespół wykazał redukcję w poziomie mRNA CYP1A2 oraz brak zmian transkryptu CYP2E1 w wątrobie szczurów rasy Sprague-Dawley otrzymujących ginkgolidy w dawce 100 mg/kg masy ciała przez 4 dni [Yang i wsp., 2005].

W pracy doktorskiej otrzymano istotny statystycznie wynik potwierdzający niewielką zdolność hamowania izoformy CYP1A2 na poziomie mRNA po 10 dniach stosowania, standaryzowanego na obecność 24,5% glikozydów flawonolowych i 13,0% laktonów terpenowych, suchego wyciągu alkoholowego *Ginkgo biloba* w dawce 200 mg/kg p.o. U zwierząt przyjmujących preparat stwierdzono obecność transkryptu badanego genu na poziomie o około 24% niższym niż w grupie kontrolnej. Krótszy okres podawania wyciągu nie wpłynął znacząco na ekspresję badanego genu mierzoną stężeniem transkryptu CYP1A2. Badanie nad wpływem zawierającego 24% flawonoidów i 6% terpenoidów ekstraktu *Ginkgo biloba* (EGB 761) w dawce dobowej 10 i 100 mg/kg przez 10 dni na parametry farmakokinetyczne propranololu u szczurów i ekspresję enzymów CYP prowadził zespół *Zhao i wsp.* [2006]. Autorzy obserwowali redukcję parametru AUC badanego leku i maksymalnego stężenia (C_{max}) propranololu w osoczu pod wpływem ekstraktu w dawce 100 mg/kg. Ze względu na fakt, iż reakcja hamowana była istotnie pod wpływem α -naftoflawonu, odczytano ten wynik jako indukcję aktywności CYP1A2. Jednocześnie obserwowano wzrost ekspresji CYP1A2 technikami RT-PCR i Western blot w tkance wątrobowej [*Zhao i wsp.*, 2006]. W pracy *Deng i wsp.* [2008] nad wpływem EGb 761 i głównych jego składników na izoformy cytochromu P450 u szczurów wykazano, iż bilobalid istotnie indukuje aktywność, zwiększa poziom mRNA i białka CYP1A2 oraz, w wyższych stężeniach, powoduje wzrost aktywności CYP2E1. Induktorem CYP2E1 wydaje się być również kwercetyna. Ginkgolidy A i B oraz kwercetyna i kemferol istotnie indukują aktywność, transkrypcję i translację CYP1A2 zależnie od dawki [*Deng i wsp.*, 2008]. Wspomniane ginkgolidy oraz kemferol nie indukowały aktywności i ekspresji CYP2E1. Dysproporcje w wynikach prowadzonych prac badawczych może tłumaczyć zróżnicowanie składu wyciągów *G. biloba*, w tym zawartości frakcji terpenoidowej, w tym ginkgolidów i biobalidu oraz ich biodostępności. Ponadto w pracy doktorskiej zastosowano wyższe dawki ekstraktu oraz bardziej precyzyjną technikę oznaczania poziomu transkryptu.

Jednocześnie suchy wyciąg alkoholowy miłorzębu dwuklapowego podawany w dawce 200 mg/kg p.o. przez 3 dni wiązał się z istotnym wzrostem mRNA czynnika AhR do wartości wynoszącej 140% wobec grupy kontrolnej przyjmującej standardową dietę ($p=0,003$). Wydłużenie okresu podawania preparatu do 10 dni wiązało się ze zmniejszeniem efektu indukcji do około 121%. Analiza mechanizmu oddziaływania wyciągu miłorzębu dwuklapowego na AhR *in vitro* wskazuje, że ma on zdolność aktywacji wspomnianego czynnika, za którą odpowiada, prawdopodobnie, kwercetyna. Jednocześnie wykazano brak związku ginkgolidów A, B, C, i J z regulacją jego aktywności oraz wytypowano kemferol

i izoramnetynę jako antagonistów AhR [Rajaraman i wsp., 2009]. Potwierdzenie hamującego wpływu kemferolu a także ekstraktu *G. biloba* zawierającego 24% flawonoli w dawce dobowej 100 mg/kg w modelu *in vivo* stwierdzono poprzez obserwację redukcji indukowanej podaniem 3-MC transformacji wątrobowej frakcji czynnika AhR. Autorzy wskazują, że za efekt ten odpowiedzialny jest kemferol oraz jego metabolity [Mukai i wsp., 2009]. Dla pełnej oceny mechanizmu regulacji CYP1A ważne jest, że indukcja przez flawonoidy może zachodzić na drodze zróżnicowanych mechanizmów, w tym bezpośrednio poprzez stymulację ekspresji genu z udziałem czynnika transkrypcyjnego a także poprzez stabilizację mRNA i/lub białka. Biorąc pod uwagę złożoność procesu modulacji ekspresji izoformy CYP1A2, rozważa się możliwość oddziaływania składników EGb z innymi czynnikami transdukcji sygnału AhR a także czynnikiem AP-1. Badania *in vitro* wskazują, że kwercetyna może wpływać na oddziaływanie kompleksu AP-1 z DNA w regionie sekwencji enhancera genu CYP1A2, gdzie izdentyfikowano miejsce jej potencjalnego wiązania. Może to sugerować udział wspomnianej rodziny białek w regulacji ekspresji ludzkiej izoformy tego enzymu [Shih i wsp., 2000].

Wyciąg miłorzębu zastosowany w badaniu będącym przedmiotem tej pracy, w sposób istotny statystycznie ($p < 0,001$) zredukował ilość mRNA genu CYP2E1 w wątrobie. Wykazano, że już 3 dniowe podawanie p.o. ekstraktu 200 mg/kg wywołało u zwierząt obniżenie ekspresji genu do wartości 52% w porównaniu do grupy kontrolnej. U szczurów otrzymujących *G. biloba* przez 10 dni obserwowano znamienne ($p < 0,001$) redukcję stężenia mRNA tego genu o 30%. *G. biloba* zawierający 25,2% flawonoidów i 6,2% terpenoidów w dawce 200 mg/kg dożołądkowo powoduje istotną 1,4-krotną indukcję ANHD (CYP2E1) w mikrosomach wątroby, natomiast przy 100 mg/kg nie zanotowano żadnych zmian [Yang i wsp., 2003]. Izolowane ginkgolidy w dawce 100 mg/kg masy ciała przez 4 dni wykazały brak zmian transkryptu CYP2E1 w wątrobie szczurów rasy Sprague-Dawley otrzymujących [Yang i wsp., 2005]. Jest to wynik podobny do sugestii Shinozuka i wsp. [2002], gdzie trwające 4 tygodnie wzbogacanie diety *G. biloba* (0,5%) nie powoduje zmian transkryptu zarówno CYP1A1/2 jak i CYP2E1 u szczurów.

W badaniu klinicznym suplementacja *Ginkgo biloba* standaryzowanego na obecność 24% glikozydów flawinowych i 6% laktonów terpenowych w dawce 60 mg 4x dziennie przez 28 dni przez osoby starsze nie zmieniła aktywności CYP3A4, CYP1A2, CYP2E1 i CYP2D6. Nie wykazano znaczących zmian w metabolizmie leków - kofeiny, chlorzoksazonu, debryzochiny i midazolamu podawanych łącznie z suplementacją *G. biloba* [Gurley i wsp., 2005a]. Brak znamiennego wpływu obserwowano również w grupie młodszych dorosłych

pacjentów [Gurley i wsp., 2002]. Najnowsze badania na pacjentach w kierunku oceny stosowania EGb 761 w dawce dobowej 240 mg wskazują na brak istotnego wpływu krótkotrwałej (8 dni) suplementacji na aktywność enzymów CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19 oraz CYP2D6. Ocena parametrów farmakokinetycznych dotyczących przemian substratów wskazuje na niski potencjał zastosowanego ekstraktu do wywoływania interakcji międzylekowych [Zadayan i wsp., 2012].

Interpretując wyniki opisanych prac należy uwzględnić synergistyczny efekt oraz ilościowe i jakościowe różnice w składzie stosowanych wyciągów. Na podstawie dostępnej wiedzy nie można jednoznacznie wnioskować o bezpieczeństwie stosowania tego surowca. Dla określenia możliwości oddziaływań międzylekowych istnieje potrzeba prowadzenia badań klinicznych na szerszej próbie pacjentów stosujących EGb długoterminowo. Ponadto wskazana jest analiza w modelu *in vivo* możliwości regulacji CYP1A poprzez czynniki inne niż AhR oraz na etapie regulacji stabilności transkryptu.

5.2.8. Wpływ *Panax ginseng* na poziom transkryptu i aktywność CYP1A2 i CYP2E1

Korzeń *Panax ginseng* jest powszechnie stosowanym surowcem leczniczym ze względu na działanie tonizujące, wzmacniające w stanach osłabienia i rekonwalescencji, a także podczas spadku koncentracji [Komisja E, 1991]. Zwraca się jednocześnie uwagę na jego właściwości antyoksydacyjne i przeciwnowotworowe, ze szczególnym uwzględnieniem poszukiwania ich molekularnego podłoża. Dotychczas przeprowadzono niewiele badań nad bezpieczeństwem stosowania i właściwościami tego surowca w zapobieganiu i leczeniu toksycznych skutków przemian ksenobiotyków. Wykazano, że przyjmowanie czerwonego ekstraktu żeń-szenia powoduje obniżenie ryzyka występowania indukowanego przez 7,12-dimetylobenzantracen (DMBA) rozwoju nowotworu płuc [Yun i wsp., 1983] i skóry u myszy [Xiaoguang i wsp., 1998]. W oparciu o fakt, iż metaboliczna aktywacja DMBA należącego do PAH przebiega głównie przy udziale izoform CYP1A1/2 oraz CYP1B1 postuluje się istnienie mechanizmu protekcyjnego polegającego na hamowaniu aktywności tych enzymów przez składniki aktywne *P. ginseng* [Chang i wsp., 2002].

Pierwsze badania nad wpływem saponin czerwonego żeń-szenia na aktywność enzymów CYP450 podjął zespół Kim i wsp. [1997] wykazując zależny od dawki spadek aktywności izoenzymów w izolowanych szczurzych mikrosomach wątroby. Efekt ten dotyczył zwłaszcza indukowanej podaniem czterochlorku węgla, hydroksylazy p-nitrofenolu uznanej za wskaźnik CYP2E1. Obserwacje z badań *in vitro* oczyszczonych ginsenozydów

autorstwa *Henderson i wsp.* [1999] wykazały, że spośród Rb1, Rb2, Rc, Rd, Re, Rf i Rg1 inkubowanych z ludzkimi rekombinowanymi izoenzymami CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 oraz CYP3A4 i specyficznymi substratami, jedynie ginsenozyd Rd nieznacznie hamował analizowane aktywności. Analiza fluorymetryczna potwierdziła również słaby efekt inhibicji ginsenozydu Rb2 wobec CYP3A4 i CYP2D6, indukcji aktywności CYP2C9 pod wpływem ginsenozydu Rc oraz CYP3A4 w wyniku działania ginsenozydu Rf. Na podstawie uzyskanych rezultatów wykluczono możliwość hamującego wpływu ginsenozydów na analizowane izoenzymy. Natomiast inna praca *in vitro* oceniająca wpływ wyciągów *Panax ginseng* oraz poszczególnych jego ginsenozydów na aktywność enzymów cytochromu P450 prowadzi do wniosków o hamowaniu CYP1A1 na drodze mechanizmu inhibicji kompetytywnej oraz CYP1A2 i CYP2B1 na drodze inhibicji mieszanej [*Chang i wsp.*, 2002]. Autorzy zwracają uwagę, że izolowane ginsenozydy Rb1, Rb2, Rc, Rd i Rf redukują aktywność CYP1 jedynie przy stężeniach znacznie wyższych niż w ekstrakcie, co sugeruje, że nie były one związane z właściwościami wyciągu wobec tych enzymów. Za efekt hamowania aktywności O-dealkilacji 7-etoksyrezorufiny mogą więc, zdaniem autorów, odpowiadać zarówno ginsenozydy, jak i związki polifenolowe takie jak kwas taninowy [*Chang i wsp.*, 2002]. Oceniając efekt ginsenozydów na aktywność ludzkich izoform cytochromu P450 w pracy przeglądowej *Lu i wsp.* [2005] zwracają uwagę na efekt indukcji CYP1A2 pod wpływem Re oraz brak efektów po podaniu Rb1 i Rf na CYP1A2 oraz CYP2E1 [*Lu i wsp.*, 2005]. Spośród innych składników wyciągu z surowca w modelu *in vitro* autorstwa *Song i wsp.* [2004] analizowano wpływ silnego immunomodulatora, ginsanu, podawanego iniekcyjnie (i.p.) w dawce 100 mg/kg na ogólny poziom wątrobowej frakcji enzymów cytochromu P450 uzyskując w efekcie redukcję całkowitej ilości izoenzymów mikrosomalnych po 1. a także 5. dniu doświadczenia. Efekt ten był zależny od płci zwierząt.

Badania *in vivo* na zwierzętach prowadzą do uogólnionych wniosków mówiących o możliwości modulacji aktywności wybranych enzymów CYP przez wyciąg z żeń-szenia zależnie od drogi podania preparatu oraz rodzaju i składu ekstraktu. W pracy doktorskiej wykazano brak wpływu ($p=0,013$) ekstraktu standaryzowanego na obecność 27,1% ginsenozydów w dawce 30 mg/kg. p.o. na poziom mRNA genu *CYP1A2* po 3 dniach podawania go zwierzętom w grupie badanej. Podobne wyniki uzyskał zespół *Yu i wsp.* [2005], gdzie wykazano, tą samą techniką, brak zmian transkryptu wspomnianego genu w wątrobie szczurów rasy Sprague-Dawley po 1 i 4 dniowym podawaniu sondą lub i.p. ekstraktu żeń-szenia zawierającego 4% ginsenozydów w dawce dobowej 30 lub 100 mg/kg. Stosowana dawka wyciągu z żeń-szenia w badanym czasie nie zmieniła aktywności CYP1A

mierzonej reakcją O-dealkilacji 7-etoksyrezorufiny [Yu i wsp., 2005]. W wątrobie szczurów otrzymujących w pracy doktorskiej preparat przez okres 10 dni nastąpiło istotne ($p=0,006$) zwiększenie ilości transkryptu genu *CYP1A2* na poziomie 140% wobec grupy kontrolnej. Jednocześnie wykazano możliwość nieznacznej modulacji ekspresji AhR przejawiającej się około 13% redukcją po 3 dniach oraz tej samej wielkości, słabą indukcją transkrypcji względem grupy kontrolnej po 10 dniach stosowania. Rezultaty te nie uzyskały istotności statystycznej przy $p<0,05$. Na podstawie tych pomiarów można przypuszczać, że dłuższe stosowanie przetworów z żeń-szenia może zmieniać metabolizm substratów CYP1A2. Do podobnych obserwacji dochodzi zespół Jeuken i wsp. [2003] podczas prób typowania agonistów czynnika AhR wśród ekstraktów i suplementów diety. Wykazały one, że *Panax ginseng* stymuluje wiązanie AhR do DNA i ekspresję genów docelowych tego czynnika. Może to w pewnym stopniu tłumaczyć wzrost ilości transkryptu genów CYP1A2 oraz niewielkie zmiany czynnika AhR. Ponadto, warto zauważyć, że wyniki pracy doktorskiej są dotychczas jedynymi dostępnymi danymi na temat poziomu mRNA AhR w komórkach wątroby szczurów otrzymujących ekstrakt żeń-szenia, który może stanowić źródło zarówno potencjalnych jego ligandów jak i czynników oddziałujących na inne elementy szlaku transdukcji sygnału, w tym białko represora (AhRR) i ARNT. Dane pochodzące z badań na modelu zwierzęcym uzyskane w niniejszej pracy wskazują również na zdolność ekstraktu z żeń-szenia do istotnej ($p<0,001$) redukcji o ponad 52% transkryptu CYP2E1 już po 3 dniach stosowania w dawce 30 mg/kg p.o. Podawanie wspomnianej dawki przez okres 10 dni utrzymało znamienny ($p=0,006$) efekt inhibicji mRNA CYPE1 na poziomie o ok. 30%. W badaniu klinicznym Gurley i wsp. [2005a] analizie poddano wpływ ekstraktu *Panax ginseng* standaryzowanego na zawartość 5% ginsenozydów, dawkowanego 500 mg, 3x dziennie przez 28 dni u ochotników pod względem enzymów wątrobowych CYP3A4, CYP1A2, CYP2E1 i CYP2D6. Wyniki tego zespołu wskazują, że długotrwałe przyjmowanie *P. ginseng* powoduje statystycznie nieistotną zmianę aktywności CYP1A2 mierzonej przemianami kofeiną w dawce 100 mg. Podobny brak efektu zanotowano po podaniu chlorzoksazonu (500 mg) dla izoformy CYP2E1. Autorzy wnioskują, że suplementacja produktami zawierającymi żeń-szeń nie wywołuje istotnych klinicznie interakcji z lekami będącymi substratami CYP1A2, CYP2D6, CYP2E1 i CYP3A [Gurley i wsp., 2005a]. Podobny wynik otrzymano dla młodszej grupy pacjentów [Gurley i wsp., 2002]. Wnioskując można uznać, że wyniki *in vitro* sugerujące hamujące działanie ekstraktu wobec CYP1A2 nie potwierdziły się w modelu *in vivo*. Wyniki pracy doktorskiej sugerują możliwość modulacji ekspresji CYP1A2 i CYP2E1 w kierunku, odpowiednio, indukcji i inhibicji przez przetwory

zawierające żeń-szeń w zależności od czasu ich stosowania i zawartości frakcji polifenoli. W odniesieniu do skali stosowania preparatów zawierających żeń-szeń, obecny stan wiedzy na temat interakcji między takimi produktami a lekami syntetycznymi należy uznać za niewystarczający. Wobec pojawiających się sugestii dotyczących możliwości modyfikacji przemian ksenobiotyków przez izoenzymy CYP1A2 i CYP2E1, właściwości *P. ginseng* wymagają dalszych weryfikacji.

5.3. Podsumowanie

Zgodnie z wynikami wielu badań zmienność ekspresji i aktywności enzymów cytochromu P450 w znacznym stopniu może wiązać się ze zróżnicowaniem diety, w tym przyjmowaniem preparatów ziołowych stanowiących źródło naturalnie występujących związków aktywnych. Ze względu na problemy w typowaniu składników odpowiedzialnych za modulację enzymów metabolizmu leków, przewidzenie interakcji leków syntetycznych i przetworów z surowców zielarskich jest wyjątkowo trudne. Z opisanych badań wynika, że regulacja enzymów I fazy metabolizmu ksenobiotyków przez przetwory roślin zielarskich ma charakter kompleksowy i zależy od surowca, dawki oraz drogi podania badanego organu, gatunku na którym prowadzone jest badanie a także czasu przyjmowania i technik przygotowania preparatu oraz liczebności badanej próby. Jest ona wypadkową działania składników poszczególnych ekstraktów będących niejednokrotnie źródłem zarówno agonistów jak i antagonistów aktywności izoform cytochromu P450. Porównanie stopnia zmian ekspresji badanych izoenzymów pod wpływem analizowanych w pracy doktorskiej standaryzowanych wyciągów z efektem syntetycznych induktorów i inhibitorów wskazuje, że modulacja ekspresji i aktywności tych enzymów zachodzi na niskim poziomie. Trudne jest więc określenie kiedy interakcja może być istotna klinicznie. Badania nad regulacją izoenzymów cytochromu P450, ze względu na ich związek z metabolizmem leków onkologicznych, prowadzone są również w kontekście podnoszenia efektywności i redukcji skutków ubocznych leczenia. Możliwość manipulacji ekspresją i aktywnością izoenzymów CYP związanych z aktywacją prokancerogenów przez ekstrakty roślinne mogłaby znaleźć praktyczne zastosowanie w profilaktyce rozwoju wielu nowotworów.

Na podstawie przeglądu literatury można wnioskować, że analiza wpływu wyciągów roślin zielarskich na transkrypcję oraz aktywność CYP1A, AhR oraz CYP2E1 była dotychczas przedmiotem nielicznych badań klinicznych, w modelu zwierzęcym i w kulturach *in vitro*. Można uznać, że izoformy i czynnik transkrypcyjny stanowiące przedmiot pracy

doktorskiej, są poznane w znacznie niższym stopniu niż CYP3A4 i CYP2D2, a wyniki dotychczasowych doniesień dają niejasny obraz mechanizmu interakcji ekstraktów roślinnych z substratami opisanych enzymów. Czynniki transkrypcyjny AhR może być aktywowany przez szerokie spektrum strukturalnie różnorodnych substancji syntetycznych i naturalnych będących ligandami aktywującymi szlak transdukcji sygnału. Badania nad obecnością endogennych aktywatorów AhR, w tym bilirubiny, cAMP i tryptofanu sugerują, że aktywacja tego czynnika na podstawowym poziomie jest procesem fizjologicznym. Ponadto trwają prace nad określaniem naturalnie występujących ligandów należących do grupy SAhRM a tym samym zdolnych do regulacji wielu procesów komórkowych. Istnieją doniesienia wskazujące na istnienie związku pomiędzy receptorem AhR a szlakiem receptorów kwasu retinoidowego (RAR), receptora witaminy D (VDR), receptorami aktywowanymi przez proliferaty peroksosomów (PPAR) [Vrzal i wsp., 2004]. Zmiany receptora AhR są istotne również z punktu widzenia zaburzeń gospodarki hormonalnej, gdyż wykazano istnienie związku pomiędzy AhR a receptorem estrogenowym. Natomiast wysoka stymulacja tego szlaku w wyniku ekspozycji na dioksyny lub inne substraty prokancerogenne i ligandy AhR jest związana z niekorzystnym efektem dla zdrowia, gdyż może zainicjować kaskadę zmian ekspresji genów prowadząc do nasilania kancerogenności, teratogenności, hepatotoksyczności i immunosupresji [Singhal i wsp., 2008; Bradshaw i Bell, 2009]. Stąd poszukiwanie antagonistów AhR wydaje się być istotnym elementem strategii chemoprewencji. Standaryzowane ekstrakty *E. purpurea* oraz *C. sinensis* nie wpłynęły znamienne na poziom transkrypty zarówno CYP1A2 jak i badanego czynnika bez względu na czas ich stosowania. Podsumowując, na podstawie zaprezentowanych wyników badań można wnioskować, że codzienne przyjmowanie standaryzowanych ekstraktów *G. max* i *G. biloba* w zastosowanych dawkach może wywierać indukcyjny wpływ na czynnik AhR, przy czym nie określono podobnych zmian dla ekspresji CYP1A2. W przypadku soi może to wskazywać na obecność w wyciągu składników posiadających właściwości ligandów AhR określanych jako selektywne modulatory Ah. Istotną możliwość modulacji na etapie transkrypty CYP1A2 zanotowano jedynie na podobnym poziomie w grupach zwierząt pod wpływem trwającego 10 dni stosowania *H. perforatum* lub *P. ginseng*, gdzie wykazano zwiększenie stężenia mRNA oraz pod wpływem *G. biloba* obniżającego tę wartość względem grupy kontrolnej. Wyciągi z dziurawca zwyczajnego oraz z żeń-szenia nie zmieniły badanej w pracy ekspresji AhR. Różnice w odpowiedzi CYP1A2 i AhR na zastosowane w pracy substancje roślinne mogą wskazywać na wielokierunkowość zarówno przepływu informacji w komórce jak i działania tych wyciągów. Mechanizm aktywacji receptora oraz genu CYP1A2 jest złożony

i związany również z możliwością ujemnego i dodatniego sprzężenia zwrotnego, w tym aktywacją przez czynnik transkrypcyjny jego inhibitora. Modyfikacje szlaku sygnałowego receptora Ah zachodzą poprzez oddziaływanie na transkrypt, stabilność kompleksu cytoplazmatycznego, kompetycję z ligandem o miejsce wiązania, zmiany konformacyjne czynnika, wpływ na asocjację z ARNT a także wiązanie do sekwencji DNA. Ponadto regulacja CYP1A2 może zachodzić na drodze zróżnicowanych mechanizmów, w tym zarówno z udziałem czynnika transkrypcyjnego jak i poprzez stabilizację mRNA i/lub białka [Shih i wsp., 2000]. Istotną rolę w tym procesie prawdopodobnie, obok AhR, może również pełnić kompleks AP-1.

Pełen mechanizm regulacji ekspresji genu CYP2E1 jest słabo poznany i stanowi wypadkową wielu czynników, w tym stanu zdrowia, warunków metabolicznych i żywieniowych, w tym narażenia na induktory i inhibitory aktywności. Indukcja CYP2E1 nie jest zjawiskiem pożądanym, gdyż prowadzi do hepatotoksyczności reaktywnych metabolitów wielu jego substratów, związana jest z generowaniem reaktywnych form tlenu podczas cyklu katalitycznego i wolnych rodników. Z punktu widzenia mechanizmu indukcja jest przykładem alternatywnej regulacji ekspresji na drodze stabilizacji białka po związaniu z miejscem aktywnym enzymu, zwykle bez aktywacji genu. Należy zauważyć, iż białko tego enzymu jest wysoce niestabilne w wielu tkankach bez obecności egzogenego substratu, w tym etanolu i jego poziom jest trudny do oszacowania. Niewiele jest również badań oceniających zmiany mRNA w komórkach poddanych działaniu wyciągów roślinnych. W pracy doktorskiej ekstrakty roślinne w dawkach i przyjętym okresie podawania nie wykazały właściwości indukcyjnych wobec CYP2E1. Ze względu na znaczenie enzymu CYP2E1 w patogenezie chorób wątroby, hamowanie aktywności tej izoformy można uznać za potencjalną metodę terapeutyczną. Biorąc pod uwagę fakt, że dotychczas poznane inhibitory tej izoformy takie jak disulfiram, pirazol, 4-metylopirazol i chlormetiazol wykazują w dłuższym okresie stosowania hepatotoksyczność lub neurotoksyczność, poszukuje się efektywnych i nieszkodliwych alternatywnych związków czynnych o podobnym wpływie na wspomniany enzym [Karamanakos i wsp., 2009]. Wyniki pracy doktorskiej wskazują, iż wyciągi z miłorzębu dwuklapowego, żeń-szenia, kozłka lekarskiego oraz dziurawca zwyczajnego można uznać za potencjalne inhibitory ekspresji CYP2E1 na drodze mechanizmu supresji transkrypcji lub destabilizacji mRNA. Właściwości *Glycine max* w tym zakresie nie zostały potwierdzone ponieważ istotny efekt redukcji stężenia transkryptu CYP2E1 po 3 dniach podawania nie utrzymał się w dłuższym okresie czasu. Może to świadczyć o adaptacji aktywności tej izoformy do warunków eksperymentalnych. Pozostałe

ekstrakty: *E. purpurea*, *A. sativum* oraz *C. sinensis* nie wykazały znaczących właściwości modulacji ekspresji *CYP2E1*. Mechanizm hamowania ekspresji *CYP2E1* na poziomie mRNA nie jest jasny. Istnieją jednak sugestie wskazujące na fakt, iż regulacja ta może przebiegać z udziałem HNF-1 α , gdyż istnieje prawdopodobieństwo wpływu tego czynnika oraz jego współdziałania z innymi białkami na obniżenie ekspresji enzymów CYP [Riddick i wsp., 2004]. Jest to kolejny dowód na złożoność procesu modulacji ekspresji badanej izoformy.

Analiza interakcji dotyczących metabolizmu leków budzi zainteresowanie praktyki lekarskiej i firm farmaceutycznych rozwijających się w kierunku zapewnienia profesjonalnej opieki medycznej mającej na względzie przede wszystkim troskę o zdrowie pacjenta. Kontrolowane przyjmowanie leku roślinnego i produktów ziołowych poprzedzone rzetelną informacją o bezpieczeństwie, pochodzącą z badań klinicznych i eksperymentalnych oraz wywiadem żywieniowym, zmniejsza ryzyko niepowodzeń terapii i niekorzystnych skutków zdrowotnych. W tym celu podejmowane są prace badawcze z wykorzystaniem narzędzi biologii molekularnej, umożliwiające ocenę mechanizmów zachodzenia interakcji i poszukiwanie egzogennych i endogennych czynników zmieniających metabolizm ksenobiotyków.

6. WNIOSKI

1. Wykazano wpływ standaryzowanych wyciągów z powszechnie stosowanych surowców zielarskich na ekspresję enzymów I fazy metabolizmu ksenobiotyków CYP1A2 i CYP2E1. Wyniki wskazują na obniżenie poziomu transkryptu CYP1A2 pod wpływem *G. biloba* oraz zwiększenie stężenia mRNA po podaniu *H. perforatum* i *P. ginseng* w modelu *in vivo*. Hamowanie ekspresji izoformy CYP2E1 wykazano pod wpływem *G. biloba*, *P. ginseng*, *V. officinalis* i *H. perforatum*. Jednocześnie, żaden z wykorzystanych w pracy ekstraktów nie wykazał zdolności indukcji CYP2E1 na etapie transkryptu.
2. Ekstrapolacja wyników badania na homologiczne ludzkie izoformy CYP1A2 i CYP2E1 może wskazywać na możliwość zmiany parametrów farmakokinetycznych leków będących ich substratami i przyjmowanych łącznie z przetworami wymienionych surowców.
3. Pomiar stężenia mRNA badanych genów i czynnika transkrypcyjnego pozwala wnioskować o braku istotnego ryzyka modyfikacji metabolizmu substratów CYP1A2 i CYP2E1 po wpływie *C. sinensis* i *E. purpurea*.
4. Brak jednoznacznego związku między konstytutywnym poziomem transkryptu czynnika AhR a CYP1A2 może sugerować, iż transdukcja sygnału w komórce odbywa się wielokierunkowo. Mechanizm aktywacji receptora oraz genu *CYP1A2* jest złożony i związany z możliwością ujemnego i dodatniego sprzężenia zwrotnego, w tym aktywacją przez czynnik transkrypcyjny jego inhibitora. Wynik ten świadczyć również może o słabym efekcie agonistów i antagonistów obecnych w zastosowanych preparatach.
5. Zwiększony poziom mRNA czynnika AhR bez zmian ekspresji izoformy CYP1A2 może wskazywać na obecność w wyciągu z *G. max* jego potencjalnych selektywnych modulatorów.

7. STRESZCZENIE

Izoenzymy z nadrodziny cytochromu P450 (CYP-450) to hemoproteiny z klasy monoooksygenaz katalizujące reakcje I fazy biotransformacji ksenobiotyków, w tym leków oraz metabolizm substratów endogennych takich jak steroidy, kwasy tłuszczowe i prostaglandyny. Zaangażowane są one głównie w biokonwersję hydrofobowych substratów do ich hydrofilowych metabolitów. Obok funkcji detoksykacyjnej aktywność niektórych izoform cytochromu P450, w tym słabo poznanych CYP1A2 i CYP2E1, powiązana jest z przekształcaniem chemicznych czynników mutagennych, do których należą policykliczne aromatyczne węglowodory, nitrozaminy i arylaminy do ich aktywnych metabolitów. Analizowane w pracy enzymy ulegają ekspresji na wysokim poziomie w wątrobie i wykazują silny konserwatyzm międzygatunkowy. Wśród klinicznie istotnych leków metabolizowanych przez CYP1A2 wymienia się teofilinę, kofeinę, fenacetynę, klozapinę, fluwoksaminę i acetaminofen. Izoforma CYP2E1 zaangażowana jest w przemiany halotanu, acetaminofenu i chlorzoksazonu. Aktywność systemu katalitycznego cytochromu P450 może ulegać modyfikacjom pod wpływem czynników o właściwościach indukcyjnych lub supresyjnych, co leży u podłoża interakcji między lekiem syntetycznym a preparatem roślinnym. Dotychczas uznaje się, że z indukowaną aktywacją transkrypcji izoformy CYP1A2 związany jest głównie czynnik AhR, podczas gdy druga z badanych izoform jest regulowana kompleksowo na etapie transkrypcji, translacji oraz poprzez stabilizację mRNA i białka. Zmiany ekspresji tych enzymów mogą zaburzać metabolizm ich substratów, co prowadzi do poważnych konsekwencji o charakterze farmakologicznym i toksykologicznym.

Celem przedstawionej pracy doktorskiej była ocena potencjalnego wpływu wybranych standaryzowanych preparatów roślinnych na poziom transkryptu CYP1A2 i CYP2E1 w zwierzęcym modelu eksperymentalnym. Badania przeprowadzono u szczurów rasy Wistar otrzymujących drogą dożołądkową ekstrakty *Hypericum perforatum*, *Valeriana officinalis*, *Echinacea purpurea*, *Allium sativum*, *Camellia sinensis*, *Panax ginseng*, *Gingko biloba*, *Glycine max* odpowiednio w dawkach dobowych 300, 300, 50, 250, 300, 30, 200 i 100 mg/kg przez 3 oraz 10 dni. Wydzielono również grupy kontrolne zwierząt karmionych w tym samym czasie standardową dietą. Po zakończeniu procedury zwierzęta poddano dekapitacji i pobrano tkankę wątrobową, z której następnie izolowano całkowity RNA oraz określano poziom ekspresji badanych genów z użyciem techniki PCR w czasie rzeczywistym. Poziom transkrypcji badanych genów normalizowano względem GAPDH.

W pracy wykazano, że zastosowane wyciągi roślinne mogą wywierać zróżnicowany wpływ na ekspresję enzymów odpowiedzialnych za biotransformację ksenobiotyków. Spośród wykorzystanych w pracy ekstraktów jedynie *G. biloba* istotnie ($p < 0,001$) obniżył poziom ekspresji CYP1A2 do wartości 76% po 10 dniach podawania. Zdolność indukcji tej izoformy na etapie transkryptu u szczurów otrzymujących wyciągi przez 10 dni wykazały *H. perforatum* i *P. ginseng* (133%, $p = 0,002$; 140%, $p = 0,006$). Pod wpływem *A. sativum* po 10 dniach obserwowano redukcję ekspresji genu *AHR* o wartość 20% ($p = 0,012$), podczas gdy *G. max* istotnie zwiększył (161%, $p < 0,001$) stężenie mRNA w komórkach wątroby. W porównaniu do grup kontrolnych, indukcję czynnika AhR wykazano również po 3 dniach stosowania *G. biloba* (141%, $p = 0,003$) i *V. officinalis* (124%, $p = 0,004$). Po 10 dniach obserwacji nie zanotowano podobnego efektu. Zróżnicowany efekt wymienionych ekstraktów wobec CYP1A2 i AhR wskazuje na złożoność mechanizmu regulacji ekspresji tego enzymu. Izoforma CYP2E1 była silnie hamowana przez *G. biloba* (53%, $p < 0,001$; 68%, $p < 0,001$), *P. ginseng* (48%, $p < 0,001$; 70%, $p = 0,006$), *V. officinalis* (70%, $p < 0,001$; 74%, $p = 0,003$) i *H. perforatum* (81%, $p = 0,007$; 74%, $p = 0,020$) w wątrobie szczurów zarówno po 3 jak i 10 dniach systematycznego podawania przetworów. Dane te sugerują istnienie możliwości supresji CYP2E1 na etapie transkrypcji lub/i poprzez destabilizację mRNA przez składniki stosowanych ekstraktów. Wyciąg *G. max* wykazał podobną właściwość obniżenia ekspresji CYP2E1 (25%, $p = 0,005$) jedynie w krótkim okresie czasu (3 dni), natomiast *E. purpurea* i *A. sativum* nie wpłynęły na poziom transkryptu tej izoformy.

Wyniki pracy doktorskiej sugerują, że wyciągi ziołowe *G. biloba*, *H. perforatum* i *P. ginseng* mogą generować istotne interakcje na poziomie ekspresji CYP1A2. Mają one jednocześnie zdolność redukcji CYP2E1. Wpływ *A. sativum*, *G. max* i *V. officinalis* na izoformę CYP1A2 jest dyskusyjny ze względu na możliwość regulacji ekspresji czynnika AhR bez zmian poziomu CYP1A2. Zwiększony poziom mRNA czynnika AhR bez zmian ekspresji CYP1A2 może wskazywać na obecność w wyciągu z *G. max* jego selektywnych modulatorów. Ponadto, żaden z wykorzystanych ekstraktów nie wykazał zdolności indukcji CYP2E1. Na podstawie pomiaru stężenia mRNA badanych genów i czynnika transkrypcyjnego można wnioskować, że stosowanie *C. sinensis* i *E. purpurea* nie wiąże się z istotnym ryzykiem modyfikacji metabolizmu ich substratów. Ze względu na istotną rolę badanych izoform, konieczne jest prowadzenie dalszych szczegółowych badań dotyczących wpływu wyciągów roślinnych na ich ekspresję i aktywność.

8. SUMMARY

The effects of herbal materials on the expression level of rat *CYP1A2* and *CYP2E1* genes showing high interspecies conservation

The cytochrome P450 isoforms are a superfamily of heme-containing monooxygenases that are involved in the phase I biotransformation reactions of xenobiotics including drugs as well as endogenous compounds such as steroids, fatty acids and prostaglandins. The main function of CYP450 enzyme system is the conversion of lipophilic xenobiotics into the more soluble substances. However, some isoforms such as CYP1A2 and CYP2E1 are also responsible for the metabolic activation of chemical procarcinogens (e.g. arylamines, nitrosamines, aromatic hydrocarbons) to their ultimate reactive metabolites. CYP1A2 and CYP2E1 isoforms are expressed at high levels in the liver and show strong interspecies conservation. Among clinically important drugs metabolized by CYP1A2 are theophylline, caffeine, phenacetin, clozapine, fluvoxamine and acetaminophen. The CYP2E1 enzyme plays a main role in the metabolism of halothane, acetaminophen and chlorzoxazone. The P450 system activity may be subject to modification under the influence of induction or suppressor factors which may lead to numerous interactions especially between synthetic drugs and herbal preparations. It was demonstrated that CYP1A2 isoform is transcriptionally induced by the aryl hydrocarbon receptor (AhR) while CYP2E1 is comprehensively regulated at the stage of transcription, translation and by stabilizing the mRNA and protein. Modulation of these enzymes can influence the metabolism of their substrates leading to serious consequences of a pharmacological and toxicological effects.

The aim of this dissertation was to analyze the potential influence of herbal extracts on the gene transcription levels of CYP1A2 and CYP2E1 by using animal model. The study was performed in Wistar rats that were given standardized herbal extracts (*Hypericum perforatum*, *Valeriana officinalis*, *Echinacea purpurea*, *Allium sativum*, *Camellia sinensis*, *Panax ginseng*, *Gingko biloba*, *Glycine max*) once daily for 3 and 10 days. It was also distinguished control groups of animals fed the standard diet. Subsequently, the animals were decapitated and livers were isolated. Total RNA was extracted and gene expression levels was determined by quantitative real-time PCR method using a SYBR Green I dye according to manufacture's instructions. The transcriptional level of each gene was normalized to the GAPDH.

The results of this experiment show that herbal extracts may have a varying impact on the expression of enzymes responsible for biotransformation of xenobiotics. Among the herbal materials used in this study, only *G. biloba* statistically significant decreased the expression level of CYP1A2 to the value of 76% ($p < 0,001$) after 10 days of administration. On the contrary, *H. perforatum* and *P. ginseng* show a induction effect (133%, $p = 0,002$ and 140%, $p = 0,006$) on the CYP1A2 mRNA level. *A. sativum* dosing also inhibited the expression of AhR by almost 20% ($p = 0,012$) after 10 days whereas *G. max* significantly induced the mRNA concentration (161% , $p < 0,001$) in rat liver. Compared to controls, the level of AhR mRNA was also statistically significant induced after 3 but not 10 days of *G. biloba* (141%, $p = 0,003$) and *V. officinalis* (124%, $p = 0,004$) extracts feeding. The diverse effect of these extracts against CYP1A2 and AhR indicates the complexity of the mechanism of regulation of expression of this enzyme. Moreover, it was demonstrated that CYP2E1 isoform was strongly inhibited by *G. biloba* (53%, $p < 0,001$; 68%, $p < 0,001$), *P. ginseng* (48%, $p < 0,001$; 70%, $p = 0,006$), *V. officinalis* (70%, $p < 0,001$; 74%, $p = 0,003$) and *H. perforatum* (81%, $p = 0,007$; 74%, $p = 0,020$) in rat liver both after 3 and 10 days of chronic administration of extracts. These data described above suggest that standardized herbal materials can regulate the expression of *CYP2E1* gene by suppressing their transcription and/or mRNA stabilization. *G. max* showed a inhibitory effect on the rat CYP2E1 isoform by 25% ($p = 0,005$) only after short-term intake of standardized extract. Very little or no inhibition was observed for CYP2E1 after of *E. purpurea* and *A. sativum* administration.

In conclusion, the results suggest that *G. biloba*, *H. perforatum* and *P. ginseng* extracts might induce significant herb-drug interactions and alter the effectiveness and pharmacokinetics of drugs metabolized by CYP1A2 and CYP2E1. Due to the divergent effects of *A. sativum*, *G. max* and *V. officinalis* extracts on CYP1A2 and AHR transcription level their impact is debatable. However, increased mRNA levels of factor AhR may indicate the presence of its selective modulators in the *G. max* extract. Furthermore, none of the extracts used in the study did not induced the CYP2E1 mRNA synthesis. Based on the measurement of mRNA studied genes and the transcription factor it can suggest that the use of *C. sinensis* and *E. purpurea* is not associated with significant risk of modifying the metabolism of their substrates. Due to the important role of CYP1A2 and CYP2E1 enzymes in toxicology and pharmacology, it is necessary to conduct further detailed studies regarding the effect of herbal extracts on their expression and activity.

9. LITERATURA

Anandatheerthavarada HK, Addya S, Dwivedi RS, Biswas G, Mullick J, Avadhani NG. Localization of multiple forms of inducible cytochromes P-450 in rat liver mitochondria: Immunological characteristics and patterns of xenobiotic substrate metabolism, *Arch Biochem Biophys.* 1997; 1: 136-150.

Anderson GD, Rosito G, Mohustsy MA, Elmer GW. Drug interaction potential of soy extract and Panax ginseng. *J Clin Pharmacol.* 2003; 43(6): 643-648.

Antonsson C, Whitelaw ML, McGuire J, Gustafsson JA, Poellinger L. Distinct roles of the molecular chaperone hsp90 in modulating dioxin receptor function via the basic helix-loop-helix and PAS domains. *Mol Cell Biol.* 1995; 15: 756-765.

Anzenbacher P, Anzenbacherová E. Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics *Cell Mol Life Sci.* 2001; 58(5-6): 737-747.

Arlt VM. 3-Nitrobenzanthrone, a potential human cancer hazard in diesel exhaust and urban air pollution: a review of the evidence. *Mutagenesis.* 2005; 20(6): 399-410.

Arold G, Donath F, Maurer A, Diefenbach K, Bauer S, Henneicke-von Zepelin HH, Friede M, Roots I. No relevant interaction with alprazolam, caffeine, tolbutamide, and digoxin by treatment with a low-hyperforin St John's wort extract. *Planta Med.* 2005; 71: 331-337.

Axelson M, Shoda J, Sjoval J, Toll A, Wikvall K. Cholesterol is converted to 7 alpha-hydroxy-3-oxo-4-cholestenoic acid in liver mitochondria. Evidence for a mitochondrial sterol 7 alpha-hydroxylase. *J Biol Chem.* 1992; 267: 1701-1704.

Badyal DK, Dadhich AP. Cytochrome P450 and drug interactions. *Indian J Pharmacol.* 2001; 33: 248-259.

Baer-Dubowska W. Chemoprewencyjne i kancerogenne składniki żywności. *Nowiny Lekarskie.* 2005; 74(4): 505-509.

Bagdonaite E, Janulis V, Ivanauskas L, Labokas J. Between species diversity of *Hypericum perforatum* and *H. maculatum* by the content of bioactive compounds. *Nat Prod Commun.* 2012; 7(2): 199-200.

Banerjee SK, Maulik M, Manchanda SC, Dinda AK, Das TK, Maulik SK. Garlic-induced alteration in rat liver and kidney morphology and associated changes in endogenous antioxidant status. *Food Chem Toxicol.* 2001; 39(8): 793-797.

Beischlag TV, Wang S, Rose DW, Torchia J, Reisz-Porszasz S, Muhammad K, Nelson WE, Probst MR, Rosenfeld MG, Hankinson O. Recruitment of the NCoA/SRC-1/p160 family of transcriptional coactivators by the aryl hydrocarbon receptor/aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator complex. *Mol Cell Biol.* 2002; 22: 4319-4333.

Bezerra FJ, do Vale NB, Macedo Bde O, Rezende AA, Almeida MG. Evaluation of antioxidant parameters in rats treated with sevoflurane. *Rev Bras Anesthesiol.* 2010; 60(2): 162-169.

Bladt S, Wagner H. MAO- Hemmung durch Fraktionen und Inhaltsstoffe von *Hypericum* Extrakt. *Nervenheilkunde.* 1993; 12: 349-352.

- Blecharz-Klin K, Piechal A, Pyrzanowska J, Widy-Tyszkiewicz E. Interakcje leków roślinnych stosowanych w chorobach układu oddechowego. *Herba Pol.* 2005; 51, 3: 89-107.
- Bodalski T, Karłowicz-Bodalska K. *Ginkgo biloba* L. – miłorząb dwuklapowy (chemizm i działanie biologiczne). *Postępy Fitoterapii*, 2006, 4: 195-205.
- Boutros PC, Moffat ID, Franc MA, Tijet N, Tuomisto J, Pohjanvirta R, Okey AB. Dioxin-responsive AHRE-II gene battery: identification by phylogenetic footprinting. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004; 321: 707-715.
- Bradshaw TD, Bell DR. Caballero Relevance of the aryl hydrocarbon receptor (AhR) for clinical toxicology. *Clin Toxicol (Phila).* 2009; 47(7): 632-642.
- Brady JF, Xiao F, Wang M-H, Li Y, Ning SM, Gapac JM and Yang CS Effects of disulfiram on hepatic P450IIE1, other microsomal enzymes, and hepatotoxicity in rats. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1991a; 108: 366-373.
- Brady JF, Ishizaki H, Fukuto JM, Lin MC, Fadel A, Gapac JM, Yang CS. Inhibition of cytochrome P-450 2E1 by diallyl sulfide and its metabolites. *Chem Res Toxicol.* 1991b; 4(6): 642-647.
- Brady JF, Wang MH, Hong JY, Xiao F, Li Y, Yoo JS, Ning SM, Lee MJ, Fukuto JM, Gapac JM, i wsp. Modulation of rat hepatic microsomal monooxygenase enzymes and cytotoxicity by diallyl sulfide. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1991c; 108(2):342-54.
- Brauze UD, Malejka-Giganti D. A novel 4s/3H/Bnaftoflavone binding protein in liver cytosol of female Sprague - Dawley rats treated with aryl hydrocarbon receptor agonists. *Biochemical J.* 2000; 347: 787-795.
- Brauze D, Widerak M, Cwykiel J, Szyfter K, Baer-Dubowska W. The effect of aryl hydrocarbon receptor ligands on the expression of AhR, AhRR, ARNT, Hif1alpha, CYP1A1 and NQO1 genes in rat liver. *Toxicol Lett.* 2006; 167(3): 212-220.
- Bray BJ, Brennan NJ, Perry NB, Menkes DB, Rosengren RJ. Short term treatment with St. John's wort, hypericin or hyperforin fails to induce CYP450 isoforms in the Swiss Webster mouse. *Life Sci.* 2002a; 70(11):1325-1335.
- Bray BJ, Perry NB, Menkes DB, Rosengren RJ. St. John's wort extract induces CYP3A and CYP2E1 in the Swiss Webster mouse. *Toxicol Sci.* 2002b; 66(1): 27-33.
- Brunnberg S, Pettersson K, Rydin E, Matthews J, Hanberg A, Pongratz I. The basic helix-loop-helix-PAS protein ARNT functions as a potent coactivator of estrogen receptor-dependent transcription. *PNAS* 2003; 100 (11): 6517-6522.
- Bu-Abbas A, Clifford MN, Walker R, Ioannides C. Selective induction of rat hepatic CYP1 and CYP4 proteins and of peroxisomal proliferation by Green tea. *Carcinogenesis.* 1994a; 15: 2575-2579.
- Bunger MK, Moran SM, Glover E, Thomae TL, Lahvis GP, Lin BC, Bradfield C A. Resistance to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin toxicity and abnormal liver development in mice carrying a mutation in the nuclear localization sequence of the aryl hydrocarbon receptor. *J Biol Chem.* 2003; 278: 17767-17774.
- Caro AA, Cederbaum AI. Oxidative stress, toxicology, and pharmacology of CYP2E1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2004; 44: 27-42.

- Cashman JR. Some distinctions between flavin-containing and cytochrome P450 monooxygenases. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005; 338(1): 599-604.
- Cederbaum AI. CYP2E1 – Biochemical and Toxicological Aspects and Role in Alcohol-Induced Liver Injury. *Mount Sinai J Med*. 2006; 73(4): 657-672.
- Chang TKH, Chen J, Lee WBK. Differential inhibition and inactivation of human CYP1 enzymes by transresveratrol: evidence for mechanism-based inactivation of CYP1A2. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001; 299: 874-882.
- Chang TKH, Chen J, Benetton SA. In vitro effect of standardized ginseng extracts and individual ginsenosides on the catalytic activity of human CYP1A1, CYP1A2, and CYP1B1. *Drug Metab Dispos*. 2002; 30: 378-384.
- Chang TKH, Chen J, Teng XW. Distinct role of bilobalide and ginkgolide A in the modulation of rat CYP2B1 and CYP3A23 gene expression by Ginkgo biloba extract in cultured hepatocytes. *Drug Metab Dispos*. 2006a; 34: 234-242.
- Chang TK, Chen J, Yeung EY. Effect of Ginkgo biloba extract on procarcinogen-bioactivating human CYP1 enzymes: identification of isorhamnetin, kaempferol, and quercetin as potent inhibitors of CYP1B1. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2006b; 213(1): 18-26.
- Chen C, Han YH, Yang Z, Rodrigues AD. Effect of interferon- α 2b on the expression of various drug-metabolizing enzymes and transporters in co-cultures of freshly prepared human primary hepatocytes. *Xenobiotica*. 2011; 41(6): 476-485.
- Chen X, Wei M, Zhang H, Luo C, Chen Y, Chen Y. Effect of vanillin and ethyl vanillin on cytochrome P450 activity in vitro and in vivo. *Food Chem Toxicol*. 2012; 50(6): 1897-1901.
- Chiang JY. Regulation of bile acid synthesis: pathways, nuclear receptors, and mechanisms. *J Hepatol*. 2004; 40: 539-551.
- Choudhary D, Jansson I, Stoilov I, Sarfarazi M, Schenkman JB. Expression patterns of mouse and human CYP orthologs (families 1-4) during development and in different adult tissues. *Arch Biochem Biophys*. 2005; 436(1): 50-61.
- Chow HH, Hakim IA, Vining DR, Crowell JA, Cordova CA, Chew WM, Xu MJ, Hsu CH, Ranger-Moore J, Alberts DS. Effects of repeated green tea catechin administration on human cytochrome P450 activity. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006; 15(12):2473-2476.
- Chung I, Bresnick E. Identification of positive and negative regulatory elements of the human cytochrome P4501A2 (CYP1A2) gene. *Arch Biochem Biophys*. 1997; 338: 220-226.
- Chung WG, Park CS, Roh HK, Lee WK, Cha YN. Oxidation of ranitidine by isozymes of flavin-containing monooxygenase and cytochrome P450. *Jpn J Pharmacol*. 2000; 84(2): 213-220.
- Curi-Pedrosa R, Daujat M, Pichard L, Ourlin JC, Clair P, Gervot L, Lesca P, Domergue J, Joyeux H, Fourtanier G, i wsp. Omeprazole and lansoprazole are mixed inducers of CYP1A and CYP3A in human hepatocytes in primary culture. *J Pharmacol Exp Ther*. 1994; 269(1): 384-392.
- Cremer KF, Secor J, Speeg KV Jr. The effect of route of administration on the cimetidine-theophylline drug interaction. *J Clin Pharmacol*. 1989; 29(5): 451-456.
- Cresteil T. Regulation of drug-metabolizing enzymes during the perinatal period in rat and human liver. *Bioessays*. 1987; 7: 120-124.

- Cresteil T. Onset of xenobiotic metabolism in children: toxicological implications. *Food Addit Contam.* 1998; 15: 45-51.
- Crofts FG, Sutter TR, Strickland PT. Metabolism of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b]pyridine by human cytochrome P4501A1, P4501A2 and P4501B1. *Carcinogenesis* 1998; 19: 1969-1973.
- Czekaj P. Potencjał I fazy przemian ksenobiotyków w prawidłowej i regeneracyjnej wątrobie szczurów w różnym wieku. Śląska Akademia Medyczna, Katowice 2005.
- Daniel WA, Syrek M, Ryłko Z, Wójcikowski J. Effects of antidepressant drugs on the activity of cytochrome P-450 measured by caffeine oxidation in rat liver microsomes. *Pol J Pharmacol.* 2001; 53(4): 351-357.
- Daniel WA, Kot M, Wójcikowski J. Effects of classic and newer antidepressants on the oxidation pathways of caffeine in rat liver. In vitro study. *Pol J Pharmacol.* 2003; 55(6): 1045-1053.
- Davenport DM, Wargovich MJ. Modulation of cytochrome P450 enzymes by organosulfur compounds from garlic. *Food Chem Toxicol.* 2005; 43(12): 1753-1762.
- Delclos KB, Bucci TJ, Lomax LG, Latendresse JR, Warbritton A, Weis CC, Newbold RR. Effects of dietary genistein exposure during development on male and female CD (Sprague-Dawley) rats. *Reprod Toxicol.* 2001; 15(6): 647-663.
- Deng Y, Bi HC, Zhao LZ, He F, Liu YQ, Yu JJ, Ou ZM, Ding L, Chen X, Huang ZY, Huang M, Zhou SF. Induction of cytochrome P450s by terpene trilactones and flavonoids of the Ginkgo biloba extract EGb 761 in rats. *Xenobiotica.* 2008; 38(5): 465-481.
- Denison M, Pandini A, Nagy S, Baldwin E, Bonati L. Ligand binding and activation of the Ah receptor. *Chem Biol Interact.* 2002; 141: 3-24.
- Denissenko MF, Pao A, Tang M, Pfeifer GP. Preferential formation of benzo[a]pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in P53. *Science.* 1996; 274: 430-432.
- Ding X, Kaminsky LS. Human extrahepatic cytochromes P450: function in xenobiotic metabolism and tissue-selective chemical toxicity in the respiratory and gastrointestinal tracts. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2003; 43: 149-173.
- Donovan JL, DeVane CL, Chavin KD, Wang JS, Gibson BB, Gefroh HA, Markowitz JS. Multiple night-time doses of valerian (*Valeriana officinalis*) had minimal effects on CYP3A4 activity and no effect on CYP2D6 activity in healthy volunteers. *Drug Metab Dispos.* 2004a; 32(12): 1333-1336.
- Donovan JL, Chavin KD, Devane CL, Taylor RM, Wang JS, Ruan Y, Markowitz JS. Green tea (*Camellia sinensis*) extract does not alter cytochrome p450 3A4 or 2D6 activity in healthy volunteers. *Drug Metab Dispos.* 2004b; 32(9): 906-908.
- Dreisbach AW, Ferencz N, Hopkins NE, Fuentes MG, Rege AB, George WJ, Lertora JJ. Urinary excretion of 6-hydroxychlorzoxazone as an index of CYP2E1 activity. *Clin Pharmacol Ther.* 1995; 58(5): 498-505.
- Edwards DJ, Bernier SM. Inhibitory effect of grapefruit juice and its bitter principal, naringenin, on CYP1A2 dependent metabolism of caffeine in man. *Life Sci.* 1996; 59 (13): 1025-1030.

- Edwards RJ, Price RJ, Watts PS, Renwick AB, Tredger JM, Boobis AR, Lake BG. Induction of cytochrome P450 enzymes in cultured precision-cut human liver slices. *Drug Metab Dispos.* 2003; 31(3): 282-288.
- Ekström G, Cronholm T, Ingelman-Sundberg M. Hydroxyl-radical production and ethanol oxidation by liver microsomes isolated from ethanol-treated rats. *Biochem J.* 1986; 233: 755-761.
- Eliasson E, Johansson I, Ingelman-Sundberg M. Ligand-dependent maintenance of ethanol-inducible cytochrome P-450 in primary rat hepatocyte cell cultures. *Biochem Biophys Res Commun.* 1988; 150: 436-443.
- Eliasson E, Johansson I, Ingelman-Sundberg M. Substrate-, hormone-, and cAMP-regulated cytochrome P450 degradation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990; 87(8): 3225-3229.
- ESCOP monographs on the medicinal use of plant drugs. The Scientific Foundation for Herbal Medicinal Products. Valerianae radix. European Scientific Cooperative On Phytotherapy. 2th ed. Completely revised and expanded, Exeter, United Kingdom: ESCOP, Georg Thieme Verlag, Thieme New York, 2003, 539-544.
- Fleischauer AT, Poole C, Arab L. Garlic consumption and cancer prevention: meta-analyses of colorectal and stomach cancers. *Am J Clin Nutr.* 2000; 72(4): 1047-1052.
- Flockhart DA. Drug Interactions: Cytochrome P₄₅₀ Drug Interaction Table". Indiana University School of Medicine 2007; <http://medicine.iupui.edu/clinpharm/ddis/table.aspx>. Dostęp 20.03.2012r.
- Foti RS, Wahlstrom JL. The role of dietary supplements in cytochrome P450-mediated drug. *Interactions Bol. Latinoam. Caribe Plant Med Aromaticas.* 2008; 7(2): 66-84.
- Freeman C, Spelman K. A critical evaluation of drug interactions with Echinacea spp. *Mol Nutr Food Res.* 2008; 52: 789-798.
- Frei B, Higdon JV. Antioxidant activity of tea polyphenols in vivo: evidence from animal studies. *J Nutr.* 2003; 133(10): 3275-3284.
- French CT, Hanneman WH, Chubb LS, Billings RE, Andersen ME. Induction of CYP1A1 in Primary Rat Hepatocytes by 3,3',4,4',5-Pentachlorobiphenyl: Evidence for a Switch Circuit Element. *Toxicol Sci.* 2004; 78: 276-286.
- Fuhr U, Wolff T, Harder S, Schymanski P, Staib AH. Quinolone inhibition of cytochrome P-450-dependent caffeine metabolism in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos* 1990; 18: 1005-1010.
- Fuhr U, Woodcock BG, Siewert M. Verapamil and drug metabolism by the cytochrome P450 isoform CYP1A2. *Eur J Clin Pharmacol.* 1992; 42(4): 463-464.
- Fujii-Kuriyama Y, Mizukami Y, Kawaraji K, Sagowa K, Muramatsu M. Primary structure of a cytochrome P450 coding nucleotide sequence Phenobarbital inducible P450 cDNA from the rat liver. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1982; 79: 2793-2797.
- Fujii-Kuriyama Y, Mimura J. Molecular mechanisms of AhR functions in the regulation of cytochrome P450 genes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 338(1): 311-317.
- Fujita K, Kamataki T. Role of human cytochrome P450 (CYP) in the metabolic activation of N-alkylnitrosamines: application of genetically engineered *Salmonella typhimurium* YG7108 expressing each form of CYP together with human NADPH-cytochrome P450 reductase. *Mutat Res.* 2001; 483: 35-41.

- Fukuhara M, Sun B, Kato K, Kimura M, Yamazaki S. Cytochrome P450 isoforms catalyzing benzo[a]pyrene metabolism in the Chinese hamster liver. *Toxicol Lett.* 1999; 110(1-2): 85-93.
- Gallagher EP, Wienkers LC, Stapleton PL, Kunze KL, Eaton DL. Role of human microsomal and human complementary DNA-expressed cytochromes P4501A2 and P4503A4 in the bioactivation of aflatoxin B1. *Cancer Res.* 1994; 54: 101-108.
- Gaudineau C, Beckerman R, Welbourn S, Auclair K. Inhibition of human P450 enzymes by multiple constituents of the Ginkgo biloba extract. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004; 318(4): 1072-1078.
- Gawrońska-Szklarz B. Polimorfizm genów enzymów biorących udział w metabolizmie leków. *Probl Ter Monit.* 2000; 11: 14.
- Gebhardt AC, Lucas D, Ménez JF, Seitz HK. Chlormethiazole inhibition of cytochrome P450 2E1 as assessed by chlorzoxazone hydroxylation in humans. *Hepatology.* 1997; 26(4): 957-961.
- Gelboin HV. Benzo[alpha]pyrene metabolism, activation and carcinogenesis: role and regulation of mixed-function oxidases and related enzymes. *Physiol Rev.* 1980; 60: 1107-1166.
- Gerhold D, Lu M, Xu J, Austin C, Caskey CT, Rushmore T. Monitoring expression of genes involved in drug metabolism and toxicology using DNA microarrays. *Physiol Genomics.* 2001; 5(4): 161-170.
- Gervasi PG, Puccini P, Longo V, Lippi A. Role of the acetone inducible P-450IIE1 in the deethylation of diethylnitrosamine in hamster. *Adv Exp Med Biol.* 1991; 283: 285-287.
- Ghotbi R, Gomez A, Milani L, Tybring G, Syvänen AC, Bertilsson L, Ingelman-Sundberg M, Aklillu E. Allele-specific expression and gene methylation in the control of CYP1A2 mRNA level in human livers ASE and gene methylation of CYP1A2. *The Pharmacogenomics Journal* 2009; 9: 208-217.
- Goldman R, Shields PG. Food Mutagens. *J Nutr.* 2003; 133: 965-973.
- Gonzalez FJ. The molecular biology of cytochrome P450s. *Pharmacol Rev.* 1988; 40: 243-288 [errata: *Pharmacol. Rev.* 41, 91 (1989)].
- Gonzalez FJ. Control of constitutively-expressed developmentally-activated rat hepatic cytochrome P450 genes. *Keio J Med.* 1992; 41: 68-75.
- Gonzalez FJ, Gelboin HV. Role of human cytochromes P450 in the metabolic activation of chemical carcinogens and toxins. *Drug Metab Rev.* 1994; 26: 165-183.
- Gonzalez FJ, Tukey RH. Drug metabolism in: Brunton LL, Lazo JS, Parker KL. Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. Eleventh ed. New York, McGraw-Hill: Medical Publishing Division. 2006; 71-91.
- Gorski JC, Huang SM, Pinto A, Hamman MA, Hilligoss JK, Zaheer NA, Desai M, Miller M, Hall SD. The effect of echinacea (*Echinacea purpurea* root) on cytochrome P450 activity in vivo. *Clin Pharmacol Ther.* 2004; 75(1): 89-100.
- Goshman L, Fish J, Roller K. Clinically significant cytochrome P450 drug interactions. *Pharm Soc Wis.* 1999; May/June: 23-38.
- Greenblatt DJ, Leigh-Pemberton RA, von Moltke LL. In vitro interactions of water-soluble garlic components with human cytochromes p450. *J Nutr.* 2006; 136(3): 806-809.

- Gu Y Z, Hogenesch JB, Bradfield CA. The PAS superfamily: sensors of environmental and developmental signals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2000; 40: 519-561.
- Guengerich FP, Dannan GA, Wright ST, Martin MV, Kaminsky LS. Purification and characterization of liver microsomal cytochromes P-450: electrophoretic, spectral, catalytic, and immunochemical properties and inducibility of eight isozymes isolated from rats treated with Phenobarbital or β -naphthoflavone. *Biochemistry.* 1982; 21(23): 6019-6030.
- Guengerich FP, Kim DH, Iwasaki M. Role of human cytochrome P-450 IIE1 in the oxidation of many low molecular weight cancer suspects. *Chem Res Toxicol.* 1991; 4(2): 168-179.
- Guengerich FP. Cytochrome P450 of human liver. Classification and activity profiles of the major enzymes. W: Pacifici GM, Fracchia GN (red.). *Advances in drug metabolism in man.* ECSC-EC-EAEC, Brussels.1995; 179-231.
- Guengerich FP. Comparisons of catalytic selectivity of cytochrome P450 subfamily enzymes from different species. *Chem Biol Interact.* 1997; 106: 161-182.
- Guengerich FP. Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. *Chem Res Toxicol.* 2000; 14: 611-650.
- Gurley BJ, Gardner SF, Hubbard MA, Williams DK, Gentry WB, Cui Y, Ang CY. Cytochrome P450 phenotypic ratios for predicting herb-drug interactions in humans. *Clin Pharmacol Ther.* 2002; 72(3): 276-287.
- Gurley BJ, Gardner SF, Hubbard MA, Williams DK, Gentry WB, Carrier J, Khan IA, Edwards DJ, Shah A. In vivo assessment of botanical supplementation on human cytochrome P450 phenotypes: Citrus aurantium, Echinacea purpurea, milk thistle, and saw palmetto. *Clin Pharmacol Ther.* 2004; 76(5): 428-440.
- Gurley BJ, Gardner SF, Hubbard MA, Williams DK, Gentry WB, Cui Y, Ang CY. Clinical assessment of effects of botanical supplementation on cytochrome P450 phenotypes in the elderly: St John's wort, garlic oil, Panax ginseng and Ginkgo biloba. *Drugs Aging.* 2005a; 22: 525-539.
- Gurley BJ, Gardner SF, Hubbard MA, Williams DK, Gentry WB, Khan IA, Shah A. In vivo effects of goldenseal, kava kava, black cohosh, and valerian on human cytochrome P450 1A2, 2D6, 2E1, and 3A4/5 phenotypes. *Clin Pharmacol Ther.* 2005b; 77: 415-426.
- Hahn ME. Aryl hydrocarbon receptors: diversity and evolution. *Chem Biol Interact.* 2002; 141: 131-160.
- Hakkola J, Hu Y, Ingelman-Sundberg M. Mechanisms of Down-Regulation of CYP2E1 Expression by Inflammatory Cytokines in Rat Hepatoma Cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003; 304(3): 1048-1054.
- Hakooz N, Hamdan I. Effects of dietary broccoli on human in vivo caffeine metabolism: a pilot study on a group of Jordanian volunteers. *Curr Drug Metab.* 2007; 8(1): 9-15.
- Hammond AH, Fry JR. Involvement of cytochrome P4502E1 in the toxicity of dichloropropanol to rat hepatocyte cultures. *Toxicol.* 1997; 118: 171-179.
- Hankinson O. The aryl hydrocarbon receptor complex. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1995; 35: 307-340.
- Hankinson O. Role of coactivators in transcriptional activation by the aryl hydrocarbon receptor. *Arch Biochem Biophys.* 2005; 433: 379-386.

- Hasegawa R, Chujo T, Sai-Kato K, Umemura T, Tanimura A, Kurokawa Y. Preventive effects of green tea against liver oxidative DNA damage and hepatotoxicity in rats treated with 2-nitropropane. *Food Chem Toxicol.* 1995; 33: 961-970.
- Hattesoehl M, Feistel B, Sievers H, Lehnfeld R, Hegger M, Winterhoff H. Extracts of *Valeriana officinalis* L. s.l. show anxiolytic and antidepressant effects but neither sedative nor myorelaxant properties. *Phytomedicine.* 2008; 15(1-2): 2-15.
- Hellum BH, Hu Z, Nilen OG. The Induction of CYP1A2, CYP2D6 and CYP3A4 by Six Trade Herbal Products in Cultured Primary Human Hepatocytes. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2007; 100(1): 23-30.
- Helsby NA, Williams J, Kerr D, Gescher A, Chipman JK. The isoflavones equol and genistein do not induce xenobiotic-metabolizing enzymes in mouse and in human cells. *Xenobiotica.* 1997; 27: 587-596.
- Helsby NA, Chipman JK, Gescher A, Kerr D. Inhibition of mouse and human CYP 1A- and 2E1-dependent substrate metabolism by the isoflavonoids genistein and equol *Food Chem Toxicol.* 1998; 36: 375-382.
- Henderson GL, Harkey MR, Gershwin ME, Hackman RM, Stern JS, Stresser DM. Effects of ginseng components on c-DNA-expressed cytochrome P450 enzyme catalytic activity. *Life Sci.* 1999; 65(15): 209-214.
- Hersh EV, Moore PA. Drug interactions in dentistry: the importance of knowing your CYPs. *J Am Dent Assoc.* 2004; 135(3): 298-311.
- Hodek P, Trefl I P, Stiborova M. Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chem Biol Interact.* 2002; 139: 1-21.
- Hodge G, Hodge S, Han P. *Allium sativum* (garlic) suppresses leukocyte inflammatory cytokine production in vitro: potential therapeutic use in the treatment of inflammatory bowel disease. *Cytometry.* 2002; 48(4): 209-215.
- Hong CC, Tang BK, Rao V, Agarwal S, Martin L, Trichler D, Yaffe M, Boyd NF. Cytochrome P450 1A2 (CYP1A2) activity, mammographic density, and oxidative stress: a cross-sectional study. *Breast Cancer Res.* 2004; 6(4): 338-351.
- Honkakoski P, Negishi M. Regulation of cytochrome P450 (CYP) genes by nuclear receptors. *Biochem J.* 2000; 347: 321-337.
- Hosono-Fukao T, Hosono T, Seki T, Ariga T. Diallyl trisulfide protects rats from carbon tetrachloride-induced liver injury. *J Nutr.* 2009; 139(12): 2252-2256.
- Hu Z, Yang X, Ho PC, Chan SY, Heng PW, Chan E, Duan W, Koh HL, Zhou S. Herb-drug interactions: a literature review. *Drugs.* 2005; 65: 1239-1282.
- Iba MM, Bennett S, Storch A, Ghosal A, Thomas PE. Synergistic induction of rat microsomal CYP1A1 and CYP1A2 by acetone in combination with pyridine. *Cancer Lett.* 1993; 74(1-2): 69-74.
- Iba MM, Fung J, Thomas PE, Park Y. Constitutive and induced expression by pyridine and beta-naphthoflavone of rat CYP1A is sexually dimorphic. *Arch Toxicol.* 1999; 73(4-5): 208-216.
- Ikuta T, Tachibana T, Watanabe J, Yoshida M, Yoneda Y, Kawajiri K. Nucleocytoplasmic shuttling of the aryl hydrocarbon receptor. *J Biochem.* 2000; 127: 503-509.

- Ingelman-Sundberg M., Daly A.K., Nebert D.W. Human CYP Allele Nomenclature Committee: Allele nomenclature for cytochrome P450 enzymes. <http://www.cypalleles.ki.se> [dostęp 2.04.2012].
- Ioannides C, Lewis DF. Cytochromes P450 in the bioactivation of chemicals. *Curr Top Med Chem.* 2004; 4(16): 1767-1788.
- Ioannides C. Bioactivation of chemicals by cytochromes P450. *Environ Biotech.* 2007; 3(1): 1-9.
- Insin EM, Guengerich FP. Complex reactions catalyzed by cytochrome P450 enzymes. *Biochim Biophys Acta.* 2007; 1770(3): 314-329.
- Ito T, Asakura K, Tougou K. Regulation of Cytochrome P450 2E1 under Hypertonic Environment through TonEBP in Human Hepatocytes. *Mol Pharmacol.* 2007; 72: 173-181.
- Izzo AA, Ernst E. Interactions between herbal medicines and prescribed drugs: a systematic review. *Drugs.* 2001; 61: 2163-2175.
- Jeuken A, Keser BJ, Khan E, Brouwer A, Koeman J, Denison MS. Activation of the Ah receptor by extracts of dietary herbal supplements, vegetables, and fruits. *J Agric Food Chem.* 2003; 51: 5478-5487.
- Jeppesen U, Gram LF, Vistisen K, Loft S, Poulsen HE, Brøsen K. Dose-dependent inhibition of CYP1A2, CYP2C19 and CYP2D6 by citalopram, fluoxetine, fluvoxamine and paroxetine. *Eur J Clin Pharmacol.* 1996; 51(1): 73-78.
- Jones SM, Boobis AR, Moore GE, Stanier PM. Expression of CYP2E1 during human fetal development: methylation of the CYP2E1 gene in human fetal and adult liver samples. *Biochem Pharmacol.* 1992; 43: 1876-1879.
- Juurink DN, Memdani M, Kopp A, Laupacis A, Redelmeier DA. Drug-drug interactions among elderly patients hospitalized for drug toxicity. *JAMA* 2003; 89 (13): 1652-1658.
- Kalapos MP. On the mammalian acetone metabolism: from chemistry to clinical implications. *Biochim Biophys Acta.* 2003; 1621(2): 122-139.
- Kamiński M. Ustrojowa lokalizacja oksydaz o funkcji mieszanej. *Folia Med Cracov.* 1990; 3: 97-120.
- Kamiński M, Wiaderkiewicz R. The role of the liver in xenobiotic biotransformation. Part II. Xenobiotic metabolism In the liver Mediated by cytochrome P450-dependent monooxygenases. *Problems of Forensic Sciences.* 2008; 73: 7-20.
- Karamanakos PN, Trafalis DT, Geromichalos GD, Pappas P, Harkitis P, Konstandi M, Marselos M. Inhibition of rat hepatic CYP2E1 by quinacrine: molecular modeling investigation and effects on 4-(methyl nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK)-induced mutagenicity. *Arch Toxicol.* 2009; 83(6): 571-580.
- Kashuba ADM, Bertino JS. Mechanisms of drug interaction. *Drug interactions in infectious diseases.* Humana Press. 2001; 18-22.
- Kharasch ED, Thummel KE, Mhyre J, Lillibridge JH. Single-dose disulfiram inhibition of chlorzoxazone metabolism: a clinical probe for P450 2E1. *Clin Pharmacol Ther.* 1993; 53(6): 643-650.
- Kim SK, KimYC. Effect of a single administration of benzene, toluene or mxylene on carboxyhaemoglobin elevation and metabolism of dichloromethane in rats. *J Appl Toxicol.* 1996; 16: 437-444.

- Kim HJ, Chun YJ, Park JD, Kim SI, Roh JK, Jeong TC. Protection of rat liver microsomes against carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation by red ginseng saponin through cytochrome P450 inhibition. *Planta Med.* 1997; 63(5): 415-418.
- Kirkwod C, Moore A, Hayer P, Devane CL, Pelonero A. Influence of menstrual cycle and gender on alprazolam pharmacokinetics. *Clin Pharmacol Ther.* 1991; 50: 404-409.
- Kishida T, Nagamoto M, Ohtsu Y, Watakabe M, Ohshima D, Nashiki K, Mizushige T, Izumi T, Obata A, Ebihara K. Lack of an inducible effect of dietary soy isoflavones on the mRNA abundance of hepatic cytochrome P-450 isozymes in rats. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2004; 68(3): 508-515.
- Kishida T, Muto S, Hayashi M, Tsutsui M, Tanaka S, Murakami M, Kuroda J. Strain differences in hepatic cytochrome P450 1A and 3A expression between Sprague-Dawley and Wistar rats. *J Toxicol Sci.* 2008; 33(4): 447-457.
- Kleiner HE, Vulimiri SV, Hatten WB, Reed MJ, Nebert DW, Jefcoate CR, DiGiovanni J. Role of cytochrome p4501 family members in the metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons in mouse epidermis. *Chem Res Toxicol.* 2004; 17(12): 1667-1674.
- Klingenberg M., Pigments of rat microsomes. *Arch Biochem Biophys.* 1958; 75: 376-386.
- Komisja E. Monografia: Ginseng radix. Bundesanzeiger nr 11 z 17.01.1991. W: Rośliny Lecznicze w Fitoterapii. Kompendium roślin leczniczych uszeregowanych według zakresów stosowania na podstawie monografii opracowanych przez Komisję E Federalnego Urzędu Zdrowia RFN. IRiPZ. Poznań 2000.
- Komoroski BJ, Zhang S, Cai H, Hutzler JM, Frye R, Tracy TS, Strom SC, Lehmann T, Ang CY, Cui YY, Venkataramanan R. Induction and inhibition of cytochromes P450 by the St. John's wort constituent hyperforin in human hepatocyte cultures. *Drug Metab Dispos.* 2004; 32(5): 512-518.
- Koop DR, Crump BC, Nordblom GD, Coon MJ. Immunochemical evidence for induction of alcohol-oxidizing cytochrome P450 of rabbit liver microsomes by diverse agents: ethanol, imidazole, trichloroethylene, acetone, pyrazole and isoniazid. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 1985; 82: 4065-4069.
- Koop DR, Coon MJ. Ethanol oxidation and toxicity: role of alcohol P-450 oxygenase. *Alcohol Clin Exp Res.* 1986; 10(6): 44-49.
- Koop DR. Oxidative and reductive metabolism by cytochrome P450 2E1. *FASEB J.* 1992; 6: 724-730.
- Koprowska K, Czyż M. Dacarbazine, a chemotherapeutic against metastatic melanoma and a reference drug for new treatment modalities. *Postepy Hig Med Dosw.* 2011; 65: 734-751.
- Korhonen LE, Rahnasto M, Mähönen NJ, Wittekindt C, Poso A, Juvonen RO, Raunio H. Predictive threedimensional quantitative structure activity relationship of cytochrome P450 1A2 inhibitors. *J Med Chem.* 2005; 48: 3808-3815.
- Kot M, Daniel WA. Caffeine as a marker substrate for testing cytochrome P450 activity in human and rat. *Pharmacol Reports.* 2008, 60: 789-797.
- Kroetz DL, Zeldin DC. Cytochrome P450 pathways of arachidonic acid metabolism. *Curr Opin Lipidol.* 2002; 13 (3): 273-283.
- Krusekopf S, Roots I. St. John's wort and its constituent hyperforin concordantly regulate expression of genes encoding enzymes involved in basic cellular pathways. *Pharmacogenet Genomics.* 2005; 15(11): 817-829.

- Kumar MB, Perdew GH. Nuclear receptor coactivator SRC-1 interacts with the Q-rich subdomain of the AhR and modulates its transactivation potential. *Gene Expr.* 1999; 8: 273-286.
- Kumar MB, Tarpey RW, Perdew GH. Differential recruitment of coactivator RIP140 by Ah and estrogen receptors. Absence of a role for LXXLL motifs. *J Biol Chem.* 1999; 274: 22155-22164.
- Kuo I, Chen J, Chang TK. Effect of Ginkgo biloba extract on rat hepatic microsomal CYP1A activity: role of ginkgolides, bilobalide, and flavonols. *Can J Physiol Pharmacol.* 2004; 82: 57-64.
- Kwak MK, Kim SG, Kim ND. Effects of garlic oil on rat hepatic P450E1 expression. *Xenobiotica.* 1995; 25(10): 1021-1029.
- Lai DY, Arcos JC. Minireview: dalkylnitrosamine bioactivation and carcinogenesis. *Life Sci.* 1980; 27: 2149-2165.
- Lamer-Zarawska E, Kowal-Gierczak B, Niedworok J. *Fitoterapia i leki roślinne*. Wydawnictwo lekarskie PZWL, Warszawa 2007.
- Leavens TL, Farris GM, James RA, Shah R, Wong VA, Marshall MW, Bond JA. Genotoxicity and cytotoxicity in male B6C3F1 mice following exposure to mixtures of 1,3-butadiene and styrene. *Environ Mol Mutagen.* 1997; 29(4): 335-345.
- Le Bon AM, Vernevaut MF, Guenot L, Kahane R, Auger J, Arnault I, Haffner T, Siess MH. Effects of garlic powders with varying alliin contents on hepatic drug metabolizing enzymes in rats. *J Agric Food Chem.* 2003; 51(26): 7617-7623.
- Lejus C, Fautrel A, Mallédant Y, Guillouzo A. Inhibition of cytochrome P450 2E1 by propofol in human and porcine liver microsomes. *Biochem Pharmacol.* 2002; 64(7): 1151-1156.
- Lekas P, Tin KL, Lee C, Prokipcak RD. The human cytochrome P450 1A1 mRNA is rapidly degraded in HepG2 cells. *Arch Biochem Biophys.* 2000; 384(2): 311-318.
- Levine M, Law EY, Bandiera SM, Chang TK, Bellward GD. In vivo cimetidine inhibits hepatic CYP2C6 and CYP2C11 but not CYP1A1 in adult male rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 1998; 284(2): 493-499.
- Levy RH. Cytochrome P450 isozymes and antiepileptic drug interactions. *Epilepsia.* 1995; 36: 8-13.
- Lewis DFV, Ioannides C, Parke DV. Cytochromes P450 and Species Differences in Xenobiotic Metabolism and Activation of Carcinogen. *Environ Health Perspect.* 1998; 106 (10): 633-641.
- Lewis DF, Bird MG, Dickins M, Lake BG, Eddershaw PJ, Tarbit MH, Goldfarb PS. Molecular modelling of human CYP2E1 by homology with the CYP102 haemoprotein domain: investigation of the interactions of substrates and inhibitors within the putative active site of the human CYP2E1 isoform. *Xenobiotica.* 2000; 30(1): 1-25.
- Li L, Stanton JD, Tolson AH, Luo Y, Wang H. Bioactive terpenoids and flavonoids from Ginkgo biloba extract induce the expression of hepatic drug-metabolizing enzymes through pregnane X receptor, constitutive androstane receptor, and aryl hydrocarbon receptor-mediated pathways. *Pharmaceutical Research.* 2009; 26: 872-882.
- Li D, Jiao L, Li Y, Doll MA, Hein DW, Bondy ML, Evans DB, Wolff RA, Lenzi R, Pisters PW, Abbruzzese JL, Hassan MM. Polymorphisms of cytochrome P4501A2 and N-acetyltransferase genes, smoking, and risk of pancreatic cancer. *Carcinogenesis.* 2006; 27(1): 103-111.

- Lin H, Hollenberg PF. N-nitrosodimethylamine-mediated formation of oxidized and methylated dna bases in a cytochrome P450 2E1 expressing cell line. *Chem Res Toxicol*. 2001; 14: 562-566.
- Lipscomb JC, Garrett CM, Snawder JE. Cytochrome P450-dependent metabolism of trichloroethylene: interindividual differences in humans. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1997; 142: 311-318.
- Lieber CS. Susceptibility to alcohol-related liver injury. *Alcohol Alcohol Suppl*. 1994; 2: 315-326.
- Lieber CS. Cytochrome P-4502E1: Its physiological and pathological role. *Physiol Rev*. 1997; 77: 517-544.
- Lieber CS. Microsomal ethanol-oxidizing system (MEOS): the first 30 years (1968-1998)-a review. *Alcohol Clin Exp Res*. 1999; 23(6): 991-1007.
- Liu SY, Gonzalez FJ. Role of the liver-enriched transcription factor HNF-1 alpha in expression of the CYP2E1 gene. *DNA Cell Biol*. 1995; 14: 285-293.
- Lu H, Meng X, Yang CS. Enzymology of methylation of tea catechins and inhibition of catechol-O-methyltransferase by (-)-epigallocatechin gallate. *Drug Metab Dispos*. 2003; 31(5): 572-579.
- Lu R, Fan HR, Gao J, Zeng Y. Effect of ginseng extract and ginsenosides on activity of cytochrome P450. *Asian Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. 2005; 5: 17-24.
- Madan A, Graham RA, Carroll KM, Mudra DR, Burton LA, Krueger LA, Downey AD, Czerwinski M, Forster J, Ribadeneira MD, Gan LS, LeCluyse EL, Zech K, Robertson P Jr, Koch P, Antonian L, Wagner G, Yu L, Parkinson A. Effects of prototypical microsomal enzyme inducers on cytochrome P450 expression in cultured human hepatocytes. *Drug Metab Dispos*. 2003; 31(4): 421-431.
- Magnusson MO, Dahl ML, Cederberg J, Karlsson MO, Sandström R. Pharmacodynamics of carbamazepine-mediated induction of CYP3A4, CYP1A2, and Pgp as assessed by probe substrates midazolam, caffeine, and digoxin. *Clin Pharmacol Ther*. 2008; 84(1): 52-62.
- Maliakal PP, Coville PF, Wanwimolruk S. Tea consumption modulates hepatic drug metabolizing enzymes in Wistar rats. *J Pharm Pharmacol*. 2001; 53(4): 569-577.
- Maliakal P, Sankpal UT, Basha R, Maliakal C, Ledford A, Wanwimolruk S. Relevance of drug metabolizing enzyme activity modulation by tea polyphenols in the inhibition of esophageal tumorigenesis. *Med Chem*. 2011; 7(5): 480-487.
- Markowitz JS, Devane CL, Chavin KD, Taylor RM, Ruan Y, Donovan JL. Effects of garlic (*Allium sativum* L.) supplementation on cytochrome P450 2D6 and 3A4 activity in healthy volunteers. *Clin Pharmacol Ther*. 2003; 74(2): 170-177.
- Martignoni M, Grothhuis GMM, de Kanter R. Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2006; 2: 875-894.
- Martinez C, Albet C, Agundez JA, Herrero E, Carrillo JA, Marquez M, Benitez J, Ortiz JA. Comparative in vitro and in vivo inhibition of cytochrome P450 CYP1A2, CYP2D6, and CYP3A by H₂-receptor antagonists. *Clin Pharmacol Ther*. 1999; 65: 369-376.
- Martini R, Ingelman-Sundberg M, Murray M. Pretranslational and posttranslational regulation of rat hepatic CYPs 3A2 and 2E1 by disulfiram. *Biochem Pharmacol*. 1997; 54(12): 1323-1329.

- Masubuchi N, Li AP, Okazaki O. An evaluation of the cytochrome P450 induction potential of pantoprazole in primary human hepatocytes. *Chem Biol Interact.* 1998; 114(1-2): 1-13.
- Matthews J, Gustafsson JL. Estrogen receptor and aryl hydrocarbon receptor signaling pathways. *Nucl Recept Signal.* 2006; 4.
- McKinnon RA, Evans AM. Cytochrome P450. *Clinically Significant Drug Interactions.* Aust J Hosp Pharm. 2000; 30: 146.
- Medjakovic S, Mueller M, Jungbauer A. Potential Health-modulating Effects of Isoflavones and Metabolites via Activation of PPAR and AhR. *Nutrients.* 2010; 2(3): 241-279.
- Meunier V, Bourrie' M, Julian B, Marti E, Guillou F, Berger Y, Fabre G. Expression and induction of CYP1A1/1A2, CYP2A6 and CYP3A4 in primary cultures of human hepatocytes: a 10-year follow up. *Xenobiotica.* 2000; 30: 589-607.
- Michaud J, Dubé P, Naud J, Leblond FA, Desbiens K, Bonnardeaux A, Pichette V. Effects of serum from patients with chronic renal failure on rat hepatic cytochrome P450. *Br J Pharmacol.* 2005; 144(8): 1067-1077.
- Modarai M, Gertsch J, Suter A, Heinrich M, and Kortenkamp A. Cytochrome P450 inhibitory action of Echinacea preparations differs widely and co-varies with alkylamide content. *J Pharm Pharmacol.* 2007; 59: 567-573.
- Morgan ET. Regulation of cytochromes P450 during inflammation and infection. *Drug Metab Rev.* 1997; 29: 1129-1188.
- Morimoto T, Kotegawa T, Tsutsumi K, Ohtani Y, Imai H, Nakano S. Effect of St. John's wort on the pharmacokinetics of theophylline in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol.* 2004; 44: 95-101.
- Mukai R, Satsu H, Shimizu M, Ashida H. Inhibition of P-glycoprotein enhances the suppressive effect of kaempferol on transformation of the aryl hydrocarbon receptor. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2009; 73(7): 1635-1639.
- Munday R, Munday CM. Induction of phase II enzymes by aliphatic sulfides derived from garlic and onions: an overview. *Methods Enzymol.* 2004; 382: 449-456.
- Muntane-Relat J, Ourlin JC, Domergue J, Maurel P. Differential effects of cytokines on the inducible expression of CYP1A1, CYP1A2, and CYP3A4 in human hepatocytes in primary culture. *Hepatology.* 1995; 22: 1143-1153.
- Murray M. P450 enzymes: inhibition mechanisms, genetic regulation and effect of liver disease. *Clin Pharmacokinet.* 1992; 23: 132-146.
- Murray IA, Krishnegowda G, DiNatale BC, Flaveny C, Chiaro C, Lin JM, Sharma AK, Amin S, Perdew GH. Development of a selective modulator of aryl hydrocarbon (Ah) receptor activity that exhibits anti-inflammatory properties. *Chem Res Toxicol.* 2010; 23(5): 955-966.
- Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Schafer-Korting M: *Farmakologia i toksykologia.* Wydawnictwo Medyczne Urban & Partner, Wrocław, 2004.
- Nakajima T, Elovaara E, Okino T, Gelboin HV, Klockars M, Riihimäki V, Aoyama T, Vainio H. Different contributions of cytochrome P450 2E1 and P450 2B1/2 to chloroform hepatotoxicity in rat. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1995; 133: 215-222.

- Nakajima M, Yoshida R, Shimada N, Yamazaki H, Yokoi T. Inhibition and inactivation of human cytochrome P450 isoforms by phenethyl isothiocyanate. *Drug Metab Dispos.* 2001; 29(8):1110-1113.
- Narayanan GA, Murray IA, Krishnegowda G, Amin SG, Perdew GH. Selective Ah receptor modulator mediated repression of CD55 expression induced by cytokine exposure. *J Pharmacol Exp Ther.* 2012 [W druku].
- Nebert DW, Roe AL, Dieter MZ, Solis WA, Yang Y, Dalton TP. Role of aromatic hydrocarbon receptor and (Ah) gene battery in the oxidative stress response, cell cycle control and apoptosis. *Biochem Pharmacol.* 2000; 59, 65-85.
- Nebert DW, Dalton TP, Okey AB, Gonzalez FJ. Role of aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of the CYP1 enzymes in environmental toxicity and cancer. *J Biol Chem.* 2004; 279(23): 23847-23850.
- Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, Stegeman JJ, Feyereisen R, Waxman DJ, Waterman MR, Gotoh O, Coon MJ, Estabrook RW, Gunsalus IC, Nebert DW. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* 1996; 6: 1-42.
- Nikaidou S, Ishizuka M, Maeda Y, Hara Y, Kazusaka A, Fujita S. Effect of components of green tea extracts, caffeine and catechins on hepatic drug metabolizing enzyme activities and mutagenic transformation of carcinogens. *Jpn J Vet Res.* 2005; 52(4): 185-192.
- Niwattisaiwong N, Luo XX, Coville PF, Wanwimolruk S. Effects of Chinese, Japanese and Western tea on hepatic P450 enzyme activities in rats. *Drug Metabol Drug Interact.* 2004; 20(1-2): 43-56.
- Njoku D, Laster MJ, Gong DH, Eger EI, Reed GF, Martin JL. Biotransformation of halothane, enflurane, isoflurane, and desflurane to trifluoroacetylated liver proteins: association between protein acylation and hepatic injury. *Anesth Analg.* 1997; 84(1): 173-178.
- Norlin M, Chiang JY. Transcriptional regulation of human oxysterol 7 α -hydroxylase by sterol response element binding protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004; 316 (1): 158-164.
- Nowak G. Surowce roślinne stosowane w chorobach układu krążenia i serca. *Herba Pol* 2009a; 55(2): 100-120.
- Nowak G. Surowce roślinne stosowane w wyczerpaniu psychofizycznym i stresie. *Herba Pol* 2009b; 55(2): 88-99.
- Obach RS. Inhibition of human cytochrome P450 enzymes by constituents of St. John's Wort, an herbal preparation used in the treatment of depression. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000; 294: 88-95.
- Obase Y., Shimoda T., Kawano T. i wsp.: Polymorphisms in the CYP1A2 gene and theophylline metabolism in patients with asthma. *Clin Pharmacol Ther.*, 2003; 73: 468.
- Ohashi K, Sakamoto K, Sudo T, Tateishi T, Fujimura A, Shiga T, Ebihara A. Effects of diltiazem and cimetidine on theophylline oxidative metabolism. *J Clin Pharmacol.* 1993; 33(12): 1233-1237.
- Oinonen T, Saarikoski S, Husgafvel-Pursiainen K, Hirvonen A, Lindros KO. Pretranslational induction of cytochrome P4501A enzymes by beta-naphthoflavone and 3-methylcholanthrene occurs in different liver zones. *Biochem Pharmacol.* 1994; 48(12): 2189-2197
- Omura T. Forty years of Cytochrome P450. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999; 266: 690-698.
- Ostrowska J. Herbaty - naturalne źródło antyoksydantów. *Gazeta Farmaceutyczna.* 2008; 1: 46-50.

- Ożarowski M, Mrozikiewicz PM. The interactions of St John's Wort with synthetic drugs. I International Workshop Interaction between herbal and synthetic drugs. Advantages and risks. XV International Congress of the Polish Pharmacological Society. 2004 September 12-14, Poznań.
- Ożarowski M, Dubiel A, Niewiński P, Mścisz A, Mrozikiewicz P. Profil bezpieczeństwa preparatów zawierających przetwory z jeżówek – systematyczna analiza interakcji i działań niepożądanych. *Herba Pol.* 2006; 52(3): 102-103.
- Palermo CM, Westlake CA, Gasiewicz TA. Epigallocatechin gallate inhibits aryl hydrocarbon receptor gene transcription through an indirect mechanism involving binding to a 90 kDa heat shock protein. *Biochemistry.* 2005; 44: 5041–5052.
- Park KS, Sohn DH, Veech RL, Song BJ. Translational activation of ethanol-inducible cytochrome P450 (CYP2E1) by isoniazid. *Europ J Pharmacol: Environ Toxicol Pharmacol.* 1993; 248: 7-14.
- Park KA, Kweon S, Choi H. Anticarcinogenic effect and modification of cytochrome P450 2E1 by dietary garlic powder in diethylnitrosamine-initiated rat hepatocarcinogenesis. *J Biochem Mol Biol.* 2002; 35(6): 615-622.
- Pascussi JM, Gerbal-Chaloin S, Pichard-Garcia L, Daujat M, Fabre JM, Maurel P, Vilarem MJ. Interleukin-6 negatively regulates the expression of pregnane X receptor and constitutively activated receptor in primary human hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000; 274(3): 707-713.
- Pascussi JM, Gerbal-Chaloin S, Drocourt L, Maurel P, Vilarem MJ. The expression of CYP 2B6, CYP2C9 and CYP3A4 genes: a tangle of networks of nuclear and steroid receptors. *Biochim Biophys Acta.* 2003; 1619: 234–253.
- Patten, C.J. Thomas PE, Guy RL, Lee M, Gonzalez FJ, Guengerich FP, Yang CS. Cytochrome P450 enzymes involved in acetaminophen activation by rat and human liver microsomes and their kinetics. *Chem Res Toxicol.* 1993; 6: 511-518.
- Pavek P, Dvorak Z. Xenobiotic-induced transcriptional regulation of xenobiotic metabolizing enzymes of the cytochrome P450 superfamily in human extrahepatic tissues. *Curr Drug Metab.* 2008; 9(2): 129-143.
- Pelkonen O, Mäenpää J, Taavitsainen P, Rautio A and Raunio H. Inhibition and induction of human cytochrome P450 (CYP) enzymes. *Xenobiotica.* 1998; 28: 1203-1253.
- Peng HM, Coon MJ. Promoter function and the role of cytokines in the transcriptional regulation of rabbit CYP2E1 and CYP2E2. *Arch Biochem Biophys.* 2000; 382: 129-137.
- Peters WH, Kremers PG. Cytochromes P-450 in the intestinal mucosa of Man. *Biochem Pharmacol.* 1989; 38: 1535-1538.
- Pikuleva IA. Cytochrome P450s and cholesterol homeostasis. *Pharmacol Ther.* 2006; 112 (3): 761-773.
- Poloyac SM, Tortorici MA, Przychodzin DI, Reynolds RB, Xie W, Frye RF, Zemaitis MA. The effect of isoniazid on CYP2E1- and CYP4A-mediated hydroxylation of arachidonic acid in the rat liver and kidney. *Drug Metab Dispos.* 2004; 32(7): 727-733.
- Pongratz I, Antonsson C, Whitelaw ML, Poellinger L. Role of the PAS domain in regulation of dimerization and DNA binding specificity of the dioxin receptor. *Mol Cell Biol.* 1998; 18: 4079-4088.

- Porter TD, Coon MJ. Cytochrome P-450. Multiplicity of isoforms, substrates, and catalytic and regulatory mechanisms. *J Biol Chem.* 1991; 266(21): 13469-13472.
- Powell H, Kitteringham NR, Pirmohamed M, Smith DA, Park BK. Expression of cytochrome P4502E1 in human liver: assessment by mRNA, genotype and phenotype. *Pharmacogenetics.* 1998; 8(5): 411-421.
- Pratt-Hyatt M, Lin HL, Hollenberg PF. Mechanism-based inactivation of human CYP2E1 by diethyldithiocarbamate. *Drug Metab Dispos.* 2010; 38(12): 2286-2292.
- Qin G, Ning Y, Lotlikar PD. Chemoprevention of aflatoxin B1-initiated and carbon tetrachloride-promoted hepatocarcinogenesis in the rat by green tea. *Nutr Cancer.* 2000; 38(2): 215-222.
- Quattrochi LC, Vu T, Tukey RH. The human CYP1A2 gene and induction by 3-methylcholanthrene. A region of DNA that supports AH-receptor binding and promoter-specific induction. *J Biol Chem.* 1994; 269(9): 6949-6954.
- Rajaraman G, Yang G, Chen J, Chang TK. Modulation of CYP1B1 and CYP1A1 gene expression and activation of aryl hydrocarbon receptor by Ginkgo biloba extract in MCF-10A human mammary epithelial cells. *Can J Physiol Pharmacol.* 2009; 87(9): 674-683.
- Raner G, Cornelious S, Moulick K, Wang Y, Mortenson A, Cech NB. Effects of herbal products and their constituents on human cytochrome P4502E1 activity. *Food Chem Toxicol.* 2007, 45: 2359-2365.
- Raucy JL, Lasker JM, Lieber CS, Black M. Acetaminophen activation by human liver cytochrome P450III E1 and P450IA2. *Arch Biochem Biophys.* 1989; 271: 270-283.
- Raucy JL, Kraner JC, Lasker JM. Bioactivation of halogenated hydrocarbons by cytochrome P4502E1. *Crit Rev Toxicol.* 1993; 23(1): 1-20.
- Reid JM, Kuffel MJ, Miller JK, Rios R, Ames MM. Metabolic activation of dacarbazine by human cytochromes P450: the role of CYP1A1, CYP1A2, and CYP2E1. *Clin Cancer Res.* 1999; 5: 2192-2197.
- Rendic S. Summary of information on human CYP enzymes: human P450 metabolism data. *Drug Metab Rev.* 2002; 34: 83-448.
- Renton KW. Alteration of drug biotransformation and elimination during infection and inflammation. *Pharmacol Ther.* 2001; 92: 147-163.
- Rich KJ, Boobis AR. Expression and inducibility of P450 enzymes during liver ontogeny. *Microsc Res Tech.* 1997; 39: 424-435.
- Riddick DS, Lee C, Bhatena A, Timsit YE, Cheng PY, Morgan ET, Prough RA, Ripp SL, Miller KK, Jahan A, Chiang JY. Transcriptional suppression of cytochrome P450 genes by endogenous and exogenous chemicals. *Drug Metab Dispos.* 2004; 32(4): 367-375.
- Rietz B, Belagyi J, Török B, Jacob R. The radical scavenging ability of garlic examined in various models. *Boll Chim Farm.* 1995; 134(2): 69-76.
- Riordan S, Williams R. Alcohol exposure and paracetamol-induced hepatotoxicity. *Add Biol.* 2002; 7: 191-206.
- Robertson P Jr, Hellriegel ET. Clinical pharmacokinetic profile of modafinil. *Clin Pharmacokinet.* 2003; 42(2): 123-137.

- Ronis MJ, Rowlands JC, Hakkak R, Badger TM. Inducibility of hepatic CYP1A enzymes by 3-methylcholanthrene and isosafrole differs in male rats fed diets containing casein, soy protein isolate or whey from conception to adulthood. *J Nutr.* 2001; 131: 1180–1188.
- Rosado MF. Thrombosis of a prosthetic aortic valve disclosing a hazardous interaction between warfarin and a commercial ginseng product. *Cardiology.* 2003; 99(2): 111.
- Rostkowska K, Zwierz K, Rózański A, Moniuszko-Jakoniuk J, Roszczenko A. Formation and Metabolism of N-Nitrosamines. *Polish J Environ Studies.* 1998; 7 (6): 321-325.
- Rowlands JC, He L, Hakkak R, Ronis MJ, Badger TM. Soy and whey proteins downregulate DMBA-induced liver and mammary gland CYP1 expression in female rats. *J Nutr.* 2001; 131: 3281-3287.
- Rushing SR, Denison MS. The silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptors can interact with the aryl hydrocarbon (Ah) receptor but fails to repress Ah receptor-dependent gene expression. *Arch Biochem Biophys.* 2002; 403: 189-201.
- Russell DW. The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis. *Annu Rev Biochem.* 2003; 72: 137-174.
- Safe S, Wormke M. Inhibitory aryl hydrocarbon receptor-estrogen receptor α cross-talk and mechanisms of action. *Chem Res Toxicol.* 2003; 16: 807-816.
- Sakaguchi M, Mihara K, Sato R. A short amino-terminal segment of microsomal cytochrome P450 functions both as an insertion signal and as a stop-transfer sequence. *EMBO J.* 1987; 6: 2425-2431.
- Sakaki T., Kagawa N., Yamamoto K., Inouye K. Metabolism of vitamin D3 by cytochromes P450. *Front Biosci.* 2005; 10, 119-134.
- Sakuma T, Ohtake M, Katsurayama Y, Jarukamjorn K, Nemoto N. Induction of CYP1A2 by phenobarbital in the livers of aryl hydrocarbon-responsive and -nonresponsive mice. *Drug Metab Dispos.* 1999; 27(3): 379-384.
- Salmela KS, Kessova IG, Tsyrlow IB, Lieber CS. Respective roles of human cytochrome P-450E1, 1A2, and 3A4 in the hepatic microsomal ethanol oxidizing system. *Alcohol Clin Exp Res.* 1998; 22(9):2125-2132.
- Sansen S, Yano JK, Reynald RL, Schoch GA, Griffin KJ, Stout CD, Johnson EF. Adaptations for the Oxidation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Exhibited by the Structure of Human P450 1A2. *J Biol Chem.* 2007; 282: 14348-14355.
- Schiffman MH, Felton JS. Fried food and the risk of colon cancer. *Am J Epidemiol.* 1990; 131: 376-378.
- Sevrioukova IF, Li H, Poulos TL. Crystal Structure of Putidaredoxin Reductase from *Pseudomonas putida*, the final structural component of the Cytochrome P450 Monooxygenase. *J Mol Biol.* 2004; 336: 889-902.
- Shibayama Y, Ikeda R, Motoya T, Yamada K. St. John's Wort (*Hypericum perforatum*) induces overexpression of multidrug resistance protein 2 (MRP2) in rats: a 30-day ingestion study. *Food Chem Toxicol.* 2004; 42(6): 995-1002.
- Shih H, Pickwell GV, Quattrochi LC. Differential effects of flavonoid compounds on tumor promoter-induced activation of the human CYP1A2 enhancer. *Arch Biochem Biophys.* 2000; 373(1): 287-294.

- Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, Inui Y, Guengerich FP. Interindividual variation in human liver cytochrome P450 enzymes involved in oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J Pharmacol Exp Ther.* 1994; 270: 414-423.
- Shimada T, Hayes CL, Yamazaki H, Amin S, Hecht SS, Guengerich FP, Sutter TR. Activation of chemically diverse procarcinogens by human cytochrome P-450 1B1. *Cancer Res.* 1996; 56(13): 2979-2984.
- Shimada T. Xenobiotic-Metabolizing Enzymes Involved in Activation and Detoxification of Carcinogenic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons *Drug Metab Pharmacokinet.* 2006; 21(4): 257-276.
- Shinozuka K, Umegaki K, Kubota Y, Tanaka N, Mizuno H, Yamauchi J, Nakamura K, Kunitomo M. Feeding of Ginkgo biloba extract (GBE) enhances gene expression of hepatic cytochrome P-450 and attenuates the hypotensive effect of nifedipine in rats. *Life Sci.* 2002; 70: 2783-2792.
- Shweitz S. Drug metabolizing enzyme: mechanism and function. *Curr Drug Met.* 2000; 1: 107-132.
- Singhal R, Badger TM, Ronis MJ. Reduction in 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced hepatic cytochrome-P450 1A1 expression following soy consumption in female rats is mediated by degradation of the aryl hydrocarbon receptor. *J Nutr.* 2007; 137(1): 19-24.
- Singhal R, Badger TM, Ronis MJ. Rats fed soy protein isolate (SPI) have impaired hepatic CYP1A1 induction by polycyclic aromatic hydrocarbons as a result of interference with aryl hydrocarbon receptor signaling. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2008; 227(2): 275-283.
- Singhal R, Shankar K, Badger TM, Ronis MJ. Hepatic gene expression following consumption of soy protein isolate in female Sprague-Dawley rats differs from that produced by 17 β -estradiol treatment. *J Endocrinol.* 2009; 202(1): 141-152.
- Sohn OS, Surace A, Fiala ES, Richie JP Jr, Colosimo S, Zang E, Weisburger JH. Effects of green and black tea on hepatic xenobiotic metabolizing systems in the male F344 rat. *Xenobiotica.* 1994; 24(2): 119-127.
- Song BJ, Gelboin HV, Park SS, Yang CS, Gonzalez FJ. Complementary DNA and protein sequences of ethanol-inducible rat and human cytochrome P-450s. Transcriptional and post-transcriptional regulation of the rat enzyme. *J Biol Chem.* 1986; 261: 16689-16697.
- Song JY, Akhalaia M, Platonov A, Kim HD, Jung IS, Han YS, Yun YS. Effects of polysaccharide ginsan from Panax ginseng on liver function. *Arch Pharm Res.* 2004; 27(5): 531-538.
- Song WO, Chun OK, Hwang I, Shin HS, Kim BG, Kim KS, Lee SY, Shin D and Lee SG. Soy isoflavones as safe functional ingredients. *J Med Food.* 2007; 10: 571-580.
- Sotaniemi EA, Arranto AJ, Pelkonen O, Pasanen M. Age and cytochrome P450-linked drug metabolism in humans: an analysis of 226 subjects with equal histopathological conditions. *Clin Pharmacol Ther.* 1997; 61: 331-339.
- Stresser DM, Bailey GS, Williams DE. Indole-3-carbinol and beta-naphthoflavone induction of aflatoxin B1 metabolism and cytochromes P-450 associated with bioactivation and detoxication of aflatoxin B1 in the rat. *Drug Metab Dispos.* 1994; 22: 383-391.
- Strzelecka H, Kowalski J. *Encyklopedia zielarstwa i ziołolecznictwa.* Wydawnictwo naukowe PWN. Warszawa, 2000.

- Sugimura T. Nutrition and dietary carcinogens. *Carcinogenesis*. 2000; 21(3): 387-395.
- Tada Y, Kagota S, Kubota Y, Nejime N, Nakamura K, Kunitamo M, Shinozuka K. Long-term feeding of Ginkgo biloba extract impairs peripheral circulation and hepatic function in aged spontaneously hypertensive rats. *Biol Pharm Bull*. 2008; 31: 68-72.
- Taimi M., Helvig C, HC, Wisniewski J, Ramshaw H, White J, Amad M, Korczak B, Petkovich M. A novel human cytochrome P450, CYP26C1, involved in metabolism of 9-cis and all-trans isomers of retinoic acid. *J Biol Chem*. 2004; 279(1): 77-85.
- Tanaka E. In vivo age related changes in hepatic drug oxidising capacity in humans. *Clin Pharmacol Ther*. 1983; 23: 247-255.
- Tang J, Sun J, Zhang Y, Li L, Cui F, He Z. Herb-drug interactions: Effect of Ginkgo biloba extract on the pharmacokinetics of theophylline in rats. *Food Chem Toxicol*. 2007; 45(12): 2441-2445.
- Tassaneeyakul W, Birkett DJ, Veronese ME, McManus ME, Tukey RH, Quattrochi LC, Gelboin HV, Miners JO. Specificity of substrate and inhibitor probes for human cytochromes P450 1A1 and 1A2. *J Pharmacol Exp Ther*. 1993; 265(1): 401-407.
- Tijet N, Boutros PC, Moffat ID, Okey AB, Tuomisto J, Pohjanvirta R. Aryl hydrocarbon receptor regulates distinct dioxin-dependent and dioxin-independent gene batteries. *Mol Pharmacol*. 2006; 69(1): 140-153.
- Tomaszewski P, Kubiak-Tomaszewska G, Pachecka J. Cytochrome P450 polymorphism – molecular, metabolic and pharmacogenetic aspects. II. Participation of CYP isoenzymes in the metabolism of endogenous substances and drugs. *Acta Poloniae Pharmaceutica*. 2008; 65: 307-318.
- Tredger JM, Stoll S. Cytochromes P450 – their impact on drug treatment. *Hospital Pharm*. 2002; 9: 167-173.
- Turesky RJ, Guengerich FP, Guillouzo A, Langouet S. Metabolism of heterocyclic aromatic amines by human hepatocytes and cytochrome P4501A2. *Mutat Res*. 2002; 506-507, 187-195.
- Turesky RJ. Formation and biochemistry of carcinogenic heterocyclic aromatic amines in cooked meats. *Toxicol Lett*. 2007; 168: 219-227.
- Umeno M, McBride OW, Yang CS, Gelboin HV, Gonzalez FJ. Human ethanol-inducible P450IIE1: complete gene sequence, promoter characterization, chromosome mapping, and cDNA-directed expression. *Biochemistry*. 1988; 27: 9006-9013.
- Vesell ES. The liver. *Biology and Pathobiology*. Eds. Arias IM, Jakoby WB, Popper H, Schachter D, Shafritz DA. *Pharmacogenetics*. 1988; 213-234.
- Villard PH, Seree EM, Re JL. Effects of Tobacco smoke on the gene expression of the Cyp1a, Cyp2b, Cyp2e and Cyp3a subfamilies in mouse liver and lung: Relation to single strand breaks of DNA. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1998; 148: 195-204.
- Vistisen K, Loft S, Olsen JH, Vallentin S, Ottesen S, Hirsch FR, Poulsen HE. Low CYP1A2 activity associated with testicular cancer. *Carcinogenesis*. 2004; 25: 923-929.
- von Moltke LL, Greenblatt DJ, Duan SX, Schmider J, Kudchadker L, Fogelman SM, Harmatz JS, Shader RI. Phenacetin O-deethylation by human liver microsomes in vitro: inhibition by chemical probes, SSRI antidepressants, nefazodone and venlafaxine. *Psychopharmacology* 1996; 128(4): 398-407.

- von Moltke LL, Weemhoff JL, Bedir E, Khan IA, Harmatz JS, Goldman P, Greenblatt DJ. Inhibition of human cytochromes P450 by components of Ginkgo biloba. *J Pharm Pharmacol*. 2004; 56: 1039-1044.
- Vrzal R, Ulrichová J, Dvorač Z. Aromatic hydrocarbon receptor status in the metabolism of xenobiotics under normal and pathophysiological conditions. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2004; 148(1): 3-10.
- Wadelius M, Darj E, Frenne G, Rane A. Induction of CYP2D6 in pregnancy. *Clin Pharmacol Ther*. 1997; 62(4): 400-407.
- Wargovich MJ. Diallylsulfide and allylmethylsulfide are uniquely effective among organosulfur compounds in inhibiting CYP2E1 protein in animal models. *J Nutr*. 2006; 136(3): 832-834.
- Wattenberg LW, Leong JL. Inhibition of the carcinogenic action of benzo(a)pyrene by flavones. *Cancer Res*. 1970; 30: 1922-1925.
- Waxman DJ. P450 gene induction by structurally diverse xenochemicals: central role of nuclear receptors CAR, PXR and PPAR. *Arch Biochem Biophys*. 1999; 369: 11-23.
- Wenk M, Todesco L, Krähenbühl S. Effect of St John's wort on the activities of CYP1A2, CYP3A4, CYP2D6, N-acetyltransferase 2, and xanthine oxidase in healthy males and females. *Br J Clin Pharmacol*. 2004; 57(4): 495-499.
- Whitlock JPJ. Induction of cytochrome P4501A1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1999; 39: 103-125.
- Williams SN, Shih H, Guenette DK, Brackney W, Denison MS, Pickwell GV, Quattrochi LC. Comparative studies on the effects of green tea extracts and individual tea catechins on human CYP1A gene expression. *Chem Biol Interact*. 2000; 128(3): 211-229.
- Winters DK, Clejan LA, Cederbaum A I. Oxidation of glycerol to formaldehyde by rat liver microsomes. *Biochem Biophys Res Commun*. 1988; 153: 612-617.
- Winters DK, Cederbaum AI. Time course characterization of the induction of cytochrome P-450 2E1 by pyrazole and 4-methylpyrazole. *Biochim Biophys Acta*. 1992; 1117(1): 15-24.
- Woelkart K, Bauer R. The role of alkaloids as an active principle of echinacea. *Planta Med*. 2007; 73(7): 615-623.
- Wolski T, Ludwiczuk A, Baj T, Głowniak K, Świętek Ł. Rodzaj *Panax* – systematyka, skład chemiczny, działanie i zastosowanie oraz analiza fitochemiczna nadziemnych i podziemnych organów żeń-szenia amerykańskiego – *Panax quinquefolium* L. Cz. I. *Postępy Fitoterapii*. 2008; 2: 96-114.
- Wong FW, Chan WY, Lee SS. Resistance to carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice which lack CYP2E1 expression. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1998; 153: 109-118.
- Wrighton SA, Stevens JC. The human hepatic cytochromes P450 involved in drug metabolism. *Crit Rev Toxicol*. 1992; 22(1): 1-21.
- Xiaoguang C, Hongyan L, Xiaohong L, Zhaodi F, Yan L, Lihua T, Rui H. Cancer chemopreventive and therapeutic activities of red ginseng. *J Ethnopharmacol*. 1998; 60: 71-78.
- Xu M, Bailey AC, Hernaez JF, Taoka CR, Schut HA, Dashwood RH. Protection by green tea, black tea, and indole-3-carbinol against 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline-induced DNA adducts and colonic aberrant crypts in the F344 rat. *Carcinogenesis*. 1996; 17(7): 1429-1434.

- Yamreudeewong W, DeBisschop M, Martin LG, Lower DL. Potentially significant drug interactions of class III antiarrhythmic drugs. *Drug Saf.* 2003; 26(6): 421-438.
- Yang ChS, Brady JF, Hong J-Y. Dietary effects on cytochrome P450, xenobiotic metabolism, and toxicity. *FASEB J.* 1992; 6: 737-744.
- Yang CS, Smith TJ, Hong JY. Cytochrome P-450 enzymes as targets for chemoprevention against chemical carcinogenesis and toxicity: opportunities and limitations. *Cancer Res* 1994; 54: 1982-1986.
- Yang CS, Chen L, Lee M-J, Landau JM. Effects of tea on carcinogenesis in animal models and humans. *Adv Exp Med Biol.* 1996; 401: 51-61.
- Yang CS, Chung JY, Jang G, Chabra SK, Lee MJ. Tea and tea polyphenols in cancer prevention. *J Nutr.* 2000; 130: 472-478.
- Yang CS. Inhibition of carcinogenesis and toxicity by dietary constituents. *Adv Exp Med Biol.* 2001; 500: 541-550.
- Yang H, Namkung M, Juchan M. Immunodetection, immunoinhibition, immunoquantitation and biochemical analysis of cytochrome P4501A1 in Tissue of the rat during the progression of organogenesis. *Biochem Pharmacol.* 1989; 38: 4027-4036.
- Yang X-F, Wang N-P, Lu W-H, Zeng F-D. Effects of Ginkgo biloba extract and tanshinone on cytochrome P-450 isozymes and glutathione transferase in rats. *Acta Pharmacol Sin.* 2003; 24 (10): 1033-1038.
- Yang SP, Raner GM. Cytochrome P450 expression and activities in human tongue cells and their modulation by green tea extract. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2005; 202(2): 140-150.
- Yang XF, Wang NP, Zeng FD. Effects of ginkgolides on gene expression of hepatic cytochrome P-450 in rats. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.* 2005; 30(13): 1009-1013.
- Yokouchi Y, Muguruma M, Moto M, Takahashi M, Jin M, Kenmochi Y, Kohno T, Dewa Y, Mitsumori K. Molecular Analysis on the Possible Mechanism of β -Naphthoflavone-Induced Hepatocarcinogenesis in Rats. *J Toxicol Pathol.* 2007; 20: 29-37.
- Yoshinari K, Ueda R, Kusano K, Yoshimura T, Nagata K, Yamazoe Y. Omeprazole transactivates human CYP1A1 and CYP1A2 expression through the common regulatory region containing multiple xenobiotic-responsive elements. *Biochem Pharmacol.* 2008; 76(1): 139-145.
- Yu CT, Chen J, Teng XW, Tong V, Chang TK. Lack of evidence for induction of CYP2B1, CYP3A23, and CYP1A2 gene expression by Panax ginseng and Panax quinquefolius extracts in adult rats and primary cultures of rat hepatocytes. *Drug Metab Dispos.* 2005; 33(1): 19-22.
- Yue J, Peng RX, Yang J, Kong R, Liu J. CYP2E1 mediated isoniazid-induced hepatotoxicity in rats. *Acta Pharmacol Sin.* 2004; 25(5): 699-704.
- Yun TK, Yun YS, Han IW. Anticarcinogenic effect of long-term oral administration of red ginseng on newborn mice exposed to various chemical carcinogens. *Cancer Detect Prev.* 1983; 6: 515-525.
- Zadoyan G, Rokitta D, Klement S, Dienel A, Hoerr R, Gramatté T, Fuhr U. Effect of Ginkgo biloba special extract EGb 761® on human cytochrome P450 activity: a cocktail interaction study in healthy volunteers. *Eur J Clin Pharmacol.* 2012; 68(5): 553-560.

Zeng T, Zhang CL, Song FY, Han XY, Xie KQ. The modulatory effects of garlic oil on hepatic cytochrome P450s in mice. *Hum Exp Toxicol.* 2009; 28(12): 777-783.

Zhao LZ, Huang M, Chen J, Ee PL, Chan E, Duan W, Guan YY, Hong YH, Chen X, Zhou S. Induction of propranolol metabolism by Ginkgo biloba extract EGb 761 in rats. *Curr Drug Metab.* 2006; 7(6): 577-587.

Zou L, Harkey MR, Henderson GL. Effects of herbal components on cDNA-expressed cytochrome P450 enzyme catalytic activity. *Life Sci.* 2002; 71(13): 1579-1589.

Zuber R, Anzenbacherová E, Anzenbacher PJ. Cytochromes P450 and experimental models of drug metabolism. *Cell Mol Med.* 2002; 6(2): 189-198.