

UNIwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
Katedra i Zakład Farmacji Klinicznej i Biofarmacji
Pracownia Farmakogenetyki Doświadczalnej

ANNA BOGACZ

**OCENA WPŁYWU WYBRANYCH ROŚLIN LECZNICZYCH
NA POZIOM TRANSKRYPCJI GENÓW CYP3A1 I CYP2D2
W BADANIACH *IN VIVO***

ROZPRAWA DOKTORSKA

PROMOTOR: Doc. dr hab. n. med. Przemysław M. Mrozikiewicz

POZNAŃ 2010

*Składam serdeczne podziękowania mojemu Promotorowi
Panu Doc. dr hab. n. med. Przemysławowi M. Mrozkiewiczowi
za opiekę merytoryczną, kreatywne wskazówki,
poświęcony czas i wyrozumiałość
oraz za stworzenie doskonałych warunków pracy.*

*Wszystkim Pracownikom Zakładu Farmakologii i Biotechnologii
za pomoc, przyjazną atmosferę i wspólnie spędzony czas.*

*Moim Najbliższym
za wszelką pomoc i wyrozumiałość*

Serdecznie dziękuję

*Praca doktorska została wykonana w ramach
projektu badawczego nr N405 023 31/1522
finansowanego przez Ministerstwo Nauki
i Szkolnictwa Wyższego (MNiSW)*

SPIS TREŚCI

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW	6
1. WSTĘP	8
1.1. Wprowadzenie	8
1.2. Biotransformacja leków	10
1.3. Cytochrom P450	14
1.3.1. Mechanizm działania cytochromu P450	18
1.3.2. Reakcje katalizowane przez izoenzymy CYP450	21
1.3.3. Funkcje izoenzymów CYP450	24
1.3.4. Podrodzina CYP3A	27
1.3.4.1. Izoforma CYP3A4	28
1.3.4.2. Kliniczne znaczenie interakcji lekowych z udziałem CYP3A4	31
1.3.5. Podrodzina CYP2D	35
1.3.5.1. Izoforma CYP2D6	35
1.3.5.2. Kliniczne znaczenie interakcji lekowych z udziałem CYP2D6	39
1.4. Regulacja aktywności cytochromu P450	42
1.4.1. Receptory jądrowe	44
1.4.1.1. Receptor pregnanu X (PXR)	48
1.4.1.2. Konstytutywny receptor androstanu (CAR)	53
1.4.1.3. Szlaki sygnalizacji CAR i PXR	55
1.5. Badania eksperymentalne w oparciu o model zwierzęcy (szczur)	57
1.5.1. Podrodzina CYP3A	58
1.5.2. Podrodzina CYP2D	59
2. CELE PRACY	60
3. MATERIAŁY I METODY	61
3.1. Badania <i>in vivo</i>	61
3.1.1. Zwierzęta laboratoryjne	61
3.1.2. Substancje roślinne i wzorcowe zastosowane w modelu <i>in vivo</i>	61
3.1.3. Procedura doświadczenia z wykorzystaniem modelu zwierzęcego	62
3.2. Badania molekularne	64
3.2.1. Roztwory i odczynniki	64
3.2.2. Sprzęt laboratoryjny	65
3.2.3. Izolacja RNA z tkanki wątrobowej	66
3.2.4. Analiza ilościowa i jakościowa RNA	66
3.2.5. Odwrotna transkrypcja	67
3.2.6. PCR w czasie rzeczywistym	68
3.2.7. Rozdział elektroforetyczny	70
3.2.8. Analiza statystyczna	71
4. WYNIKI	72
4.1. Rozdział elektroforetyczny produktów RT-PCR	72
4.2. Ocena ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym dla amplikonu genu referencyjnego	73
4.3. Analiza poziomu transkryptu CYP2D2 w modelu <i>in vivo</i>	75
4.3.1. Ocena ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym dla produktu amplifikacji cDNA CYP2D2	75

4.3.2. Analiza wpływu substancji wzorcowych na poziom transkryptu CYP2D2	76
4.3.3. Analiza wpływu preparatów roślinnych na poziom ekspresji genu CYP2D2	78
4.4. Analiza poziomu transkryptu CYP3A1 w modelu <i>in vivo</i>	79
4.4.1. Ocena ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym dla produktu amplifikacji cDNA CYP3A1	79
4.4.2. Analiza wpływu substancji wzorcowych na poziom transkryptu CYP3A1	81
4.4.3. Analiza wpływu preparatów roślinnych na poziom ekspresji genu CYP3A1	82
4.5. Analiza poziomu transkryptu PXR w modelu <i>in vivo</i>	84
4.5.1. Ocena ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym dla produktu amplifikacji cDNA czynnika PXR	84
4.5.2. Analiza wpływu substancji wzorcowych dla CYP3A1 na poziom transkryptu PXR	85
4.5.3. Analiza wpływu preparatów roślinnych na poziom ekspresji mRNA czynnika PXR	86
4.6. Analiza poziomu transkryptu CAR w modelu <i>in vivo</i>	88
4.6.1. Ocena ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym dla produktu amplifikacji cDNA czynnika CAR	88
4.6.2. Analiza wpływu substancji wzorcowych dla CYP3A1 na poziom transkryptu CAR	89
4.6.3. Analiza wpływu preparatów roślinnych na poziom ekspresji mRNA czynnika CAR	90
4.7. Określenie związku pomiędzy poziomem ekspresji CYP3A1 a receptorami jądrowymi PXR i CAR	92
5. DYSKUSJA	96
5.1. Ocena metody badawczej zastosowanej do pomiaru poziomu ekspresji analizowanych genów w modelu <i>in vivo</i>	96
5.2. Określenie potencjalnych interakcji preparatów roślinnych z lekami syntetycznymi z wykorzystaniem substancji modelowych	97
5.2.1. Interakcje <i>Hypericum perforatum</i> z lekami syntetycznymi	101
5.2.2. Interakcje <i>Echinacea purpurea</i> z lekami syntetycznymi	110
5.2.3. Interakcje <i>Valeriana officinalis</i> z lekami syntetycznymi	114
5.2.4. Interakcje <i>Ginkgo biloba</i> z lekami syntetycznymi	118
5.2.5. Interakcje <i>Panax ginseng</i> z lekami syntetycznymi	125
5.2.6. Interakcje <i>Allium sativum</i> z lekami syntetycznymi	130
5.2.7. Interakcje <i>Glycine max</i> z lekami syntetycznymi	136
5.2.8. Interakcje <i>Camellia sinensis</i> z lekami syntetycznymi	142
5.3. Znaczenie molekularne podłoża interakcji preparatów roślinnych z lekami syntetycznymi	146
6. WNIOSKI	151
7. STRESZCZENIE	152
8. SUMMARY	155
9. LITERATURA	158
SPIS RYCIN I TABEL	187

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

AhR	- ang. <i>aromatic hydrocarbon receptor</i> , receptor węglowodorów aromatycznych
AF-1	- ang. <i>activation function 1</i> , subdomena AF-1 odpowiedzialna za niezależną od ligandu aktywację transkrypcji
AF-2	- ang. <i>activation function 2</i> , subdomena AF-2 odpowiedzialna za aktywność transkrypcyjną zależną od ligandu
CAR	- ang. <i>constitutive androstane receptor</i> , konstytutywny receptor androstanu
cDNA	- komplementarny DNA, jednoniciowa postać DNA, będąca kopią RNA, uzyskana po odwrotnej transkrypcji
CoA	- koaktywator
CoR	- korepresor
CYP	- cytochrom P450
DEPC	- pirowęglan dietylu
dNTP	- deoksyrybonukleotyd
DR	- ang. <i>direct repeat</i> , proste powtórzenie
DTT	- 1,4-ditiotreitol
EDTA	- ang. <i>ethylenediamine tetraacetic acid</i> , kwas etylenodiaminotetraoctowy (wersenian dwusodowy)
EM	- ang. <i>extensive metabolizers</i> , ekstensywni metabolizerzy
ER	- ang. <i>everted repeat</i> , odwrócone palindromy
FAD	- dinukleotyd flawinoadeninowy
GAPDH	- ang. <i>glyceraldehydes phosphate 3-dehydrogenase</i> , dehydrogenaza gliceroaldehydofosforanowa
GR	- ang. <i>glucocorticoid receptor</i> , receptor glukokortykoidowy
GST	- S-transferaza glutationowa
HNF	- ang. <i>hepatocyte nuclear factor</i> , hepatocytowy czynnik jądrowy
INR	- ang. <i>international normalised ratio</i> , międzynarodowy, znormalizowany wskaźnik krzepliwości krwi
KBL	- marker wielkości
LCA	- kwas litocholowy

MDR	- ang. <i>multidrug-resistance gen</i> , gen oporności wielolekowej
mRNA	- informacyjny RNA
MRP	- białko oporności wielolekowej
NADPH	- zredukowany fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego
NK	- ang. <i>natural killer</i> , naturalni zabójcy
NR	- ang. <i>nuclear receptor</i> , receptor jądrowy
OUN	- ang. <i>central nervous system (CNS)</i> , ośrodkowy układ nerwowy
PAH	- wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne
PBREM	- ang. <i>phenobarbital-responsive enhancer module</i> , moduł wzmocnionej odpowiedzi na fenobarbital
PCN	- ang. <i>pregnenolone 16α-carbonitrile</i> , pregnenolon 16 α -karbonitrylu
PCR	- ang. <i>polymerase chain reaction</i> , łańcuchowa reakcja polimerazy PCR
P-gp	- ang. <i>glycoprotein P</i> , glikoproteina P
PM	- ang. <i>poor metabolizers</i> , słabi metabolizerzy,
PXR	- ang. <i>pregnane X receptor</i> , receptor pregnanu X
RE	- ang. <i>response element</i> , element odpowiedzi,
rt-PCR	- ang. <i>real-time polymerase chain reaction</i> , reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym
RXR	- ang. <i>retinoid X receptor</i> , receptor kwasu retinoidowego
SULT	- sulfotransferaza
TBE	- roztwór buforowy (TRIS, kwas borowy, EDTA)
Tris	- trójhydroksymetyloaminometan(2-amino-2-hydroxymetylo-1,3-propanediol)
UTG	- UTP - glukuronylotransferaza
XREM	- ang. <i>xenobiotic-responsive enhancer module</i> , moduł wzmocnionej odpowiedzi na ksenobiotyk

1. WSTĘP

1.1. Wprowadzenie

Interakcje pomiędzy preparatami roślinnymi a lekami syntetycznymi stały się wiodącym przedmiotem intensywnych badań naukowych podejmowanych na całym świecie. Wynika to z faktu, iż systematyczny wzrost zainteresowania preparatami pochodzenia roślinnego oraz częsta polipragmazja wiąże się ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia tego typu interakcji, co przekłada się jednoznacznie na wzrost kosztów leczenia niepożądanych skutków terapii. W związku z tym podejmowane analizy fitochemiczne, toksykologiczne i farmakologiczne powinny być skierowane nie tylko na potwierdzenie skuteczności działania surowców zielarskich, ale również na określeniu profilu ich bezpieczeństwa z uwzględnieniem potencjalnych interakcji z lekami syntetycznymi. Ma to istotne znaczenie, zwłaszcza po integracji Polski z krajami Unii Europejskiej ze względu, iż lek roślinny w UE jest traktowany na takich samych prawach jak lek syntetyczny. W tym aspekcie powyższe stwierdzenie nabiera szczególnego znaczenia w dobie narastania popularności leku roślinnego, ze względu iż fitopreparaty stanowią coraz częściej powszechną formę wspomagania organizmu w przypadku choroby, w okresie rekonwalescencji, jak również pełnią istotną rolę w celach szeroko rozumianej profilaktyki chorób cywilizacyjnych.

Surowce roślinne posiadają charakter wieloskładnikowy, z czego wynika wielokierunkowość ich działania oraz powszechność stosowania w terapii wielu schorzeń i suplementacji diety. Uzupełnienie farmakoterapii lekiem roślinnym może wywierać zróżnicowany wpływ na skuteczność i bezpieczeństwo terapii, stąd zachodzi konieczność prowadzenia badań naukowych zmierzających do oceny surowców roślinnych z uwzględnieniem korzyści w stosunku do ryzyka ich stosowania zwracając uwagę, iż interakcje z udziałem fitopreparatów mogą zachodzić niekiedy z wyższą częstością w porównaniu do stosowanych leków syntetycznych. Skutkiem interakcji mogą być istotne następstwa kliniczne, nasilenie lub obniżenie efektu terapeutycznego przyjmowanych leków, zmiana czasu ich działania, jak również możliwość wystąpienia niebezpiecznych powikłań [Bailey i wsp., 1998; Cook i wsp., 1998]. Dane statystyczne z USA wskazują, iż ryzyko wystąpienia interakcji dotyka 18% dorosłych pacjentów stosujących suplementację lekiem roślinnym i jednocześnie zażywających lek syntetyczny, co stanowi 15 mln osób. W Polsce

dotychczas nie określono skali zjawiska, jednak uznaje się je za równie powszechne. Ważność problemu interakcji podkreśla fakt, iż na podstawie analiz prezentowanych w *Journal of the American Medical Association* wzrasta liczba zgonów w wyniku działań niepożądanych i interakcji pomiędzy stosowanymi lekami syntetycznymi [Lazarou i wsp., 1998; Kee, 2004]. Oceniono, że z tego powodu umiera w USA 140 tysięcy chorych rocznie, u około 20-50% leczonych stwierdza się objawy niepożądane, przy czym u 5% są one na tyle groźne, że wymagają hospitalizacji. W związku z powyższym przy braku pełnej wiedzy na temat zagrożeń wynikających z wzajemnej relacji składników leku syntetycznego i preparatów roślinnych oraz ich bezpiecznego stosowania podczas farmakoterapii, konieczne jest podjęcie badań w kierunku zdefiniowania potencjalnych następstw tego typu interakcji. Możliwe jest to poprzez analizę procesów farmakokinetycznych i farmakodynamicznych z uwzględnieniem wyjaśnienia podłoża molekularnych mechanizmów ich powstawania.

Przedmiotem szerokich badań w kwestii bezpieczeństwa farmakoterapii i jej skuteczności stanowią interakcje leku w fazie farmakokinetycznej i dotyczą głównie etapu biotransformacji z udziałem enzymów mikrosomalnych wątroby z nadrodziny cytochromu P450, które biorą udział głównie w detoksykacji ksenobiotyków, m.in. leków, prokancerogenów, dioksyn oraz składników diety. Aktywność tych enzymów może ulegać modulacji pod wpływem zróżnicowanych substancji egzogennych i endogennych poprzez potencjalny ich wpływ na czynniki transkrypcyjne biorące udział w regulacji ekspresji genów CYP. Dzięki intensywnym badaniom poznano i opisano wiele syntetycznych induktorów i inhibitorów poszczególnych enzymów z nadrodziny CYP450. Dowiedziono również, iż ich ekspresja może być także modulowana poprzez związki aktywne powszechnie stosowanych surowców roślinnych, m.in. *Hypericum perforatum*, *Valeriana officinalis*, *Echinacea purpurea*, *Allium sativum*, *Camellia sinensis*, *Panax ginseng*, *Gingko biloba* oraz *Glycine max*, które mogą istotnie wpływać na skuteczność farmakoterapii. Dotychczas wyszczególniono wiele ważnych klinicznie interakcji, jednak liczne pozostają nadal niewyjaśnione.

Poznanie właściwości farmakokinetycznych leków syntetycznych i preparatów roślinnych stosowanych w leczeniu wielu schorzeń stwarza realną szansę na eliminację lub zminimalizowanie negatywnych interakcji pomiędzy określonymi substancjami aktywnymi, zarówno pochodzenia roślinnego, jak i syntetycznego. W związku z powyższym, wiedza dotycząca interakcji substancji z enzymami biorącymi udział biotransformacji leków jest niezwykle pomocna podczas planowania i stosowania terapii. Ma to istotne znaczenie

kliniczne, szczególnie przy wyjaśnianiu przyczyn niepowodzeń farmakoterapii oraz w zwiększaniu jej skuteczności i bezpieczeństwa.

1.2. Biotransformacja leków

Zdolność organizmu ludzkiego do biotransformacji leków i ich eliminacji jest naturalnym procesem, który wymaga udziału wielu szlaków enzymatycznych i białek transporterowych. Charakter lipofilowy większości leków stosowanych klinicznie umożliwia przechodzenie do komórki przez warstwę lipidową i oddziaływanie z docelowymi receptorami lub białkami, wywierając pozytywny lub negatywny efekt farmakologiczny. Zadaniem procesu biotransformacji leków jest powstanie związków pochodnych o charakterze hydrofilowym, które są znacznie łatwiej usuwane z organizmu, ponieważ właściwości lipofilowe utrudniają eliminację leków i powodują ich kumulację w tkance tłuszczowej oraz w podwójnych błonach fosfolipidowych, co w rezultacie może ujawniać ich działanie toksyczne.

Metabolizm leków w organizmie opiera się o biochemiczne procesy ich przemian i zachodzi w dwóch fazach przy udziale określonych enzymów, które wyszczególniono poniżej w Tabeli 1.

Tabela 1. Enzymy metabolizujące ksenobiotyki [Gonzalez i Tukey, 2006]

ENZYMY	REAKCJE
Faza I - oksygenazy	
Cytochrom P450 (P450 lub CYP)	C- i O-oksydacja, dealkilacja, inne
Monooksygenazy flawinowe (FMO)	N-, S- i P-oksydacja
Hydrolazy epoksydowe (mEH, sEH)	Hydroliza epoksydów
Faza II - transferazy	
Sulfotransferazy (SULT)	Przyłączenie siarczanu
UDP-glukuronylotransferazy (UGT)	Przyłączenie kwasu glukuronowego
Glutatio-S-transferazy (GST)	Przyłączenie glutationu
N-acetylotransferazy (NAT)	Dodanie grupy acetylowej
Metylotransferazy (MT)	Dodanie grupy metylowej
Inne enzymy	
Dehydrogenaza alkoholowa	Redukcja alkoholi
Dehydrogenaza aldehydowa	Redukcja aldehydów
Oksydoreduktaza NADPH – chinonu (NQO)	Redukcja chinonów

mEH – mikrosomalna hydrolaza epoksydowa, sEH – rozpuszczalna hydrolaza epoksydowa, UDP – dwufosforan urydyny, NADPH – zredukowany fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego

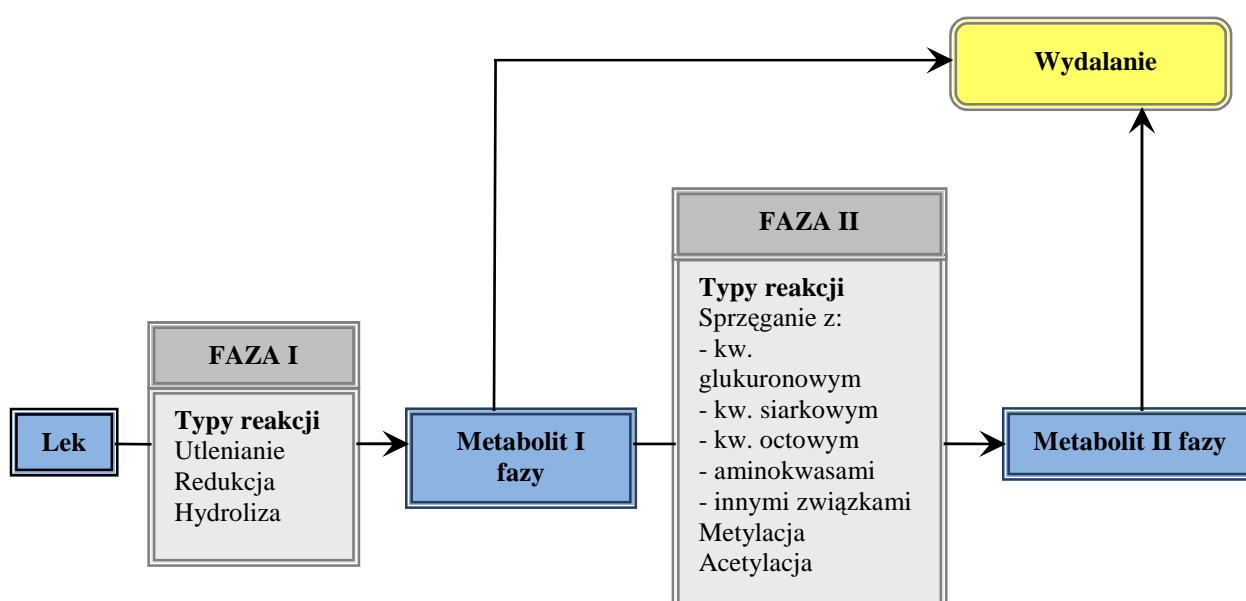
Enzymy fazy I, która obejmuje oksydację, redukcję i hydrolizę, powodują dołączenie grup funkcyjnych -OH, -COOH, -SH lub -NH₂, co w konsekwencji dochodzi do zwiększenia rozpuszczalności leku w wodzie i zmiany jego właściwości biologicznych. Reakcje fazy I prowadzą nie tylko do powstania farmakologicznie nieaktywnych metabolitów, ale w niektórych przypadkach podczas hydrolizy wiązań estrowych bądź amidowych mogą tworzyć związki o dużej aktywności biologicznej. W katalizie tego etapu metabolizmu uczestniczą głównie enzymy mikrosomalne wątroby cytochromu P450, jak również monooksygenazy flawinowe i hydrolazy epoksydowe (Tabela 2).

Tabela 2. Główne reakcje metabolizmu leków [Gonzalez i Tukey, 2006]

REAKCJE	PRZYKŁADY
Reakcje utlenienia	
N-dealkilacja	Imipramina, diazepam, kodeina, erytromycyna, morfina, tamoksyfen, teofilina, kodeina
O-dealkilacja	Kodeina, indometacyna, dekstrometorfan
Hydroksylacja alifatyczna	Tolbutamid, ibuprofen, fenobarbital, meprobumat, cyklosporyna, midazolam
Hydroksylacja aromatyczna	Fenytoina, fenobarbital, propranolol, etynyloestradiol, amfetamina, warfaryna
N-oksydacja	Chlorfeniramina, dapson, meperydyna
S-oksydacja	Cymetydyna, chlorpromazyna, tiorydazyna, omeprazol
Deaminacja	Diazepam, amfetamina
Reakcje hydrolizy	
	Karbamazepina, prokaina, aspiryna, klofibrat, meperydyna, enalapril, lidokaina, prokainamid, indometacyna,
Reakcje sprzęgania	
Glukuronizacja	Paracetamol, morfina, oksazepam, lorazepam
Sprzęganie z kwasem siarkowym	Paracetamol, steroid, metylodopa
Acetylacja	Sulfonamidy, izoniazyd, dapson, klonazepam
Metylacja	L-DOPA, metylodopa, merkaptopuryna, kaptopril
Sprzęganie z glutationem	Adriamycyna, fosfomycyna, busulfan

W drugiej fazie biotransformacji leków przeprowadzane są natomiast reakcje acetylacji, metylacji, sprzęgania z aminokwasami, kwasem glukuronowym, octowym lub siarkowym, które prowadzą do powstania zazwyczaj związków nieaktywnych, lepiej rozpuszczalnych w wodzie o większej masie cząsteczkowej, przygotowanych do wydalenia z moczem lub żółcią (Rycina 1). Przemiany te zachodzą przy udziale transferaz, m.in. UDP-

glukuroniltransferazy (UGT), S-transferazy glutationowej (GST), sulfotransferazy (SULT), metylotransferazy (MT) i N-acetylotransferazy (NAT), przy czym skuteczna biotransformacja leków związana jest ze skoordynowanym działaniem enzymów uczestniczących w każdej fazie metabolizmu. Istotny jest fakt, iż niektóre enzymy mogą przekształcać pewne substancje w wysoko reaktywne związki o działaniu kancerogennym, które mogą reagować z DNA, RNA i białkami, a tym samym wywoływać działanie cytotoksyczne wobec narządów oraz powodować śmierć komórek. Szczególnie pod tym względem, istotne są badania nad potencjalną aktywnością kancerogenną leków, które mają być zastosowane w terapii chorób przewlekłych [Gonzalez i Tukey, 2006].



Rycina 1. Fazy metabolizmu leku [na podstawie *Mutschlera*, 2004]

Biotransformacja leków zachodzi głównie w mikrosomach wątroby, które posiadają aktywne układy enzymatyczne, wykazujące zdolność metabolizowania zarówno związków endogennych (np. cholesterol, hormony steroidowe, kwasy tłuszczowe), jak i egzogennych (leki, prokancerogeny, składniki diety). W mniejszym stopniu reakcje biotransformacji z udziałem enzymów mają miejsce również w błonie śluzowej przewodu pokarmowego, jamie nosowej oraz płucach. W przypadku leków podawanych doustnie, biotransformacja jest procesem złożonym, ponieważ leki wchłonięte z przewodu pokarmowego dostają się do krwiobiegu niemal wyłącznie przez układ krążenia wrotnego po wcześniejszej

biotransformacji w wątrobie. Jest to tzw. efekt pierwszego przejścia, który prowadzi do zmniejszenia biodostępności biologicznej stosowanych doustnie leków.

Istotny jest również fakt, iż złożoność i dynamika procesów przemian leków w organizmie różnią się u każdego osobnika i zależą od wielu czynników, takich jak:

- czynniki genetyczne – warunkujące zdolność organizmu do szybkiego lub wolnego metabolizowania określonych leków
- płeć – u mężczyzn, leki metabolizowane są o wiele szybciej niż u kobiet, prawdopodobnie w wyniku pobudzającego działania testosteronu na aktywność enzymów znajdujących się w błonach retikulum endoplazmatycznego komórek wątroby zwanych hepatocytami
- wiek – stwierdzono mniejszą aktywność enzymów mikrosomalnych u noworodków i osób w starszym wieku
- stany patologiczne niektórych narządów odpowiedzialnych za metabolizm leków, m.in. wątroby i nerek – prowadzące do upośledzenia biotransformacji leków i przedłużenia ich czasu działania
- droga podania – nasilenie metabolizmu wątrobowego niektórych leków po podaniu doustnym (tzw. efekt pierwszego przejścia)
- ciąża – może indukować enzymy CYP, czego przykładem jest potencjalna indukcja CYP2D6 obserwowana poprzez zwiększony metabolizm metoprololu
- 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
- stan odżywienia – zarówno stan głodu jak i otyłość wpływają na aktywność CYP
- palenie papierosów – powoduje indukcję enzymów CYP, zwiększa klirens fenacetyny i teofiliny
- alkohol – przewlekłe spożywanie alkoholu zwiększa ok. 2-krotnie aktywność CYP2E1
- interakcje – wpływ jednego leku na procesy farmakokinetyczne drugiego leku w wyniku zmiany aktywności enzymów uczestniczących w ich metabolizmie [*Badyal i Dadhick, 2001*].

Największe znaczenie w I fazie biotransformacji leków przypisuje się izoenzymom cytochromu P450, które mają zdolność do metabolizowania szerokiego spektrum związków w obecności cząsteczkowego tlenu oraz zredukowanego dinukleotydu nikotynoamido-adeninowego, spełniającego funkcję koenzymu. Jednakże, aktywność wielu izoform

cytochromu P450 może wykazywać zmienność wynikającą z polimorfizmu genów kodujących te enzymy lub regulacji poprzez ksenobiotyki, co jest przedmiotem licznych badań naukowych prowadzących do wyjaśnienia mechanizmu biotransformacji substancji egzogennych. Ma to istotne znaczenie, ponieważ różnice w aktywności izoform CYP w metabolizowaniu wybranych leków i substancji chemicznych mogą mieć istotny wpływ na interakcje typu preparat roślinny - lek syntetyczny, aktywację leków i kancerogenów oraz ich detoksykację.

1.3. Cytochrom P450

Enzymy z nadrodziny cytochromu P450 są transbłonowymi białkami o masie cząsteczkowej około 50-55 kDa. W ludzkim genomie opisano występowanie 57 genów oraz ponad 58 pseudogenów sklasyfikowanych w 18 rodzinach i 43 podrodzinach cytochromu P450 [Pelkonen i wsp., 2008; Tomaszewski i wsp., 2008]. Występują w różnych tkankach i komórkach narządów, pełniąc ważną rolę fizjologiczną dla organizmu [Seliskar i Rozman, 2007]. Największą aktywność wykazują w wątrobie i jelicie cienkim, gdzie mają miejsce głównie procesy detoksykacji [Pelkonen i wsp., 2008]. W ludzkiej wątrobie enzymy cytochromu P450 stanowią w przybliżeniu 2% całkowitej frakcji białka mikrosomalnego (0,3 - 0,6 nmol całkowitej frakcji CYP na mg białka mikrosomalnego), natomiast w innych tkankach zawartość enzymów CYP metabolizujących leki jest znacznie niższa (Tabela 3).

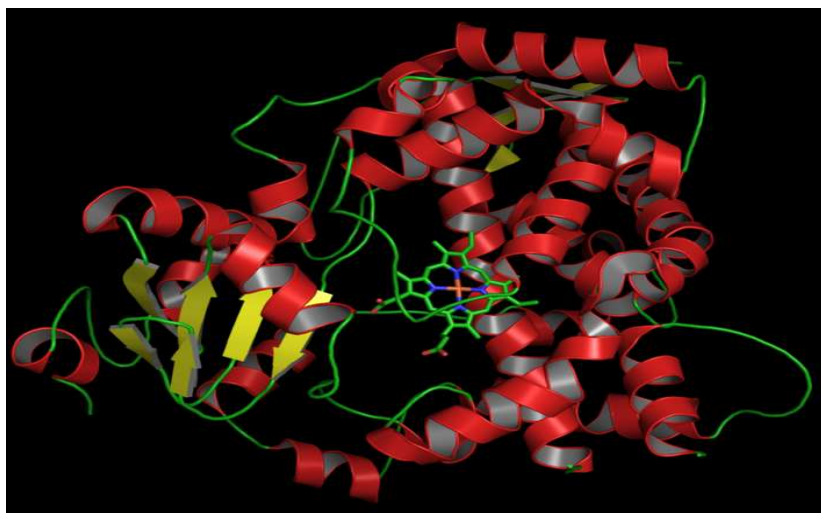
Tabela 3. Zawartość całkowitej frakcji CYP w wybranych ludzkich tkankach [Hrycay i Bandiera, 2008]

TKANKA	ZAWARTOŚĆ CYP*
Wątroba	0.30 – 0.60
Nadnercza	0.23 – 0.54
Jelito cienkie	0.03 – 0.21
Mózg	0.10
Nerki	0.03
Płuca	0.01
Jądra	0.01

* białko mikrosomalne nmol/mg

W oparciu o strukturę krystaliczną bakteryjnych enzymów P450, modelowanie cząsteczek i ukierunkowaną mutagenezę określono u ssaków całą strukturę cytochromu P450, w której wykazano regiony odpowiedzialne za wiązanie substratu, transport elektronów

i wiązanie hemu. Pierwszym eukariotycznym enzymem CYP450, dla którego określono sekwencję aminokwasową, był izoenzym wyizolowany z hepatocytów szczura indukowany przez zastosowanie fenobarbitalu [Fujii-Kuriyama i wsp., 1982]. W oparciu o dane eksperymentalne wykazano, że w przeciwieństwie do bakteryjnych enzymów P450 znajdujących się w cytozolu, eukariotyczne są białkami, które posiadają na N-końcu sekwencję hydrofobową zwaną „sygnałową sekwencją kotwiczącą”, umożliwiającą zakotwiczenie białka w błonie komórkowej [Sakaguci i wsp., 1987]. Dotychczas strukturę przestrzenną poznano dla kilku głównych enzymów, takich jak: CYP2C8, 2C9, 3A4, 1A2 i 2D6, biorących udział w biotransformacji leków i innych substancji egzogennych [Rowland i wsp., 2006]. Analiza porównawcza wyżej wymienionych izoenzymów sugeruje, że mają taką samą strukturę trzeciorzędową posiadając 12 łańcuchów aminokwasowych o strukturze α -helisy i 4 łańcuchy o strukturze β -kartki (Rycina 2) [Sansen i wsp., 2007].



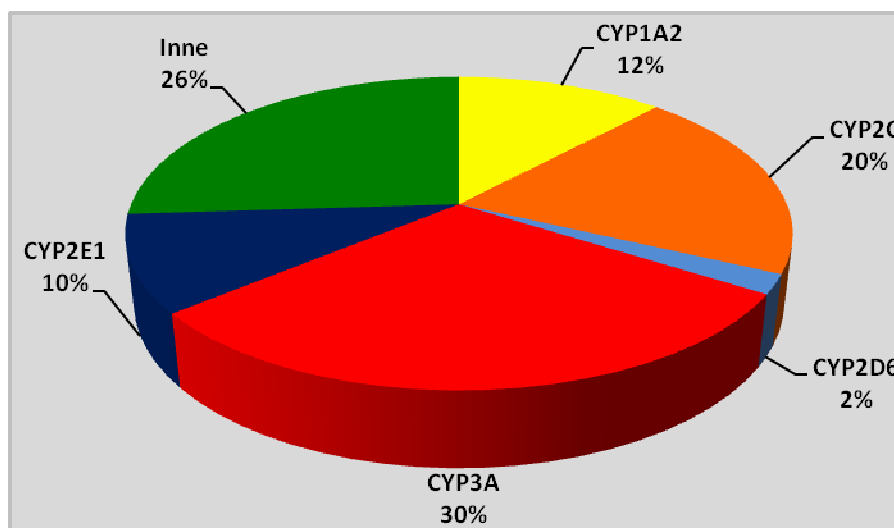
Rycina 2. Przykładowa struktura ludzkiej izoformy cytochromu P450 CYP3A4 z zaznaczoną grupą prostetyczną. Kolorem czerwonym zaznaczono α -helisy, żółtym struktury β -kartki. [Yano i wsp., 2004]

Wszystkie enzymy cytochromu P450 są hemoproteinami i mają zdolność wiązania dwóch atomów cząsteczkowego tlenu, dzięki redukcji żelaza stanowiącego centrum aktywne hemu. Wykazują aktywność monooksygenaz o niskiej specyficzności substratowej i posiadają zdolność do metabolizowania zróżnicowanych substratów endogennych, m.in. hormonów steroidowych, kwasów żółciowych, prostaglandyn, leukotrienów. Znaczna ich część uczestniczy również w biotransformacji ksenobiotyków, w tym składników diety oraz leków [Liu i wsp., 2007; Brown i wsp., 2008; Hrycay i Bandiera, 2008]. Ponadto niektóre substancje są szkodliwe dla człowieka i ulegają biotransformacji poprzez udział cytochromu P450 do

reaktywnych wysoce toksycznych form przejściowych, co determinuje lub nasila ich mutagenne bądź rakotwórcze działanie, prowadząc do dysfunkcji komórki a w konsekwencji do kancerogenezy. Jednakże, efektem aktywności izoenzymów P450 jest nadanie przede wszystkim lipofilowym ksenobiotykom charakteru hydrofilowego poprzez dodanie funkcjonalnych grup polarnych, co ma kluczowe znaczenie w procesie detoksykacji. Przemiany te zachodzą w retikulum endoplazmatycznym i mitochondriach organów związanych z metabolizmem ksenobiotyków, głównie w mikrosomach wątroby, a także w płucach, jelitach i nerkach.

U ssaków enzymy CYP450 sklasyfikowano do dwóch grup, z których pierwsza związana jest z biosyntezą hormonów steroidowych i metabolizmem kwasów tłuszczowych, natomiast druga obejmuje aktywację lub inaktywację leków i innych związków egzogennych wprowadzonych do organizmu. Na podstawie sekwencji aminokwasowej w łańcuchu peptydowym oraz miejsca działania enzymu w cząsteczce w reakcji hydroksylacji, nadrodzina cytochromów P450 została podzielona na rodziny i podrodziny. Enzymy sklasyfikowane do jednej rodziny (np. CYP3) wykazują homologię sekwencji rzędu 40%, natomiast członkowie podrodziny ponad 55% (np. CYP3A), wśród których funkcjonują izoformy będące produktem oddzielnego genu o stopniu homologii sięgającej wartość 95% [Martignoni i wsp., 2006]. W ramach jednej izoformy można także obserwować znaczny polimorfizm sekwencji, co może powodować widoczne zmiany w aktywności danego enzymu. Przykładem tego typu zmienności jest ludzki CYP2D6, który posiada wiele form polimorficznych a ich aktywność może się różnić nawet 100-krotnie [<http://cypalleles.ki.se/cyp2d6.htm>]. Ponadto znanych jest wiele izoform CYP450, które wykazują zmienność międzygatunkową polegającą na znacznych różnicach w poziomie aktywności i regulacji enzymów CYP. Jednakże podobieństwo sekwencyjne niektórych enzymów pozwala na ustalenie odpowiedników ludzkich sekwencji u zwierząt i prowadzenie badań z udziałem organizmów modelowych. Wysoki konserwatyzm międzygatunkowy wykazuje izoforma CYP1A2 odpowiedzialna za metabolizm kofeiny, teofiliny i naproksenu oraz prokancerogenów, do których należą aminy i policykliczne węglowodory aromatyczne (PAH), jak również enzym CYP2E1 katalizujący biotransformację etanolu i innych rozpuszczalników organicznych oraz niektórych leków, np. paracetamolu [Zuber i wsp., 2002; Martignoni i wsp., 2006]. Przypuszcza się, że podwyższony poziom izoform z podrodziny CYP1A może być związany z większym stopniem uszkodzeń DNA spowodowanych kancerogenami i mutagenami pochodzącymi ze środowiska.

Głównymi podrodzinami cytochromu P450 metabolizujących ksenobiotyki w wątrobie człowieka są: CYP3A stanowiący 30% zawartości wszystkich enzymów CYP450, CYP2C o zawartości 20% oraz w nieco mniejszym stopniu CYP1A stanowiący 13% [Lamb i wsp., 2007]. Obecność natomiast innych frakcji enzymów CYP450 w wątrobie uczestniczących w biotransformacji substancji egzogennych, w tym również leków uwzględniono na wykresie (Rycina 3).

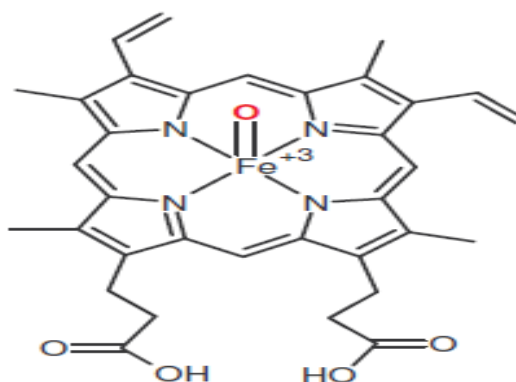


Rycina 3. Udział poszczególnych frakcji enzymów CYP450 w wątrobie człowieka na poziomie białka [Shimada i wsp., 1994]

Równowaga reakcji przeprowadzanych przez enzymy cytochromu P450 może być zakłócana przez wiele czynników. Ich aktywność katalityczna może ulegać zmianie nie tylko poprzez czynniki genetyczne, przebyte schorzenia wątroby, endogenne systemy regulacji hormonalnej, ale również związki egzogenne będące ligandami receptorów jądrowych, które mogą indukować zarówno aktywację jak i represję genów docelowych [Vessel, 1988; Glass i Rosenfeld, 2000]. W związku z powyższym, zarówno substancje pochodzenia endogenne (hormony, cytokiny) jak i egzogenne (zanieczyszczenia środowiska, składniki diety, stosowane używki, leki) mogą modulować funkcjonowanie wspomnianych enzymów CYP450, indukując je bądź hamując. Indukcja prowadzi do produkcji większej ilości enzymu a w konsekwencji do szybszego utleniania tej samej (autoindukcja) bądź innej substancji. Inhibicja jest zazwyczaj wynikiem konkurencji między dwiema substancjami metabolizowanymi przez jedną izoformę cytochromu. Dotychczas poznano i opisano wiele syntetycznych induktorów i inhibitorów poszczególnych enzymów z nadrodziny CYP450, biorących udział w modelowaniu ich aktywności [Pelkonen i wsp., 2008].

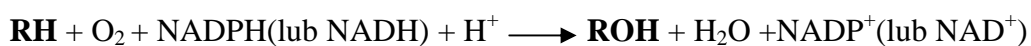
1.3.1. Mechanizm działania cytochromu P450

Cytochrom P450 jest białkiem, które w kompleksie z tlenkiem węgla wykazuje maksymalną absorbancję przy długości fali 450 nm. Stanowi końcowe ogniwo łańcucha przekazu elektronów, z którego przenoszone są na jeden atom tlenu w cząsteczce O₂, redukując go do cząsteczki H₂O, przy czym drugi atom tlenu zostaje włączony w substrat. Centrum aktywne CYP450 stanowi grupa hemowa, w której Fe(III) jest związane z czterema atomami azotu pierścienia porfirynowego i dwoma osiowymi ligandami, przy czym jeden stanowi grupę tiolową cysteiny (Rycina 4).



Rycina 4. Centrum porfirynowo-żelazowe enzymu CYP450 [Wiśniewska i Mazerska, 2009]

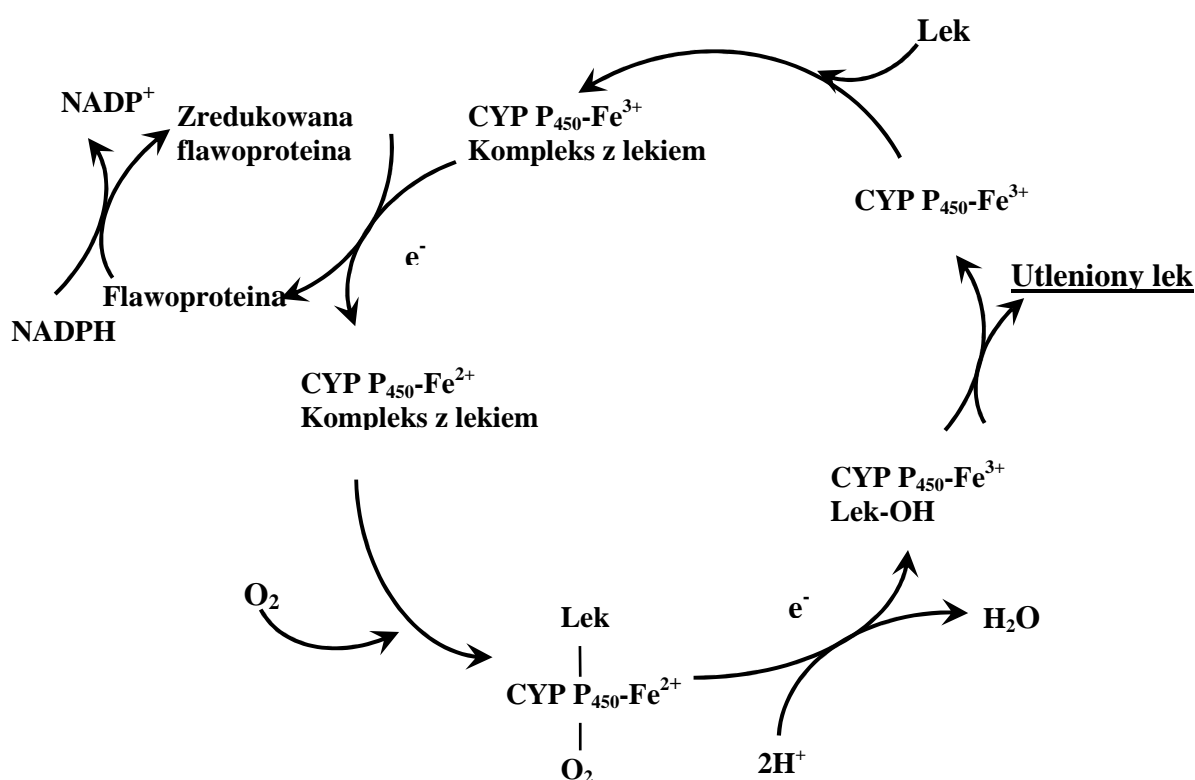
Mechanizm działania monooksygenaz polega na przeprowadzeniu katalizy reakcji utlenienia związków endo- i egzogennych poprzez wbudowanie do cząsteczki substratu jednego z dwóch atomów cząsteczki tlenu. Reakcja hydroksylacji katalizowana przez cytochrom P450 przebiega ogólnie według przedstawionego poniżej przyjętego schematu reakcji:



gdzie: **RH** – substrat, **ROH** – produkt [Gerber i Sligar, 1992].

Cykl katalityczny cytochromu P450 jest inicjowany poprzez związanie substratu z grupą hemową, która przyjmuje elektron z NADPH prowadząc do redukcji Fe(III) do Fe(II) [Guengerich, 2000a]. Następnie Fe(II) wiąże cząsteczkę tlenu tworząc addukt Fe(II)-O₂, który szybko ulega przemianie w bardziej trwały kompleks Fe(III)-O₂^{•-}. W dalszym etapie cyklu następuje przyjęcie drugiego elektronu [Isin i Guengerich, 2007; Reed

i Holenberg, 2003] i przegrupowanie ładunku, którego wynikiem jest utlenienie żelaza do Fe(III). Powstały kompleks Fe(III)-O₂²⁻ oddziałuje z protonem z otaczającego środowiska i 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. Kończącym etapem cyklu jest odłączenie powstałego produktu i odtworzenie cząsteczki cytochromu P450 (Rycina 5) [Guengerich, 2000a; Isin i Guengerich, 2007].



Rycina 5. Cykl kataliczny cytochromu P450 [Wiśniewska i Mazerska, 2009]

Należy podkreślić, że u człowieka transfer elektronów z NADPH na cytochrom P450 jest realizowany przez dwa systemy transportu. Jeden z nich znajduje się w retikulum endoplazmatycznym, drugi w mitochondriach. W błonach retikulum endoplazmatycznego NADPH przekazuje elektrony na flawoproteinę NADPH-zależną, którą jest reduktaza cytochromu P450. Enzym ten posiada dwie główne grupy prostetyczne: mononukleotyd flawinoadeninowy (FMN) i dinukleotyd flawinoadeninowy (FAD). Dwa elektrony

z cząsteczki NADPH są przenoszone na FAD, a następnie po jednym elektronie na FMN, gdzie są przekazywane na hem cytochromu P450, który ulega stopniowej redukcji przenosząc elektron na substrat [Murataliev i wsp., 2004]. W przypadku niektórych form cytochromu P450, przy przekazywaniu drugiego elektronu w cyklu może brać udział cytochrom b5, będący małym białkiem hemowym o masie około 17 kDa, który jest również obecny w retikulum endoplazmatycznym [Sakaki i Inouye, 2000; Reed i Holenberg, 2003].

Cytochrom b5 jest redukowany przy udziale NADPH zależnej reduktazy cytochromu P450 lub innej flawoproteiny mikrosomalnej – NADPH reduktazy cytochromu b5. Jednakże rola tego ostatniego białka nie jest w pełni poznana. Uważa się, że w zależności od rodzaju izoenzymu oraz właściwości jego substratu, cytochrom b5 może stymulować, hamować lub nie mieć wpływu na reakcje katalizowane przez cytochrom P450 [Reed i Holenberg, 2003]. Wykazano, że cytochrom b5 stymuluje biotransformację niektórych endogennych substratów, w tym witamin, prostaglandyn, kwasów tłuszczowych i steroidów oraz oksydację wielu leków i związków kancerogennych [Vergéres i Waskell, 1995]. Przeprowadzone badania odnośnie roli cytochromu b5 wskazały na udział w podwyższeniu aktywności izoenzymów CYP2B1 i CYP2E1 poprzez zwiększanie wydajności wykorzystania NADPH, jak również konkurencję z reduktazą cytochromu P450 o miejsce wiązania w CYP2B4 na etapie przenoszenia drugiego elektronu. Jednocześnie wykazano, że wpływ cytochromu b5 na reakcje katalizowane przez izoenzym cytochromu P450 zależy w dużej mierze od stężenia tego białka w komórce [Zhang i wsp., 2008; Wiśniewska i Mazerska, 2009].

W drugim systemie transferu elektronów na cytochrom P450, znajdującym się w wewnętrznej błonie mitochondrialnej, akceptorem elektronów z NADPH jest FAD pochodzący z reduktazy flawonoproteinowej. W odróżnieniu od reduktazy P450, enzym ten zawiera tylko FAD w związku z tym, reduktaza mitochondrialna nie może bezpośrednio przenosić elektronów na cząsteczkę hemu cytochromu P450. W reakcji tej uczestniczy wówczas niewielkie białko żelazo-siarkowe zwane adrenodoksyną [Ziegler i wsp., 1999]. Zarówno flawoproteina jak i przenośniki żelazo-siarkowe będące składnikami mitochondrialnego systemu P450 syntetyzowane są w cytozolu jako prekursorzy i transportowane do mitochondrium, gdzie ulegają transformacji w dojrzałe białka o niższej masie cząsteczkowej.

1.3.2. Reakcje katalizowane przez izoenzymy CYP450

Różnice w strukturze centrum aktywnego enzymu CYP450 określają zdolność oddziaływania z substratami o charakterystycznej strukturze chemicznej i pozycji zmian oksydacyjnej ich molekuł. Z powyższego wynika, iż ksenobiotyk, w tym lek może ulegać biotransformacji przez jedną izoformę bądź kilka różnych form izoenzymatycznych, czego przykładem jest kodeina podlegająca oksydacyjnej O-demetylacji przez CYP2D6 i N-demetylacji przy udziale CYP3A4 [Tomaszewski i wsp., 2008]. W zależności od rodzaju substratu oraz pozycji w cząsteczce, do której zostaje dołączony atom tlenu enzymy cytochromu P450 mogą katalizować nie tylko reakcje monooksygenacji, ale również brać udział w reakcjach redukcji, dehydratacji, dehydrogenacji, dehalogenacji, dimeryzacji i izomeryzacji [Okita i Masters, 1998; Degtyarenko, 1993].

W zależności od struktury substratów reakcje utleniania katalizowane przy udziale enzymów CYP450 obejmują:

- **reakcje hydroksylacji** – najpopularniejszy typ przemian katalizowanych przez cytochromy P450, w których elektrofilowy element struktury Fe(III)=O w hemie przyłącza atom tlenu do niespolaryzowanego wiązania C-H (np. szlaki przemian testosteronu) [Guengerich i wsp., 1997a; Guengerich, 2000a; Choi i wsp., 2005].
- **reakcje dealkilacji** – reakcje hydroksylacji zachodzące w pozycji α do heteroatomów, np. atomu tlenu w eterach, siarki w tioestrach, azotu w aminach i amidach, gdzie hydrolityczny rozpad wiązania prowadzi odpowiednio do O-, N- i S-dealkilacji. Tego typu reakcje zachodzą jako proces bioaktywacji i detoksykacji ksenobiotyków (np. N-dealkilacja leku przeciwdepresyjnego imipraminy) [Richelson, 1997].
- **reakcje monooksygenacji heteroatomów** - w przypadku atomu azotu są to reakcje hydroksylacji wiązania N-H w I- i II-rzędowych aminach oraz amidach. Powstają początkowo N-hydroksyloaminy, a następnie aminy I-rzędowe, które są metabolizowane do nitrozopochodnych, stanowiąc jako proces aktywacji związków kancerogennych [Mazerska, 2006] oraz leków [Guengerich, 2000a].
- **reakcje epoksydacji** - proces otrzymywania epoksydów, związków wysoce reaktywnych i wykazujących właściwości toksyczne, których reakcje z DNA są bezpośrednią przyczyną kancerogennych właściwości wielu związków, np. tworzenie epoksydu benzo[a]pirenu w pozycji 9, 10 stanowi główny

mechanizm odpowiedzialny za działanie rakotwórcze tego związku [Guengerich, 2000b; Alexandrov i wsp., 2006].

Badania wykazały, że izoenzymy CYP450 mogą katalizować reakcje utleniania fenoli z utworzeniem wiązań C-C lub C-O, jak również w jednym z etapów biosyntezy cholesterolu i estronu reakcje deformylacji z utworzeniem podwójnego wiązania przyległego do atomu węgla związanego z grupą CHO [Guengerich, 2000a; Wood, 1992; Roberts i wsp., 1991]. W przypadku reakcji dehydrogenacji związków alifatycznych, w tym również leków syntetycznych zwanych walproininami, stosowanymi w leczeniu padaczki, powstają nie tylko produkty z wiązaniem podwójnym, ale także metabolity z grupą hydroksylową [Rettie i wsp., 1987; Brown i wsp., 2008]. Niektóre izoenzymy CYP450 katalizują również reakcje redukcji, m.in. pochodnych polihalogenowych, związków azowych, III-rzędowych amin i N-tlenków [Guengerich, 2000a]. W przypadku redukcji aromatycznych i alifatycznych związków nitrowych [Rauth i wsp., 1998; Moreno i Docampo, 1985] wszystkie produkty pośrednie powstające podczas tej reakcji są reaktywne i mogą podobnie jak epoksydy oddziaływać z DNA, RNA lub białkami, indukując efekty toksyczne, w tym kancerogenne [Hewitt, 2007]. Należy podkreślić, że w warunkach fizjologicznych CYP8A1 i 5A1 katalizują izomeryzację prostaglandyny H₂ do prostacykliny i tromboksanu [Guengerich, 2000a], przy czym izomeryzacja zachodzi także po hydroksylacji tamoksyfenu [Mathijssen i Schaik, 2006]. Na uwagę zasługuje również katalizowana przy udziale CYP2D6 i 2C9 oksydacyjna dimeryzacja np. leku tiklopidyny hamującego agregację płytek krwi, jak również powstanie produktów cyklizacji w przemianach pochodnej 1-nitroakrydyny, stosowanej do roku 1982 w klinicznej terapii nowotworów pod nazwą Nitracrine^R [Gorlewska i wsp., 2001; Wiśniewska i wsp., 2008].

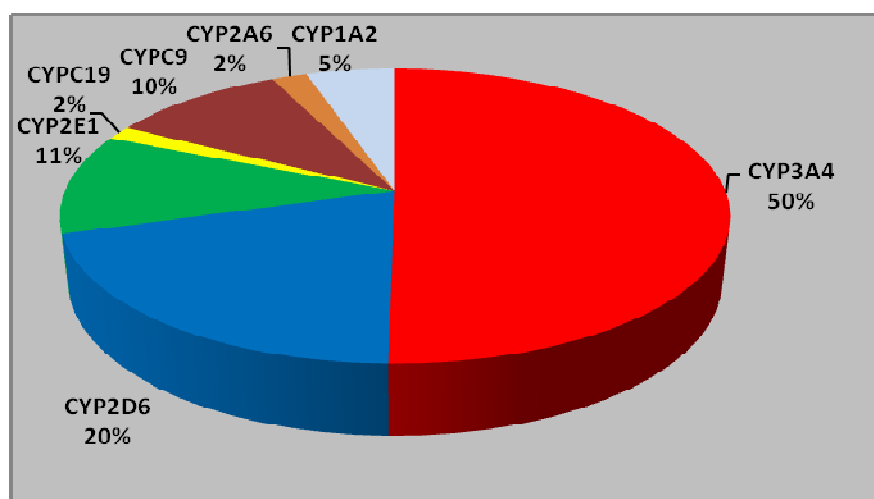
Doniesienia literaturowe sugerują również, iż niektóre enzymy CYP450 w przypadku braku odpowiednich substratów do reakcji, mogą ulegać autooksydacji i wytwarzać reaktywne formy tlenu, które mogą modyfikować zasady purynowe i pirymidynowe a w konsekwencji indukować apoptozę [Bernhard, 2007]. Informacje dotyczące wybranych reakcji katalizowanych przez izoenzymy CYP450 w zależności od substratu zamieszczono w Tabeli 4.

Tabela 4. Typy reakcji chemicznych katalizowanych przez enzymy CYP450 [Richelson, 1997; Guengerich, 2000a,b; Nebert i Russel, 2002; Wójcikowski i wsp., 2003; Mathijssen i Schaik, 2006; Isin i Guengerich, 2007; Brown i wsp., 2008; Wiśniewska i Mazerska, 2009]

TYP REAKCJI	SUBSTRAT	PRODUKTY	CYP
Hydroksylacja	Testosteron	1 β -OH, 2 α / β -OH, 6 β -OH, 15 β -OH, 16 β -OH	2C9, 2C19, 3A4
	Cholekalcyferol (Wit. D3)	25-OH, 1 α -OH, 1 α , 25-di-OH, 24,25-di-OH	27A1, 27B1, 24A1 26A1, 26B1
	Kwas retinowy (Wit. A)	4-OH, 18-OH	2E1, 1A2, 3A4
	Paracetamol	3-OH	2D6
	Imipramina	2-OH	
Dealkilacja	Imipramina	N-demetyloimipramina (Desipramina)	1A2,3A4
	Kofeina	N3-demetylokofeina (Paroksetyna) N7-demetylokofeina (Teofilina)	1A2 2E1
Monooksygenacja heteroatomów	Naproksen	O-demetylonaproksen	2C9
	Promazyna	(S)=O-promazyna	2D6
Epoksydacja	Chloropromazyna	(S)=O-chloropromazyna	2D6
	Benzen	1,2-epoksybenzen	1A1
Peroksydacja	Benzo[a]piren	7,8-dihydroksydiol-9,10-epoksybenzo[a]piren	1A1, 3A4
	Aflatoksyna	2,3-epoksy aflatoksyna	1A2, 3A4
	Chlorek winylu	2-chloracetaldehyd	2E1
Utlenianie aldehydów (deformylacja)	Fenol	Eter benzylofenylowy, dihydroksybifenyl	P450, mikrosomy
Dehydrogenacja związków alifatycznych	Aldehyd, R ₁ CH ₂ CR ₂ R ₃ CHO	Alken, R ₁ CH=CR ₂ R ₃ + HCOOH	P450, mikrosomy
Redukcja	N-metyloformamid	Izocyjanian metylu	2E1
	Kwas 2-propylowalerianowy (walproinowy)	4-diene-VPA 4-OH-VPA 5-OH-VPA	2C9 2C9, 2B6, 2A6 2C9, 2B6, 2A6
Izomeryzacja	CCL ₄	CCL ₃ · \longrightarrow COCL ₂	2E1
	ArNO ₂	ArNO, ArNHOH, ArNH ₂	P450, mikrosomy
	N-tlenek tamoksyfenu	Tamoksyfen	?
Dimeryzacja	Prostaglandyna H ₂ , PGH ₂	Prostacyklina, PGI ₂	8A1 (synteza prostacyklinowa)
	Prostaglandyna H ₂ , PGH ₂	Tromboksan, TXA ₂	5A1 (synteza tromboksanowa)
	Tamoksyfen	(cis)4-OH-tamoksyfen (trans) 4-OH-tamoksyfen	2D6 2D6
Cyklizacja	S-tlenek tiklopidyny	Dimer S-tlenku tiklopidyny	2C19
	S-tlenek 2-fenylotiofenu	Dimer S-tlenku 2-fenylotiofenu	2C1
Biosynteza	Biosynteza	Morfina, Kodeina	P450, mikrosomy
	Ester pirydyny	Lakton estru pirydyny	P450, mikrosomy
Cyklizacja	9-amino-1-nitroakrydyna (Nitracrine®)	1,9-diazano-1,10-dihydroakrydyna	2C19, 3A4

1.3.3. Funkcje izoenzymów CYP450

Nadrodzina cytochromu P450 odgrywa istotną rolę w procesach biotransformacji ksenobiotyków m.in. leków, składników diety, toksyn, kancerogenów oraz endogennych substratów zwłaszcza o charakterze hydrofobowym. Powstałe produkty metabolizmu zwykle stają się bardziej polarne i lepiej rozpuszczalne w wodzie, co sprzyja ich dalszemu metabolizowaniu i wydaleniu z organizmu. W biotransformacji leków i innych ksenobiotyków zaangażowane są enzymy należące do rodzin CYP1-3, których izoenzymy, takie jak: CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 oraz CYP3A4 odpowiadają wspólnie za biotransformację ponad 90% leków stosowanych klinicznie [Wienkers i Heath, 2005; Guengerich, 2008]. Udział procentowy poszczególnych enzymów CYP w metabolizmie leków, ze wskazaniem na inne frakcje uczestniczące we wspomnianej biotransformacji przedstawiono na wykresie według Shimada i wsp. [1994] (Rycina 6).



Rycina 6. Udział enzymów CYP450 w biotransformacji leków w wątrobie człowieka [Purnapatre i wsp., 2008]

Izoformy cytochromu P450 biorą udział również w przemianach endogennych związków chemicznych, włączając kwasy tłuszczowe, steroidy, kwasy żółciowe i eikozanoidy [Nebert i Russel, 2002; Okita i Masters, 1998; Seliskar i Rozman, 2007]. W Tabeli 5 przedstawiono najistotniejsze funkcje pełnione przez enzymy CYP450 z uwzględnieniem biotransformacji zarówno związków endo- jak i egzogennych.

Tabela 5. Główne funkcje przypisywane ludzkim enzymom CYP z uwzględnieniem ich lokalizacji na chromosomie

RODZINA CYP ¹	PODRODZINY ¹	LOKALIZACJA FUNKCJONALNYCH GENÓW (CHROMOSOM) ¹	GŁÓWNE FUNKCJE ²⁻⁶
CYP1	1A	15	Metabolizm ksenobiotyków m.in. leków, prokancerogenów
	1B	2	4-hydroksylacja estradiolu
CYP2	2A, 2B, 2F, 2G, 2S, 2T	19	Metabolizm ksenobiotyków (2A, 2B) m.in. leków, prokancerogenów
	2C, 2E	10	Metabolizm ksenobiotyków m.in. leków, prokancerogenów
	2D	22	Metabolizm ksenobiotyków m.in. leków, prokancerogenów
	2J	1	Metabolizm ksenobiotyków i kwasu arachidonowego
	2R	11	Funkcja nieznana
	2U	4	Funkcja nieznana
	2W	7	Funkcja nieznana
CYP3	3A	7	Metabolizm ksenobiotyków (m.in. leków, prokancerogenów) i steroidów
CYP4	4A, 4B	1	Metabolizm leukotrienów, kwasu arachidonowego i kwasów tłuszczowych
	4F	19	Metabolizm kwasu arachidonowego i kwasów tłuszczowych
	4V	4	Funkcja nieznana
	4X	1	Funkcja nieznana
	4Z	1	Funkcja nieznana
CYP5	5A	7	Synteza tromboksanu A ₂
CYP7	7A, 7B	8	Synteza kwasów żółciowych
CYP8	8A	20	Synteza prostacyklin
	8B	3	Synteza kwasów żółciowych
CYP11	11A	15	Odszczepienie bocznego łańcucha cholesterolu
	11B	8	Synteza aldosteronu, 11β-hydroksylacja steroidów
CYP17	17A	10	17α-hydroksylacja steroidów
CYP19	19	15	Aromatyzacja steroidów (synteza estrogeny)
CYP20	20	2	Funkcja nieznana
CYP21	21A	6	21-hydroksylacja steroidów
CYP24	24	20	Metabolizm witaminy D
CYP26	26A, 26C	10	Metabolizm witaminy A
	26B	2	Metabolizm witaminy A
CYP27	27A, 27C	2	Synteza witaminy D, synteza kwasów żółciowych
	27B	12	Synteza witaminy D
CYP39	39A	6	Synteza kwasów żółciowych
CYP46	46	14	24-hydroksylacja cholesterolu
CYP51	51	7	14-demetylacja sterolu

¹Nelson: <http://dr.nelson.utmem.edu/human.genecount.html>, ²Nebert i Russell 2002, ³Lund i wsp. 1999, ⁴Yoshida i wsp. 2000, ⁵Matsumoto i wsp. 2002, ⁶Bylund i wsp. 2002.

W przeprowadzonych badaniach na zwierzętach pozbawionych genów tych enzymów wykazano, że mają szczególny wpływ na prawidłowy rozwój ssaków, ze względu na udział w metabolizmie substancji endogennych i pełnieniu ważnej roli fizjologicznej w organizmie [Guengerich, 2000a]. Wynika to z faktu, iż pozwalają utrzymać wewnętrzną równowagę organizmu, chroniąc go przed szkodliwym działaniem nie tylko ksenobiotyków, ale również akumulowanych w organizmie naturalnych produktów metabolizmu [Isin i Guengerich, 2007; Ekins i wsp., 2000].

W biosyntezie steroli i ich pochodnych bierze udział kilka różnych izoenzymów cytochromu P450, w tym CYP51A1, który katalizuje reakcję 14 α -demetylacji lanosterolu, w wyniku czego powstaje cholesterol [Nebert i Russel, 2002]. Natomiast ważną funkcję w procesie syntezy kwasów żółciowych z cholesterolu i oksysterolu spełniają CYP7A1, CYP7B1 i CYP39A1, które katalizują reakcję hydroksylacji atomu węgla 7 [Nebert i Russel, 2002]. W metabolizmie cholesterolu istotne znaczenie ma także CYP46A1, który występuje głównie w neuronach systemu nerwowego [Russel, 2000]. Uczestniczy on w tworzeniu 24S-hydroksycholesterolu (oksysterol), który w porównaniu do cholesterolu jest bardziej polarny przez co znacznie łatwiej pokonuje barierę krew-mózg. Powstały oksysterol przedostaje się do krwiobiegu i powraca do wątroby, gdzie może być następnie przekształcony w kwasy żółciowe bądź wydalony w postaci glukuronianów i siarczanów [Ohyama i wsp., 2006]. U pacjentów cierpiących na chorobę Alzheimera wykazano, że stężenie powyżej omawianego enzymu CYP46A1 jest wyższe w komórkach mózgu i może spełniać istotną funkcję w hamowaniu rozwoju chorób neurodegeneracyjnych. Na uwagę zasługują również w organizmie CYP27A1 oraz CYP27B1 i CYP24A1 uczestniczące w syntezie i metabolizmie witaminy D3 (cholekalcyferol) oraz CYP26A1 i CYP26B1 biorące udział w przemianach pochodnej witaminy A i kwasu retinowego [Sakaki i Inouye, 2000; Nebert i Russel, 2002; Osanai i Petkovich, 2005].

Ponadto, można dokonać klasyfikacji izoenzymów P450 na grupy w zależności od rodzaju substratu, biorąc pod uwagę udział w przemianach związków endogennych, m.in. steroli, kwasów tłuszczowych i eikozanoidów oraz związków egzogennych określanych mianem ksenobiotykami, wśród których uwzględniono leki i substancje toksyczne z wyszczególnieniem na witaminy z grupy A i D (Tabela 6) [Guengerich, 2005a].

Tabela 6. Klasyfikacja izoenzymów CYP450 w zależności od substratu [Guengerich, 2005a]

KSENOBIOTYKI	STEROLE	KWASY TŁUSZCZOWE	EIKOZANOIDY	WITAMINY	NIEZNANE SUBSTRATY
1A1	1B1	2J2	4F2	2R1	2A7
1A2	7A1	4A11	4F3	24A1	2S1
2A6	7B1	4B1	4F6	26A1	2U1
2A13	8B1	4F12	5A1	26B1	2W1
2B6	11A1		8A1	26C1	3A43
2C9	11B1			27B1	4A22
2C18	11B2				4F11
2C19	17A1				4F22
2D6	19A1				4V2
2E1	21A1				4X1
2F1	27A2				4Z1
3A4	39A1				20A1
3A5	46A1				27C1
3A7	51A1				

W klasyfikacji tej umieszczono również grupę nowo poznanych izoenzymów, zaliczanych do tzw. białek „sierocych” (ang. *orphan proteins*), dla których dotychczas nie określono roli fizjologicznej. Do izoenzymów P450, dla których nieznane są substraty należą: CYP2A7, 2R1, 4A22, 4F11, 4F22, 4V2, 4Z1, 26C1 oraz 27C1. W przypadku pozostałych istnieją już wstępne doniesienia o możliwie pełnionych przez nie funkcji. Uważa się, że izoenzym CYP2S1 występujący głównie w komórkach układu oddechowego oraz pokarmowego i może uczestniczyć w metabolizmie węglowodorów aromatycznych. CYP2U1 prawdopodobnie jest odpowiedzialny za metabolizm kwasu arachidowego i innych kwasów tłuszczowych, przy czym CYP2W1, który występuje w wysokich stężeniach w komórkach nowotworowych HepG2, bierze udział podobnie w aktywacji kancerogennych policyklicznych węglowodorów aromatycznych.

1.3.4. Podrodzina CYP3A

Podrodzina CYP3A stanowi największą ilościowo grupę spośród wszystkich enzymów cytochromu P450. Izoenzymy tej podrodziny CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 oraz ostatnio zidentyfikowany CYP3A43 charakteryzują się zróżnicowanym poziomem ekspresji [Ingelman-Sundberg, 2005; Kuehl i wsp., 2001]. Izofорма CYP3A5 występuje głównie w wątrobie, a także stwierdza się jej obecność w nerkach, płucach, okrężnicy i przełyku [Ding i Kaminsky, 2003; Burk i Wojnowski, 2004]. Aktywność genu CYP3A5 zanotowano u ok. 33% dorosłych osobników rasy białej i u 60% Amerykanów pochodzenia afrykańskiego.

Izoforma ta wykazuje specyficzność substratową wysoce podobną względem CYP3A4, jednakże zdolność katalityczna tego enzymu może być czasami niższa [Wrighton i wsp., 1990; Williams i wsp., 2002]. W przypadku CYP3A7, ekspresja tego genu zachodzi w wieku płodowym [Kitada i Kamataki, 1994; Hakkola i wsp., 2001], a zanika po urodzeniu [Schuetz i wsp., 1994]. Tylko u niewielkiej grupy dorosłych osobników stwierdza się obecność mRNA CYP3A7 [Kuehl i wsp., 2001; Sata i wsp., 2000]. Izoenzym ten odgrywa istotną rolę w okresie płodowym w reakcjach hydroksylacji wielu substancji endogennych, m.in. kwasu retinowego i hormonów steroidowych, zapewniając prawidłowy rozwój embrionalny [de Wildt i wsp., 1999; Hines i McCarver, 2002]. W metabolizmie leków, rola tej izoformy nie została jeszcze poznana. W Tabeli 7 dokonano zestawienia poszczególnych izoenzymów podrodziny CYP3A z uwzględnieniem pewnych różnic w dystrybucji tkankowej w stosunku do powyższej prezentowanej charakterystyki wspomnianych enzymów, co wskazuje na niejednoznaczne wyniki doniesień literaturowych.

Tabela 7. Izoenzymy podrodziny CYP3A [Tomaszewski i wsp., 2008]

IZOENZYM	LICZBA IZOFORM	MASA CZĄSTECZKOWA (kDa)*	LICZBA RESZT AMINOKWASOWYCH*	LOKALIZACJA KOMÓRKOWA	ROZMIESZCZENIE TKANKOWE
CYP3A4	18	57.3	502	ER	Hepatocyty; komórki parenchymatyczne prostaty i nerek; komórki błony śluzowej jelita
CYP3A5	7	57.1	502	ER (M?)	Hepatocyty; komórki parenchymatyczne prostaty
CYP3A7	3	57.5	503	ER (M?)	Hepatocyty; komórki parenchymatyczne prostaty i nerek; komórki błony śluzowej jelita; kardiomiocyty
CYP3A43	3	55.0	504	ER	Hepatocyty; komórki parenchymatyczne prostaty, jąder, nerek i trzustki; miocyty mięśni szkieletowych

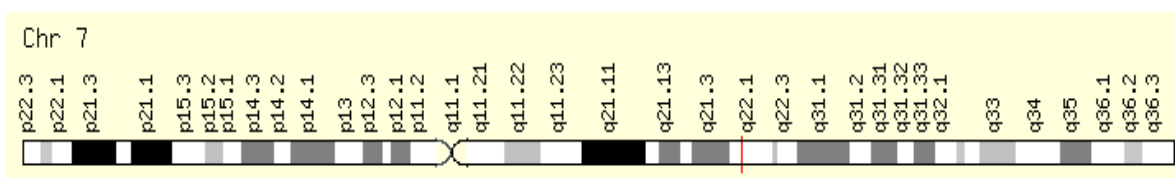
ER- retikulum endoplazmatyczne, M – mitochondrium, ? – dane wymagają weryfikacji, *Masa molekularna i liczba reszt aminokwasowych w łańcuchu polipeptydowym dla białka typu dzikiego.

1.3.4.1. Izoforma CYP3A4

Izoenzym CYP3A4 stanowi około 30-40% frakcji wszystkich enzymów cytochromu P450 w wątrobie [Shimada i wsp., 1994; Imaoka i wsp., 1996], przy czym istotne stężenie tej

izoformy zaobserwowano także w jelicie cienkim [Paine i wsp., 2006; Rostami-Hodjegan i Tucker, 2007]. W odróżnieniu od innych cytochromów P450 z rodziny CYP3 istnieją doniesienia, iż u dorosłych nie stwierdzono ekspresji CYP3A4 w nerkach, jądrach i tarczycy, natomiast bardzo niski poziom mRNA tej izoformy w wątrobie zaobserwowano w okresie prenatalnym [Guengerich i wsp., 2005; de Wildt i wsp., 1999]. Ponadto, wykazano również występowanie tej izoformy w wysokim stężeniu w niektórych komórkach nowotworowych. Jednakże doniesienia te są sprzeczne, ponieważ czasami jej ekspresja jest stosunkowo niższa w tych komórkach w porównaniu do zdrowych [Mathijssen i Schaik, 2006].

Gen kodujący CYP3A4 zlokalizowany jest u człowieka na długim ramieniu chromosomu 7q22.1 i odpowiada za ekspresję enzymu uczestniczącego w metabolizmie ponad 50% leków stosowanych klinicznie (Rycina 7) [Bertz i Granneman, 1997].



Rycina 7. Lokalizacja genu CYP3A4 na chromosomie 7 (7q22.1) [wg <http://www.genecards.org/>]

Substratami dla tego enzymu są leki o właściwościach lipofilowych oraz endogenne substancje, takie jak: testosteron, progesteron i androstenodion [Pelkonen i wsp., 1998; Guengerich, 1999]. Ze względu iż izoforma ta występuje w dużych ilościach w ścianie jelita oraz w wątrobie, leki stosowane doustnie, które są substratami dla tego izoenzymu, przed wchłonięciem podlegają intensywnemu metabolizmowi w przewodzie pokarmowym, a następnie w wątrobie zanim dostają się do krwiobiegu (tzw. efekt I przejścia). Skutkiem tego działania jest ich mała dostępność biologiczna, co przekłada się na obniżony efekt terapeutyczny stosowanych leków.

Biotransformacja większości leków przy udziale CYP3A4 zachodzi głównie poprzez reakcje hydroksylacji, N-dealkilacji i N-dechloracji, przy czym hydroksylacji ulegają głównie alifatyczne fragmenty cząsteczek a także ugrupowania benzytowe. Natomiast przemiany polegające na N-dealkilacji zachodzą w przypadku leków, takich jak: erytromycyny, lidokainy, diltiazemu i tamoksyfenu [Johnson, 2005; Spatzenegger i Jaeger, 1995]. W przypadku metabolizmu substancji endogennych z udziałem CYP3A4, izoforma ta przeprowadza klasyczną reakcję 6 β -hydroksylację testosteronu. Jednak należy zaznaczyć, iż istotność fizjologiczna tej reakcji jak i hydroksylacji innych steroidów nie jest jednoznaczna

[Guengerich, 2005a]. Ponadto CYP3A4 aktywuje również prokancerogeny, np. aflatoksynę B₁, PAH, 6-aminochryzynę oraz substancje toksyczne obecne w dymie nikotynowym [Yamazaki i wsp., 1995; Sakuma i wsp., 2009]. Izoforma ta jest indukowana w ludzkich hepatocytach, m.in. przez ryfampicynę [Morel i wsp., 1990], deksametazon [Pichard i wsp., 1992; Schuetz i wsp., 1993; Kocarek i wsp., 1995] i fenobarbital [Schuetz i wsp., 1993; Kocarek i wsp., 1995]. W modelu *in vivo* wykazano, że ryfampicyna i barbiturany powodują indukcję CYP3A4 w wątrobie [Perrot i wsp., 1989; Ged i wsp., 1989], przy czym ryfampicyna powoduje również wzrost aktywności tej izoformy w jelicie cienkim [Kolars i wsp., 1992]. Indukcja CYP3A4 regulowana jest głównie poprzez receptor pregnanu X (PXR) [Lehmann i wsp., 1998; Moore i wsp., 2000a], konstytutywny receptor androstanu (CAR), pośrednio przez receptor glukokortykoidowy (GR) [Sueyoshi i wsp., 1999; Pascussi i wsp., 2000a; Moore i wsp., 2000a], jak również poprzez hepatocytowy czynnik jądrowy HNF4 α , aktywowany kwasami tłuszczowymi, który może regulować konstytutywną ekspresję PXR i CAR (Tabela 8) [Hara i Adachi, 2002].

Tabela 8. Indukcja enzymu CYP3A4 u człowieka *in vivo* przez ksenobiotyki

INDUKTOR	RECEPTOR	PIŚMIENNICTWO
Ryfampicyna	PXR	Anglicheau i wsp., 2003
Rifabutin	PXR	Asimus i wsp., 2007
Aprepitant	PXR	Dailly i wsp., 2006
Bosentan	PXR	Darwish i wsp., 2008
Ritonawir	PXR	Dingemanse i van Giersbergen, 2004
St. John's wort	PXR	Fellay i wsp., 2005
Karbamazepina	CAR	Kuypers i wsp., 2004
Efawirenz	CAR	Luo i wsp., 2004
Newirapina	CAR	McCune i wsp., 2000
Barbiturany (fenobarbital, inne)	CAR/PXR	Mildvan i wsp., 2002
Fenytoina	CAR/PXR	Mouly i wsp., 2002
Deksametazon	PXR/GR	Perucca i wsp., 1998
Metyloprednizolon	PXR/GR	Robertson i wsp., 2002
Prednizolon	PXR/GR	Shadle i wsp., 2004
Artemisinin	PXR/CAR	Solas i wsp., 2004
Metamizol	Nie /znany	Staiger i wsp., 1983
Modafinil	Nie znany	van Duijnhoven i wsp., 2003 Watkins i wsp., 1989

Badania dowodzą, że wykryto trzy warianty alleli dla genu CYP3A4, przy czym alleliczny wariant dotyczący sekwencji 5'–flankującej powiązано z rakiem prostaty [Rebbeck i wsp., 1998] i leukemią [Felix i wsp., 1998]. Jednakże znaczenie funkcjonalne tej zmienności nie zostało dotychczas w pełni wyjaśnione.

1.3.4.2. Kliniczne znaczenie interakcji lekowych z udziałem CYP3A4

Interakcje farmakokinetyczne dotyczące hamowania aktywności izoenzymu CYP3A4 mają istotny wpływ na bezpieczeństwo farmakoterapii. Dostępność biologiczna doustnie podawanych leków (np. statyn, blokerów kanałów wapniowych), będących substratami CYP3A4, znacznie wzrasta przy jednoczesnym stosowaniu inhibitorów tego enzymu (Tabela 9).

Tabela 9. Przykładowe substraty, inhibitory i induktory enzymu CYP3A4

ZESTAWIENIE WYBRANYCH SUBSTANCJI SYNTETYCZNYCH	
Substraty	<ul style="list-style-type: none"> ▪ leki antyarytmiczne (chinidyna, propafenon) ▪ blokery kanałów wapniowych (nifedypina, diltiazem, werapamil) ▪ statyny (lowastatyna, simwastatyna, z wyjątkiem fluwastatyny) ▪ steroidy (hydrokortyzon) ▪ benzodiazepiny (midazolam, alprazolam, triazolam) ▪ pochodne dihydropirydyny (nikardypina, felodypina) ▪ inhibitory proteaz (indinawir, ritonawir) ▪ antagoniści receptorów angiotensyny I (losartan) ▪ leki przeciwnowotworowe (cyklofosfamid, ifosfamid, tamoksyfen) ▪ leki przeciwbólowe (metadon) ▪ leki przeciwdepresyjne (sertralina, fluoksetyna, fluwoksamina) ▪ leki przeciwpadaczkowe (tiagabina) ▪ leki immunosupresyjne (cyklosporyna, takrolimus) ▪ inne (astemizol, erytromycyna)
Inhibitory	<ul style="list-style-type: none"> ▪ antybiotyki makrolidowe (erytromycyna, klarytromycyna, nie azytromycyna), ▪ azolowe leki przeciwgrzybiczne (ketokonazol, mikonazol) ▪ dihydropirydynowe blokery kanałów wapniowych ▪ inhibitory wychwytu zwrotnego serotoniny (fluoksetyna, fluwoksamina, paroksetyna) ▪ chinoliny (ciprofloksacyna, norfloksacyna) ▪ inhibitory proteaz ▪ inne (cymetydyna, ranitydyna)
Induktory	<ul style="list-style-type: none"> ▪ barbiturany (fenobarbital) ▪ glukokortykoidy (deksametazon, prednizon) ▪ izoniazyd ▪ ryfampicyna

[Omieciński i wsp., 1995; Rendic i DiCarlo, 1997; de Wildt i wsp., 1999; Gawrońska – Szklarz, 2000; Ingelman-Sundberg, 2001; Pelkonen i wsp., 2008]

Silnymi inhibitorami izoenzymu CYP3A4 są także flawonoidy (naringinina i naringina) oraz furanokumaryny (bergamotyna) zawarte w soku grejpfrutowym [Lown i wsp., 1997; Edwards i wsp., 1996; Ameer i Weintraub, 1997; Zaidenstein i wsp., 2001]. W badaniach eksperymentalnych wykazano, że sok grejpfrutowy w znacznym stopniu hamuje metabolizm w jelicie cienkim, m.in. felodypiny, cyklosporyny, lowastatyny, poprzez zahamowanie aktywności CYP3A4, nasilając działanie farmakologiczne, jak i niepożądane stosowanych klinicznie leków [Ameer i Weintraub, 1997]. Należy podkreślić, że zjawisko inhibicji enzymatycznej jest często wykorzystywane w celu zwiększania dostępności biologicznej leków syntetycznych oraz zmniejszenia kosztów zastosowanej farmakoterapii. W tym przypadku stosując taką terapię, należy kontrolować stężenie leku we krwi, ponieważ ma to istotne znaczenie dla leków o wąskim współczynniku terapeutycznym lub wywołujących niebezpieczne działania niepożądane. W Tabeli 10 przedstawiono wybrane interakcje lekowe w wyniku zmiany aktywności enzymu CYP3A4, które mogą mieć istotne znaczenie kliniczne.

Tabela 10. Kliniczne znaczenie wybranych interakcji lekowych z udziałem enzymu CYP3A4 [Grosman i wsp., 1999]

SUBSTRAT	INHIBITOR	PRZECIWSKAZANIA
alprazolam	fluoksetyna fluwoksamina	zmniejszyć dawki początkowe o 50-70%; kontrola senności, zawroty głowy, ataksja; zmniejszyć dawkę alprazolamu
	sok grejpfrutowy?	teoretycznie może zachodzić interakcja
	indinawir nelfinawir ritonawir sakwinawir	interakcja opóźniona zmniejszyć dawkę
	nefazodon	zaburzenia psychomotoryczne zmniejszyć dawkę
amlodypina	itakonazol ketokonazol	zmniejszyć dawkę CCB o 50%; ryzyko wystąpienia niedociśnienia, zaczerwienienie twarzy, obrzęk
astemizol	erytromycyna klarytromycyna	unikać stosowania
	flukonazol ketokonazol itakonazol	unikać stosowania
	fluoksetyna fluwoksamina sertralina	unikać łącznego stosowania
	sok grejpfrutowy chinina	unikać stosowania >200 ml/dzień unikać stosowania >430 mg/dzień
	indinawir ritonawir sakwinawir	unikać łącznego stosowania

	zafirlukast zileuton	mogą powodować wzrost stężenia astemizolu w osoczu
chinidyna	amiodaron	na początku zmniejszyć dawkę o 30-50%; monitorowanie odstępu QT
	erytromycyna	wzrost poziomu w surowicy; monitorowanie odstępu QT
	itakonazol ketokonazol	30-krotny wzrost poziomu w surowicy po 7 dniach; monitorowanie QRS (częstości skurczu komór)
cyklosporyna	amiodaron	obniża klirens o 50%; monitorowanie poziomu w osoczu i działań niepożądanych
	klarytromycyna erytromycyna	unikać stosowania lub zmniejszenie dawki o 50%
	diltiazem nifedypina nikardypina werapamil	monitorowanie poziomu w osoczu
	flukonazol ketokonazol	rozważyć zmniejszenie dawki o 50% w przypadku rozpoczęcia stosowania leków azolowych; monitorowanie poziomu
	sok grejpfrutowy	unikać stosowania
	indinawir ritonawir sakwinawir	zmniejszyć początkową dawkę o 50%
cyzapryd	klarytromycyna erytromycyna	unikać stosowania
	flukonazol ketokonazol	unikać stosowania
	fluoksetyna fluwoksamina sertralina	unikać łącznego stosowania
	sok grejpfrutowy chinina	unikać stosowania >200 ml/dzień unikać stosowania >430 mg/dzień
	indinawir ritonawir sakwinawir	unikać łącznego stosowania
	zafirlukast zileuton	mogą powodować wzrost stężenia cyzaprydu w osoczu
efawirenz	astemizol	unikać stosowania
	cyzapryd	unikać stosowania
	midazolam triazolam	nie stosować z efawirenzem
erytromycyna	ritonawir	nudności, wymioty; zmniejszenie początkowej dawki erytromycyny o 50%
felodypina	erytromycyna	nudności, wymioty, obrzęk; redukcja początkowej dawki CCB o 50%
	sok grejpfrutowy	nudności, wymioty, obrzęk; redukcja początkowej dawki CCB o 50%
	ritonawir	nudności, wymioty, obrzęk; redukcja początkowej dawki CCB o 50%
indinawir	ketokonazol	wzrost wartości AUC

karbamazepina	klarytromycyna erytromycyna	zmniejszyć dawkę karbamazepiny o 25%
	indinawir ritonawir sajwinawir	zmniejszyć dawkę początkową o 50% monitorowanie poziomu w osoczu
	werapamil	monitorowanie poziomu w osoczu i jeżeli konieczne, obniżyć dawkę
klozapina	fluwoksamina	unikać łącznego stosowania
lowastatyna	cyklosporyna	monitorowanie poziomu cyklosporyny; ryzyko wystąpienia miopatii
	erytromycyna	unikać stosowania; miopatia
midazolam	fluwoksamina	zmniejszyć dawkę początkową o 50-75%
nikardypina	ketokonazol	zmniejszyć dawkę początkową CCB o 50%
symwastatyna	klarytromycyna erytromycyna	ryzyko wystąpienia miopatii
	cyklosporyna	początkowa dawka symwastatyny 5 mg; ryzyko wystąpienia miopatii
	ittrakonazol	ryzyko wystąpienia miopatii
takrolimus	nikardypina nifedypina	monitorowanie poziomu takrolimusu
triazolam	fluwoksamina nefazodon	zmniejszyć dawkę początkową o 50-75%
	flukonazol ittrakonazol ketokonazol	unikać łącznego stosowania
	werapamil	sok grejpfrutowy
warfaryna (R-izomer)	azytromycyna klarytromycyna erytromycyna	mogą podwyższać poziom wskaźnika INR u pacjentów w wieku podeszłym w przypadku stosowania >1 g/dzień
	cymetydyna	może podwyższać poziom wskaźnika INR
	flukonazol ittrakonazol ketokonazol	mogą powodować 2-3-krotny wzrost wskaźnika INR

CCB - bloker kanału wapniowego

Indukcja CYP3A zwiększa metabolizm substancji stanowiącej substrat tego enzymu, co w konsekwencji może prowadzić nie tylko do osłabienia efektu terapeutycznego stosowanych leków, ale również może wywołać proces zapalny wątroby. Zaobserwowano, że osoby przyjmujące przewlekle dziurawiec zwyczajny (*Hypericum perforatum*) mają obniżoną skuteczność terapeutyczną cyklosporyny, co prowadzi często do odrzutu przeszczepionego narządu [Ruschitzka i wsp., 2000]. Wynika to z obecności substancji aktywnej – hiperforyny, która jest silnym induktorem izoenzymu CYP3A4 i może w istotny sposób zmniejszać

skuteczność terapeutyczną leków stosowanych łącznie z dziurawcem zwyczajnym [Hennessy i wsp., 2002]. Poniżej w Tabeli 11 przedstawiono wybrane interakcje typu lek-lek, prowadzące do obniżenia efektu terapeutycznego leków stosowanych klinicznie w poprzez indukcję CYP3A.

Tabela 11. Przykładowe interakcje lek-lek poprzez indukcję CYP3A [Grosman i wsp., 1999; Plant, 2007]

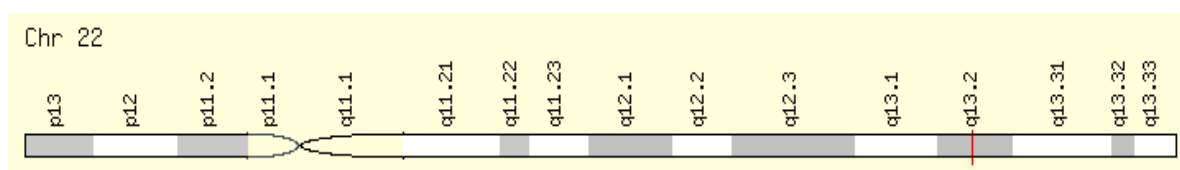
INDUKTOR	LEK	EFEKT KLINICZNY
Fenytoina	Felbamat	↑ Klirens
St. John's wort	Indinawir	↓ AUC, ↓ C _{max}
St. John's wort	Cyklosporyna	↓ Poziom w osoczu
Ryfampicyna	Cyklosporyna	↓ Poziom w osoczu
Ryfampicyna	Chinidyna	↑ Klirens
Ryfampicyna	Efawirenz	↓ AUC
Troglitazon	Terfenadyna	↓ Poziom w osoczu
Fenobarbital	Werapamil	↑ Klirens

1.3.5. Podrodzina CYP2D

Podrodzina CYP2D u człowieka posiada jeden gen CYP2D6 i cztery pseudogeny [Nelson i wsp., 1996]. Katalizuje reakcje monooksygenacji różnych substancji syntetycznych obejmując: antydepresanty (dezypramina), β -blokery (propranolol), leki antyarytmiczne (sparteina) oraz inne, takie jak deksstrometorfan i metadon [Hiroi i wsp., 2002]. Istotny jest również fakt, iż CYP2D6 był pierwszą poznaną izoformą wykazującą polimorfizm, przy czym dane odnośnie indukcji CYP2D nie zostały dotychczas poznane.

1.3.4.3. Izofорма CYP2D6

Izoenzym CYP2D6 stanowi około 4% frakcji wszystkich enzymów cytochromu P450 w wątrobie [Zuber i wsp., 2002; Madani i wsp., 1999]. Gen kodujący CYP2D6 zlokalizowany jest u człowieka na długim ramieniu chromosomu 22q13.1 (Rycina 8) [Mathijssen i Schaik, 2006].



Rycina 8. Lokalizacja genu CYP2D6 na chromosomie 22 (22q13.1) [wg <http://www.genecards.org>.]

Cytochrom CYP2D6 ulega ekspresji głównie w hepatocytach, ale również w komórkach płuc oraz w mózgu [Pelkonen i Raunio, 1997]. Jednakże, istnieją kontrowersyjne doniesienia literaturowe o jego aktywności na różnych etapach ontogenezy człowieka. Wcześniejsze badania eksperymentalne donoszą o najwyższym stężeniu tego enzymu krótko po urodzeniu, podczas gdy nowsze wskazują na brak różnic w stężeniu podczas pierwszego roku życia [Blake i wsp., 2007].

Izoforma CYP2D6 zwana także hydroksylazą typu debryzochiny/sparteiny katalizuje oksydację ponad 25% wszystkich stosowanych w praktyce klinicznej leków [Kroemer i Eichelbaum, 1995; Priori i wsp., 1999; Evans i Relling, 1999]. Enzym ten przeprowadza biotransformację leków głównie poprzez reakcje hydroksylacji i dealkilacji [Frank i wsp., 2007; Rendic, 2002; Guengerich, 2005a]. W Tabeli 12 zaprezentowano wybrane reakcje monooksygenacji katalizowane przez CYP2D6 w zależności od struktury chemicznej stosowanych substratów dla powyższego enzymu.

Tabela 12. Wybrane reakcje katalizowane przez CYP2D6 [Tomaszewski i wsp., 2008]

REAKCJE	SUBSTRAT
N-oksydacja	Meksyletyna
S-oksydacja	Tiorydazyna
O-dealkilacja	Kodeina
S-dealkilacja	6-Metylotiopuryna
Deaminacja	Amfetamina
Desufurylacja	Tiopental
Hydroksylacja	Amitryptylina, imipramina

Na podstawie analizy pod względem struktury substratów dla CYP2D6 zaobserwowano, że większość leków syntetycznych zawiera zasadowy atom azotu ($pK_a > 8$), występujący w fizjologicznym pH w postaci sprotowanej [Smith i wsp., 1997; Guengerich, 2005a]. Ma to istotne znaczenie w przypadku specyficzności substratowej tego izoenzymu polegającej na oddziaływaniu par jonowych pomiędzy obdarzonym dodatnim ładunkiem atomu azotu, a cząsteczką kwasu asparaginowego (Asp301) w centrum aktywnym. Ze względu, iż większość substratów CYP2D6 posiada właściwości zasadowe, wartość pK_a powinna mieć decydujący wpływ na ich reaktywność. Jednakże obserwowane są także różnice w powinowactwie do izoenzymu, będące wynikiem oddziaływań hydrofobowych lub typu Π - Π poza centrum aktywnym. Istnieją doniesienia, że ważną rolę w centrum aktywnym CYP2D6 odgrywa Glu216, przy czym inne sugestie wskazują na istotny udział

Asp301 w tworzeniu wiązania wodorowego z Phe120, który to aminokwas może być zaangażowany w oddziaływania hydrofobowe z substratem. Ponadto substratami dla CYP2D6 są również związki nie posiadające zasadowego atomu azotu (ritonawir, spiro sulfonamid), w tym testosteron i inne steroidy. Chociaż wykazano, że CYP2D6 ma niewielki udział w przemianach leków przeciwnowotworowych to jednak znacząco wpływa na efektywność leczenia nowotworu piersi za pomocą tamoksyfenu [Mathijssen i Schaik, 2006]. Wykazano, że około 90% tego leku przeciwnowotworowego jest metabolizowane przez CYP3A4/5 do nieaktywnej formy, jaką jest N-demetylotamoksyfen, podczas gdy tylko około 10% ulega metabolizmowi z udziałem CYP2D6 do aktywnego przeciwnowotworowo produktu, 4-hydroksytamoksyfenu. Izoenzym CYP2D6 przekształca także nieaktywną pochodną N-demetylotamoksyfenu do produktu 4-hydroksy-N-demetylotamoksyfenu o działaniu antyestrogennym, jak również wykazuje właściwości terapeutyczne w stosunku do komórek nowotworu piersi. Inny szlak metabolizmu tego leku katalizuje CYP3A4/5, prowadząc do powstania α -hydroksytamoksyfenu, który to metabolit jest odpowiedzialny za istotne kancerogenne działanie uboczne.

CYP2D6 wykazuje polimorfizm genetyczny, który ma istotne znaczenie kliniczne pod względem metabolizowanych leków. Dotychczas zidentyfikowano ponad 70 alleli genu CYP2D6, występujących z różną częstością w populacjach etnicznych [Ikenaga i wsp., 2005; Beverage i wsp., 2007; Ingelman-Sunberg i wsp., 2007a]. Niektóre warianty alleliczne tego genu powodują zahamowanie syntezy aktywnego białka i brak enzymu CYP2D6, natomiast inne redukują jego aktywność metaboliczną lub nie mają wpływu na fenotyp. W populacji ludzkiej wyróżnia się co najmniej 2 fenotypowo odmienne grupy pod względem aktywności CYP2D6:

- ekstensywni metabolizerzy (EM – ang. *extensive metabolizers*) – osoby, które w znacznym stopniu dobrze metabolizują leki i można im podawać standardowe dawki leków stosowane w praktyce
- słabi metabolizerzy (PM – ang. *poor metabolizers*) - osoby z defektem enzymatycznym, które bardzo słabo metabolizują lub w ogóle nie metabolizują leki.

Fenotyp PM, który posiada zmutowane allele genu CYP2D6, występuje w populacji kaukaskiej z częstością ok. 5-14% [Zhou i wsp., 2009]. Do najczęściej spotykanych wariantów odpowiedzialnych za upośledzoną eliminację substratów CYP2D6 należą w naszej populacji takie allele jak: CYP2D6*4 (mutacja punktowa G1934A), CYP2D6*3 (delecja

A2637) oraz CYP2D6*5 (delecja całego genu) [Kroemer i Eichelbaum, 1995; Koytchev i wsp., 1998]. Konsekwencją upośledzonego utleniania u osób z fenotypem PM jest nasilone działanie leków metabolizowanych przez CYP2D6 i zwiększenie ryzyka wystąpienia interakcji [Brosen, 1990; Clark, 1985; Eichelbaum, 1982]

Należy zwrócić uwagę, że większość leków syntetycznych stosuje się przewlekle, co przy zmniejszonym klirensie może prowadzić do ich nadmiernej kumulacji w organizmie i nasilenia działań niepożądanych, w tym nawet toksycznych. Znane są także przypadki duplikacji oraz zwielokrotnienia kopii tego genu (≥ 12 kopii) [Dalen i wsp., 1999; Johansson i wsp., 1993], które prowadzą do powstania ultraszybkiego fenotypu (UM, ang. *ultrarapid metabolizers*). Osoby ze zwiększoną liczbą kopii CYP2D6 na jednym allelu wykazują wzrost metabolizmu leków będących substratami CYP2D6 i obniżenie ich efektu terapeutycznego. Taka grupa ultraszybkich metabolizerów wymaga podawania kilkakrotnie większych dawek leków, w celu osiągnięcia pożądanego efektu leczniczego [Dalen i wsp., 1999; Ingelman-Sundberg i wsp., 2007b]. Częstość występowania ultraszybkiego fenotypu ocenia się na 5,5% w populacji kaukaskiej [Ingelman-Sundberg i wsp., 2005b], natomiast u Etiopian wartość ta sięga powyżej 39% [Aklillu i wsp., 1996] Postuluje się, że duplikacje genu CYP2D6 są sposobem adaptacji względem istotnej zawartości chemicznych zanieczyszczeń, a w większości przypadków prawdopodobnie względem alkaloidów zawartych w diecie [Ingelman-Sundberg i wsp., 1999]. Ponadto istnieją doniesienia wskazujące na związek pomiędzy niską aktywnością CYP2D6 a wzrostem toksyczności wybranych leków oraz wzrostem ryzyka zachorowań na chorobę Parkinsona. W oparciu o dane literaturowe, postuluje się również, że polimorfizm genu CYP2D6 może mieć wpływ na ryzyko wystąpienia raka płuc poprzez modulację paleniem tytoniu, jak również może być zaangażowany w sygnał transdukcji szlaku dopaminergicznego w mózgu [Rostami-Hodjegan i wsp., 1998; Saarikoski i wsp., 2000]. Powyższy postulat może wynikać z działania enzymu CYP2D6, ze względu iż odgrywa istotną rolę w aktywacji nitrozamin, charakterystycznych dla tytoniu substancji kancerogennych, np. TSNA (ang. *Tabacco-specific nitrosamines*), które zwiększają ryzyko rozwoju raka płuc [Crespi i wsp., 1991; Hecht, 1998].

1.3.5.2. Kliniczne znaczenie interakcji lekowych z udziałem CYP2D6

Aktywność izoenzymów CYP2D6 może być modulowana zarówno przez substancje egzogenne jak i endogenne, które mogą indukować powyższą izoformę bądź hamować. Dzięki intensywnym badaniom poznano i opisano wiele syntetycznych inhibitorów izoenzymu CYP2D6, które uwzględniono w Tabeli 13.

Tabela 13. Przykładowe substraty, inhibitory i induktory enzymu CYP2D6

ZESTAWIENIE WYBRANYCH SUBSTANCJI SYNTETYCZNYCH	
Substraty	<ul style="list-style-type: none"> ▪ neuroleptyki (risperidol, haloperidol, tiorydazyna) ▪ leki przeciwdepresyjne (amitryptylina, paroksetyna) ▪ leki przeciwbólowe (kodeina, tramadol) ▪ leki antyarytmiczne (enkainid, meksyletyna) ▪ β-blokery (tymolol, metoprolol, propranolol) ▪ leki przeciwnadciśnieniowe (guanoksan) ▪ leki przeciwhistaminowe (klemastyna, hydroksyzyna, difenhydramina) ▪ leki z grupy H₂ blokerów (cymetydyna, ranitydyna) ▪ inne (dekstrometorfan, tamoksyfen, tiklopidyna)
Inhibitory	<ul style="list-style-type: none"> ▪ niektóre leki antyarytmiczne (chinidyna, propafenon, amiodaron) ▪ selektywne inhibitory wychwytu zwrotnego serotoniny (paroksetyna, fluoksetyna, sertralina) ▪ neuroleptyki (chlorpromazyna, triflupromazyna, chlorprotyksen) ▪ inne (cymetydyna, difenhydramina, hydroksychlorochina, celekoksyb)
Induktory	Nie określono

[Kroemer i Eichelbaum, 1995; Evans i Relling, 1999; Ingelman-Sundberg, 2005a,b; Bernard i wsp., 2006; Pelkonen i wsp., 2008; Tomaszewski i wsp., 2008; <http://medicine.iupui.edu/flockhart/table.htm>]

Chinidyna jest selektywnym i bardzo silnym inhibitorem CYP2D6, ponieważ niewielkie dawki tego związku dołączone do leku podlegającego polimorficznej oksydacji z udziałem CYP2D6 sprawiają, że osoba z fenotypem EM zachowują się jak PM. Ma to istotne znaczenie kliniczne, szczególnie w leczeniu skojarzonym, np. chorób układu sercowo-naczyniowego [Caracao, 1998; Rendic i DiCarlo, 1997]. Kompetywnymi inhibitorami izoenzymu CYP2D6 są także związki zawarte w soku grejpfrutowym, m.in. bergamotyna, 6',7-dihydroksybergamatyna, bergapten, 5 i 7 geranyloksykumaryna, które znacznym stopniu hamują aktywność powyższego enzymu, nasilając działanie farmakologiczne, jak i niepożądane stosowanych leków będących jego substratami. Dotychczas nie wykryto

natomiast związków, które wykazywałyby silny indukujący wpływ na aktywność CYP2D6 [Tomaszewski i wsp., 2008].

Metabolizmowi wątrobowemu przy udziale enzymu CYP2D6 ulegają przede wszystkim β -blokery lipofilne (propranolol, metoprolol, timolol), które wchodzi w interakcje z innymi lekami będącymi inhibitorami lub kompetytywnymi substratami tej izoformy [Flockhart i Tanus-Santos, 2002; Głównyńska i Opolski, 2005]. W przypadku β -blokerów hydrofilnych, które w większości w postaci niezmienionej wydalane są przez nerki, wchodzi one rzadziej w interakcje metaboliczne [Głównyńska i Opolski, 2005]. Innym przykładem może być fluoksetyna będąca inhibitorem izoenzymu CYP2D6. Wykazano, że stosowanie leków o wąskim indeksie terapeutycznym, metabolizowanych głównie przez cytochrom CYP2D6 (np. winblastyna, karbamazepina, trójpierscieniowe leki przeciwdepresyjne) równocześnie z fluoksetyną lub nawet do 5-tego tygodnia po jej odstawieniu, może wymagać zmniejszenia dawki tych leków, ze względu na długi okres jej półtrwania. W związku z tym, inhibicja enzymatyczna może mieć istotne znaczenie kliniczne, szczególnie w przypadku stosowania leków o wąskim współczynniku terapeutycznym będących substratami CYP2D6, ponieważ może prowadzić do wystąpienia działań niepożądanych, a nawet toksycznych (Tabela 14).

Tabela 14. Kliniczne znaczenie wybranych interakcji lekowych z udziałem enzymu CYP2D6 [Grosman i wsp., 1999]

SUBSTRAT	SUBSTRAT KONKURUJĄCY	INHIBITOR/INDUKTOR	PRZECIWSKAZANIA
amitryptylina	karbamazepina	induktor	unikac ich łącznego stosowania
	fluoksetyna paroksetyna sertralina	inhibitor	podac niższe dawki w terapii kombinowanej; monitorowanie działań niepożądanych; odczekać 2-4 tyg. po podawaniu fluoksetyny
	ritonawir	inhibitor	może wymagać stosowania niższych dawek początkowych
celekoksyb	inhibitory ACE	inhibitor	teoretycznie możliwość interakcji
dezypramina	cymetydyna	inhibitor	wzrost niepożądanych działań antycholinergiczných
	fluoksetyna paroksetyna sertralina	inhibitor	stosować niższe dawki w terapii kombinowanej; monitorowanie działań niepożądanych; odczekać 4-5 tyg. po podawaniu fluoksetyny
	chinidyna	inhibitor	monitorowanie objawów toksyczności dezypraminy
	ritonawir	inhibitor	może wymagać stosowania niższej dawki początkowej

doksepina	cymetydyna	inhibitor	wzrost niepożądanych działań antycholinergicznych
flekainid	amiodoran	inhibitor	zmniejszenie dawki flekainidu o 30-50% podczas rozpoczęcia podawania amiodoranu
fluoksetyna	ritonawir	inhibitor	może wymagać zmniejszenia początkowej dawki
haloperidol	fluoksetyna	inhibitor	wzrost poziomu leku w osoczu po 7-10 dniach; monitorowanie działań niepożądanych
	ritonawir	inhibitor	może wymagać zmniejszenia początkowej dawki
imipramina	cymetydyna	inhibitor	zwiększone działanie antycholinergiczne; obniżyć dawkę imipraminy o 50%
	fluoksetyna paroksetyna sertralina	inhibitor	stosować niższe dawki w terapii kombinowanej; monitorowanie działań niepożądanych; odczekać 4-5 tyg. po podawaniu fluoksetyny
	chinidyna	inhibitor	monitorowanie objawów toksyczności imipraminy
	ritonawir	inhibitor	może wymagać zmniejszenia początkowej dawki imipraminy
meksyletyna	amiodoran	inhibitor	zmniejszenie dawki o 30-50% podczas rozpoczęcia podawania amiodoranu; obserwowany wielokształtny częstoskurcz komorowy
	chinidyna	inhibitor	metabolizery typu EM mogą mieć wyższy poziom meksyletyny w osoczu; monitorowanie EKG; mogą wystąpić zwiększone działania antyarytmiczne
	ryfampicyna	induktor	unikać ich łącznego stosowania
	ritonawir	inhibitor	może wymagać zmniejszenia początkowej dawki meksyletyny
nortryptylina	fluoksetyna paroksetyna sertralina	inhibitor	stosować niższe dawki w terapii kombinowanej; monitorowanie działań niepożądanych; odczekać 2-4 tyg. po podawaniu fluoksetyny
	chinidyna	inhibitor	teoretycznie możliwość interakcji
paroksetyna	dekstrometorfan	inhibitor	ryzyko wystąpienia syndromu serotoninowego; zmniejszenie dawki dekstrometorfanu
propafenon	chinidyna	inhibitor	monitorowanie EKG; ryzyko wystąpienia toksyczności propafenonu

	ryfampicyna	induktor	kontrolowanie poziomu propafenonu
propranolol	chinidyna	inhibitor	wyższe ryzyko wystąpienia działań niepożądanych u ekstensywnych metabolizerów
	ryfampicyna	induktor	monitorowanie ciśnienia krwi; może wymagać zwiększenia początkowej dawki
trazodon	fluoksetyna paroksetyna	inhibitor	stosować niższe dawki w terapii kombinowanej; ryzyko wystąpienia syndromu serotoninowego; odczekać 4-5 tyg. po podawaniu fluoksetyny

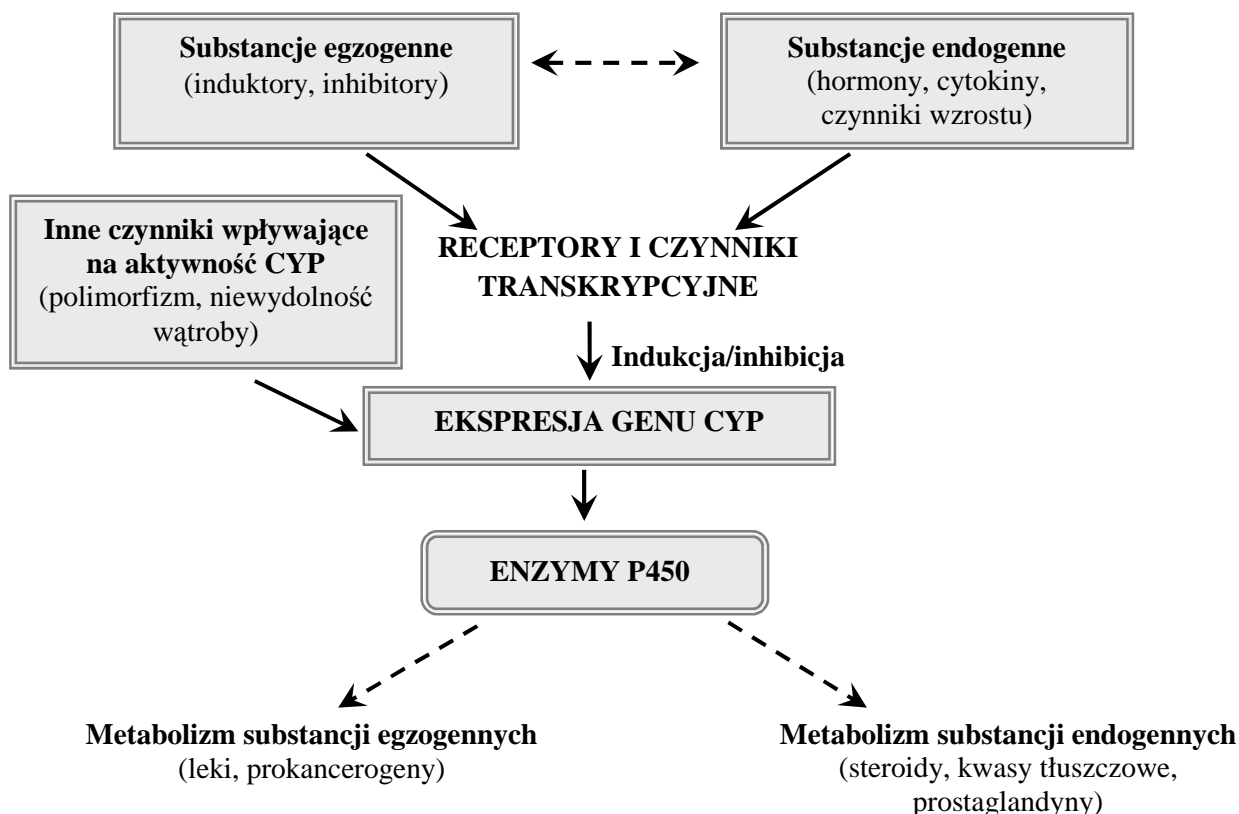
1.4. Regulacja aktywności cytochromu P450

Aktywność wielu izoform cytochromu P450 może wykazywać zmienność wynikającą z polimorfizmu genów kodujących te enzymy lub regulacji poprzez ksenobiotyki, co jest przedmiotem licznych badań naukowych prowadzących do wyjaśnienia mechanizmu biotransformacji substancji egzogennych, szczególnie na podłożu molekularnym. Wynika to z faktu, iż różnice w aktywności izoform CYP w metabolizowaniu wybranych leków i substancji chemicznych mogą mieć istotny wpływ na interakcje typu preparat roślinny-lek syntetyczny, aktywację leków i kancerogenów oraz detoksykację. W ostatnich latach poczyniono znaczne postępy w izolacji i charakterystyce genów kodujących enzymy CYP wskazując na kontrolę ich ekspresji na poziomie transkrypcji. Wykazano, że wiele substancji egzogennych wpływa na aktywność specyficznych receptorów jako ligandy aktywujące czynniki transkrypcyjne. [Whitlock, 1999]. Szczególną uwagę w tym aspekcie zwraca się na możliwość modulacji czynników transkrypcyjnych, takich jak: receptor węglowodorów aromatycznych (AhR – ang. *aromatic hydrocarbon receptor*), konstytutywny receptor androstanu (CAR – ang. *constitutive androstane receptor*), receptor pregnanu X (PXR – ang. *pregnane X receptor*), biorących udział w regulacji ekspresji izoform cytochromu P450 [Waxman, 1999; Honkakoski i Negishi, 2000]. AhR indukuje ekspresję ludzkich CYP1A1, CYP1A2 i CYP1B1 oraz niektórych genów enzymów II fazy metabolizmu. Ligandami AhR są głównie wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (PAH) i organiczne związki chemiczne z grupy dioksyn o bardzo silnych własnościach toksycznych, które jako

kancerogeny mogą powodować większy stopień uszkodzeń DNA u osobników z podwyższonym poziomem CYP1A. Natomiast PXR jak i CAR są czynnikami transkrypcyjnymi biorącymi udział w regulacji ekspresji izoform cytochromu P450, szczególnie z podrodziny CYP3A odpowiedzialnych głównie za metabolizm większości leków stosowanych klinicznie.

Inny możliwy mechanizm regulacji izoform cytochromu P450 polega na tkankowo specyficznej ekspresji tych białek z udziałem czynników transkrypcyjnych, takich jak: C/EBP, HNF4, HNF1, HNF3 i HNF6, które mogą brać udział w ich konstytutywnej ekspresji. Główna rola w tym zakresie przypisywana jest hepatocytowemu czynnikowi jądrowemu HNF1 α , którego stężenie jest regulowane przez HNF4, HNF3 i C/EBP. Wnioskuje się, że efekt aktywacji transkrypcji CYP1A2 i 2E1 jest wynikiem działania HNF1 [Chung i Bresnick, 1995; Liu i Gonzales, 1995]. Natomiast hepatocytowy czynnik jądrowy 4 (HNF4), wiążący się z DNA jako homodimer w regionie motywu HPF1 uczestniczy w regulacji ekspresji enzymów podrodziny CYP2A, CYP3A i CYP2D. Wydaje się również, że HNF4 i motywy HPF1 mogą istotnie oddziaływać na aktywację ludzkich CYP2C9 oraz szczurzych CYP3A [Venepally i wsp., 1992]. Ponadto niektóre badania sugerują, że HNF4 α kontroluje poziom ekspresji genu CYP2D6 [Cairns i wsp., 1996]. Jednakże należy podkreślić, że rola tego czynnika w regulacji ekspresji wymienionych genów nie jest dotychczas w pełni scharakteryzowana.

Molekularny mechanizm odpowiedzialny za ekspresję określonych genów CYP podlega regulacji poprzez czynniki fizjologiczne jak i środowiskowe, wśród których wyróżnia się czynniki indukujące ich własną biotransformację lub metabolizm innych substancji. Istotne jest również stwierdzenie, że konstytutywna ekspresja izoform cytochromu P450 zależy od wewnątrzkomórkowego szlaku sygnałowego związanego z wpływem cytokin, endogennych hormonów i czynników wzrostu oraz przebytych schorzeń wątroby, infekcji i stresu, co uwzględniono na schemacie (Rycina 9) [Vessel, 1988].



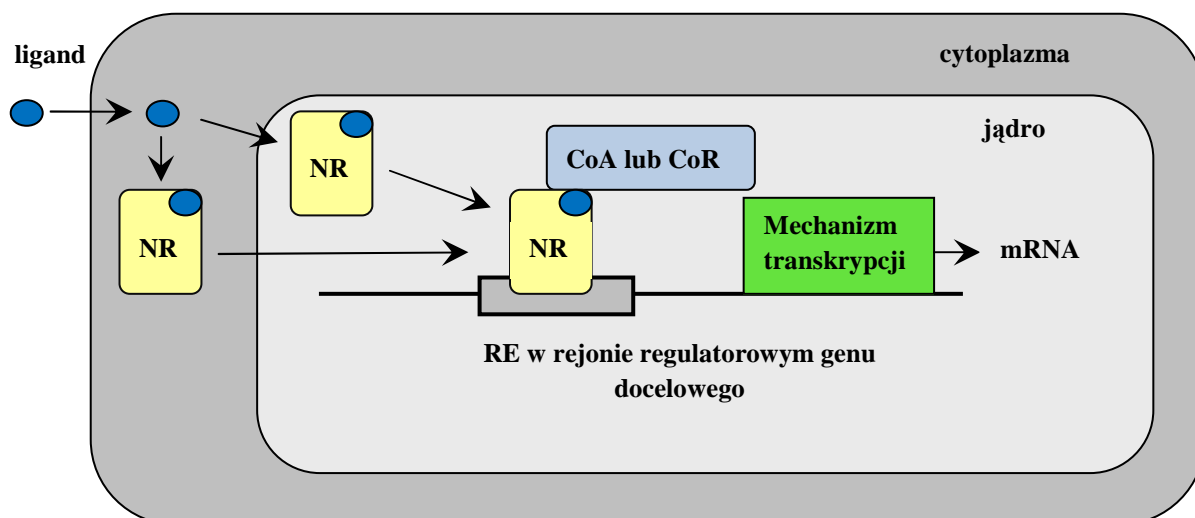
Rycina 9. Wpływ substancji egzogennych i endogennych oraz innych czynników w regulacji ekspresji genów CYP

1.4.1. Receptory jądrowe

Nadrodzina receptorów jądrowych (NRs - ang. *nuclear receptors*,) koduje ponad 48 czynników transkrypcyjnych przekształcające zewnątrzkomórkowe i wewnątrzkomórkowe sygnały w odpowiedź komórkową przez wywołanie transkrypcji genów docelowych [Chawla i wsp., 2001]. Wiele spośród nich wymaga do aktywacji związania małowcząsteczkowych lipofilowych związków, np. hormony steroidowe, pochodne cholesterolu lub ksenobiotyki, które mogą działać jako ligandy dla tych receptorów. W odpowiedzi na obecność tych ligandów, receptory jądrowe regulują ekspresję genów docelowych, dzięki czemu mają wpływ na procesy życiowe związane z reprodukcją, rozwojem i metabolizmem [Chawla i wsp., 2001]. Aktywowane receptory jądrowe przemieszczają się z cytoplazmy do jądra komórkowego, gdzie funkcjonują jako czynniki transkrypcyjne w postaci heterodimerów z receptorem kwasu retinoidowego (RXR), niektóre natomiast działają jako monomery lub homodimery, wiążąc się z charakterystyczną sekwencją nukleotydową w rejonie promotorowym genu docelowego, określanej mianem elementem odpowiedzi

(RE – ang. *response element*). Ponadto receptory jądrowe oddziałują z koaktywatorami (CoA) i korepresorami (CoR), prowadząc do remodelingu chromatyny w celu aktywacji lub hamowania ekspresji genów docelowych (Rycina 10) [Glass i Rosenfeld, 2000; Kopij i Rapak, 2008]. W stanie nieaktywnym receptory związane są z korepresorami, natomiast w wyniku przyłączenia ligandu (agonisty) do receptora zmienia się jego konformacja, co powoduje odłączenie się korepresora. Taka zmiana przestrzenna w budowie umożliwia heterodimeryzację receptora i przyłączenie koaktywatorów, które umożliwiają połączenie kompleksu związanego z promotorem z układem odpowiedzialnym za inicjację procesu transkrypcji [Kopij i Rapak, 2008]. Pod tym względem koaktywatory można sklasyfikować na białka:

- posiadające aktywność acetylazy histonów, które zmieniają ich strukturę i odsłaniają geny podlegające transkrypcji, np. SRC1 i CPB/p300 [Roth i wsp., 2001]
- pośredniczące między dimerem a maszyną polimerazy RNA PBP/TRAP;
- współpracujące w syntezie RNA o słabo poznanej funkcji PGC1, RIP140 i AR70.



Rycina 10. Aktywacja receptora jądrowego przez ligand i regulacja genów docelowych. Agonista indukuje konformację receptora, która ma powinowactwo do koaktywatorów (CoA), w wyniku czego dochodzi do inicjacji transkrypcji poprzez polimerazę RNA. W obecności antagonisty receptor jest stabilizowany w konformacji nieaktywnej i silnie wiąże korepresor powodując, iż zależna od receptora ekspresja genu ulega wyciszeniu.

Schemat molekularnej budowy cząsteczki czynnika transkrypcyjnego stanowi podstawę zakwalifikowania do receptorów jądrowych, natomiast przynależność do poszczególnych klas warunkuje charakter ligandu i sposób dimeryzacji receptora. Pod tym względem do rodziny jądrowych czynników transkrypcyjnych należą:

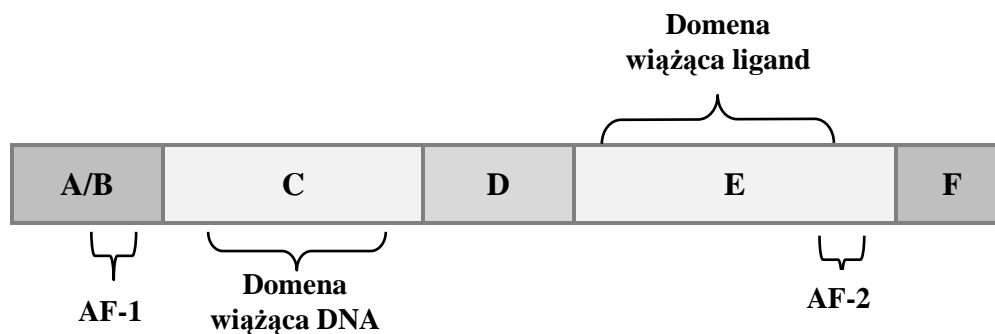
- receptory steroidowe – receptory glukokortykoidowe, estrogenów, progesteronu, witaminy D₃, androgenów i aldosteronu
- receptory niesteroidowe – receptory PPAR, kwasu retinowego RAR, kwasu 9-cis-retinowego RXR, trójiodotyroniny
- receptory sieroce, dla których jak dotychczas nie określono istnienia endogennego ligandu: CAR, SXR/PXR, LXR, FXR.

Receptory te należące do rodziny jądrowych czynników transkrypcyjnych posiadają cztery charakterystyczne domeny funkcjonalne:

- NH₂-końcowa domena A/B – stanowi fragment modulatorowy, zawierający subdomenę AF-1 (ang. *activation function 1*) odpowiedzialną za niezależną od ligandu aktywację transkrypcji i możliwość oddziaływania z komórkowo-swoistymi kofaktorami. Domena ta jest fosforyzowana przez różne kinazy zaangażowane w transdukcję sygnału (MAPK, kinazy zależnej od cytokin), co w znacznym stopniu moduluje aktywność receptora, (domena A/B)
- wysoce konserwatywna domena DBD odpowiedzialna za wiązanie z DNA w miejscu promotorowym genu docelowego. Wiązanie umożliwiają dwie struktury o motywie palców cynkowych, zawierające reszty cysteiny oraz motyw charakterystyczny dla specyficznej sekwencji dsDNA zwanej RE (ang. *response element*) [Freedman, 1992; Schwabe, 1991]. Sekwencja aminokwasów u podstawy pierwszego palca (P box) rozpoznaje motyw DNA, a sekwencja u podstawy drugiego palca (D box) jest zaangażowana w dimeryzację, (domena C)
- domena zawiasowa zawierająca od 35 do 50 reszt aminokwasowych, łączy DBD i LBD, pozwalając na rotację DBD. Mutacje w tym rejonie często uniemożliwiają interakcje z korepresorami, (domena D)
- domena LBD umożliwia wiązanie ligandu, dimeryzację i oddziaływanie z białkami szoku termicznego. Wiązanie ligandów następuje do charakterystycznych kieszeni, co powoduje zmianę konformacji domeny LBD [Moras i Gronemeyer, 1998]. Zawiera również na 12-stej α -helisie subdomenę AF-2 (ang. *activation function 2*) odpowiedzialną za aktywność transkrypcyjną zależną od ligandu, przy czym mutacje

w obrębie tej subdomeny mogą prowadzić do syndromu niewrażliwości na androgeny lub hormony tyroidowe, (domena E)

- domena F o nieznannej funkcji (Rycina 11) [Moras i Gronemeyer, 1998; Kopij i Rapak, 2008].

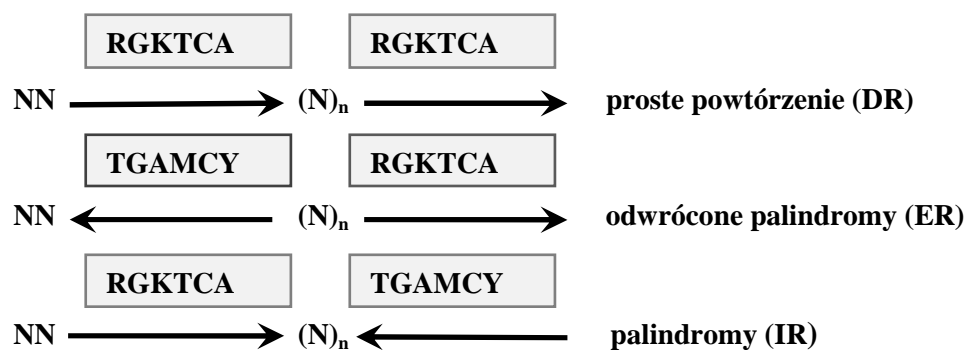


Rycina 11. Schemat struktury receptora jądrowego (NR): domena A/B –zawierająca subdomenę AF-1 odpowiedzialną za niezależną od ligandu aktywację transkrypcji, domena C odpowiedzialna za wiązanie z miejscem promotorowym genu docelowego, domena zawiasowa D, domena E zawierająca subdomenę AF-2 odpowiedzialną za aktywność transkrypcyjną zależną od ligandu, domena F o nieznannej funkcji.

Warto podkreślić, że zdecydowana większość receptorów sierocych posiada wszystkie domeny charakterystyczne dla receptorów jądrowych. Niektóre tylko mają krótkie domeny regulacyjne, np. nie mają AF-1, a wyjątkowo również AF-2. Receptory steroidowe rozpoznają swoistą sekwencję konsensusową AGAACA w rejonie promotorowym genu docelowego, natomiast pozostałe rodzaje receptorów wiążą się z sekwencją AGGTCA. Monomery rozpoznają dodatkowo sekwencję bogatą w A/T zlokalizowaną powyżej sekwencji AGGTCA, co decyduje o specyficznym wiązaniu do DNA.

Receptory jądrowe wiążą się przynajmniej z jednym swoistym miejscem odpowiedzi RE w rejonie regulatorowym genu docelowego inicjując transkrypcję wywołaną ligandem. Specyficzne oddziaływanie pomiędzy białkiem a DNA jest możliwe, dzięki domenie DBD. W tym aspekcie wyróżnia się charakterystyczne motywy RE w promotorze genów docelowych, które są rozpoznawane przez czynniki transkrypcyjne:

- proste powtórzenie (ang. *direct repeat*, DR lub *tandem repeat*) inaczej „głowa do ogona” (ang. *head-to-tail*)
 - odwrócone palindromy (ang. *everted repeat*, ER) lub „ogon do ogona” (ang. *tail-to-tail*)
 - palindromy (ang. *inverted repeat*, IR) lub „głowa do głowy” (ang. *head-to-head*)
- (Rycina 12) [Kopij i Rapak, 2008].



Rycina 12. Motywy RE w promotorze genów docelowych rozpoznawane przez NR. Motyw wiązania, długość oraz odległość sekwencji jest istotna w określaniu specyficzności i skuteczności wiązania NR (N = każdy, R = A lub G, K = G lub T, Y = T lub C, M = A lub C).

Należy zwrócić uwagę, że wpływ NR na ekspresję genów docelowych jest przedmiotem regulacji na etapie wyboru miejsca wiązania z DNA, selektywnej dimeryzacji, wiązania ligandów i koaktywatorów. Niektóre czynniki transkrypcyjne mogą konkurować o te same koaktywatory lub hamować transkrypcję genów przez oddziaływanie z innymi czynnikami transkrypcyjnymi. Badania donoszą, że niektóre NR występują zwykle w cytoplazmie i ulegają translokacji do jądra wyłącznie po związaniu liganda.

1.4.1.1. Receptor pregnanu X (PXR)

Receptor pregnanu X (PXR/SXR) jest receptorem sierocym, który uczestniczy w indukcji CYP3A, CYP2B i wybranych transporterów leków (MRP1) oraz enzymów II fazy metabolizmu leków (SULT, UTG). Bierze udział w transkrypcji CYP3A4 [Bertilsson *i wsp.*, 1998; Blumberg *i wsp.*, 1998; Lehmann *i wsp.*, 1998] i CYP3A7 [Pascussi *i wsp.*, 1999], jak również w regulacji ludzkich karboksylesteraz hCE-1 i hCE-2 [Zhu *i wsp.*, 2000]. Rezultaty ostatnich prac wskazują, iż PXR uczestniczy także w transkrypcji izoform CYP2C8 oraz CYP2C9 [Pascussi *i wsp.*, 2000b]. Receptor pregnanu X podobnie jak CYP3A4, ulega głównie ekspresji w wątrobie i jelitach, gdzie mają miejsce procesy detoksykacji [Bertilsson *i wsp.*, 1998; Blumberg *i wsp.*, 1998; Lehmann *i wsp.*, 1998]. Wykazuje homologię do receptorów jądrowych pod względem obecności funkcjonalnych domen. Ligandami tego receptora są zróżnicowane strukturalnie egzogenne i endogenne związki chemiczne, takie jak: hormony steroidowe i metabolity steroidów (progesteron, estrogen, korytykosteron, 5 β -pregnan i androstanol) [Blumberg *i wsp.*, 1998; Moore *i wsp.*, 2000a] oraz składniki diety m.in. kumestrol [Blumberg *i wsp.*, 1998] i karotenoidy [Pichard-Garcia *i wsp.*, 2000].

Wykazano także, że hiperforyna – składnik St. John's wort - ziołowego preparatu na depresję jest silnym aktywatorem tego receptora [Moore i wsp., 2000b]. Ponadto induktorami PXR są również leki syntetyczne, które zamieszczono poniżej w Tabeli 15.

Tabela 15. Przykładowe leki syntetyczne aktywujące ludzki PXR

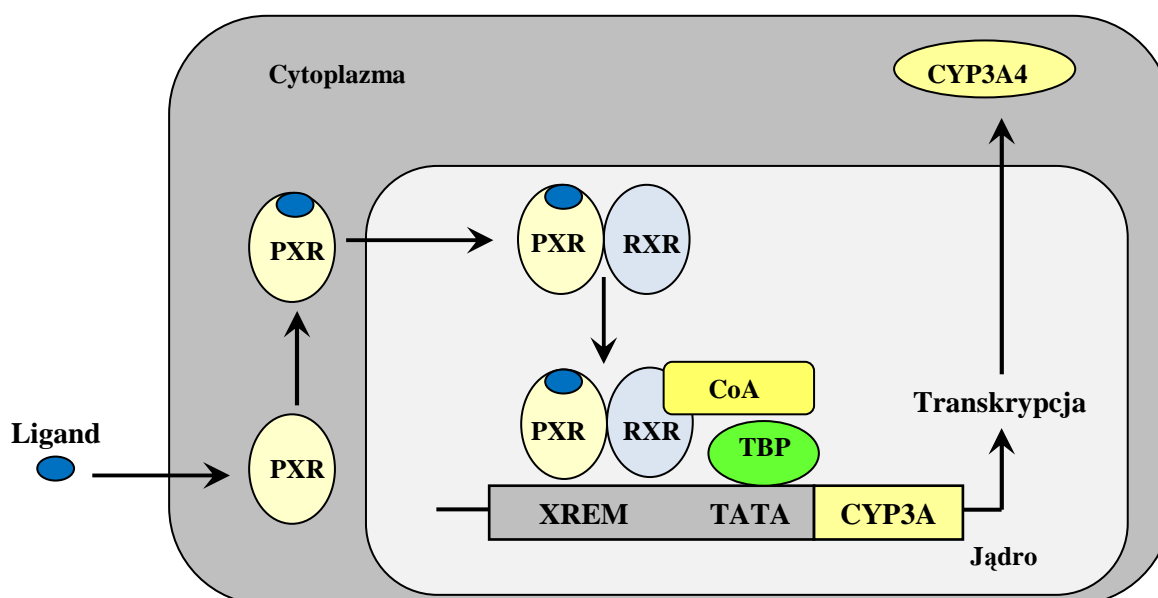
LEK SYNTETYCZNY	ZASTOSOWANIE TERAPEUTYCZNE	PIŚMIENNICTWO
Ryfampicyna	Antybiotyk	Lehmann i wsp., 1998
Ritonawir	Inhibitor proteazy HIV	Dussault i wsp., 2001
Troglitazon	Lek przeciwcukrzycowy	Jones i wsp., 2000
Paklitaksel, tamoksyfen	Leki przeciwnowotworowe	Synold i wsp., 2001, Desai i wsp., 2002
Klotrimazol	Lek przeciwgrzybiczy	Lehmann i wsp., 1998
Deksametazon	Lek przeciwzapalny	Lehmann i wsp., 1998
Fenobarbital	Lek przeciwdrgawkowy,	Lehmann i wsp., 1998

W badaniach eksperymentalnych wykazano istotne międzygatunkowe zróżnicowanie farmakologiczne w aktywacji PXR, ze względu na obecne zmiany w sekwencji nukleotydowej w domenie wiążącej ligand, np. ryfampicyna i troglitazon są efektywnymi aktywatorami ludzkich i króliczych receptorów PXR, podczas gdy wywołują niewielką indukcję szczurzego i mysiego PXR. Doniesienia literaturowe wskazują, iż ludzki receptor pregnanu X wykazuje 96% homologii sekwencyjnej w domenie DBD ze szczurzym oraz 76% homologii sekwencyjnej w domenie LBD, co pozwala na wykorzystanie modelu szczurzego w badaniach eksperymentalnych nad próbą wyjaśnienia molekularnego mechanizmu regulacji transkrypcji genów podlegających modulacji przez ten receptor (Rycina 13).

Człowiek		DNA		LIGAND
Królik		94%		82%
Mysz		96%		77%
Szczur		96%		76%

Rycina 13. Schemat homologii funkcjonalnych domen receptora pregnanu X u różnych gatunków ssaków

Istnieją kontrowersje odnośnie lokalizacji komórkowej receptora pregnanu X niezwiązanego z ligandem. Niektóre badania sugerują, że PXR znajduje się w jądrze komórkowym zarówno w obecności jak i nieobecności agonisty [Koyano i wsp., 2004], natomiast inne wnioskuje o cytoplazmatycznej lokalizacji PXR i jego transporcie do jądra po związaniu z ligandem [Kawana i wsp., 2003; Squires i wsp., 2004]. Aktywowany receptor poprzez ligand tworzy heterodimer z receptorem α retinoidu X (RXR α), który wiąże się z sekwencją DNA genu CYP3A4 zawierającą odwrócone powtórzenie - ER6 [Lehmann i wsp., 1998] w proksymalnej części promotora oraz z modulem wzmocnionej odpowiedzi na ksenobiotyk (XREM, ang. *xenobiotic-responsive enhancer module*) [Waxman, 1999], regulując transkrypcję (Rycina 14). Moduł XREM obecny w części dystalnej promotora zawiera wiele charakterystycznych sekwencji wiążących receptor jądrowy, w szczególności motyw obejmujący proste powtórzenie - DR3. Zarówno sekwencja typu DR3 jak i ER6 są wymagane dla maksymalnej indukcji ekspresji CYP3A4 poprzez receptor pregnanu X [Bertilsson i wsp., 1998; Blumberg i wsp., 1998; Goodwin i wsp., 1999; Lehmann i wsp., 1998]. Warto zaznaczyć również, że wiązanie PXR/RXR z regionem DNA zawierający motyw ER6 i DR3 następuje poprzez przyłączenie białek koaktywatorów, np. SRC-1 (ang. *steroid receptor coactivator-1*), które umożliwiają aktywację transkrypcji genów regulowanych przez ten receptor [Waxman, 1999; Savas i wsp., 1999].

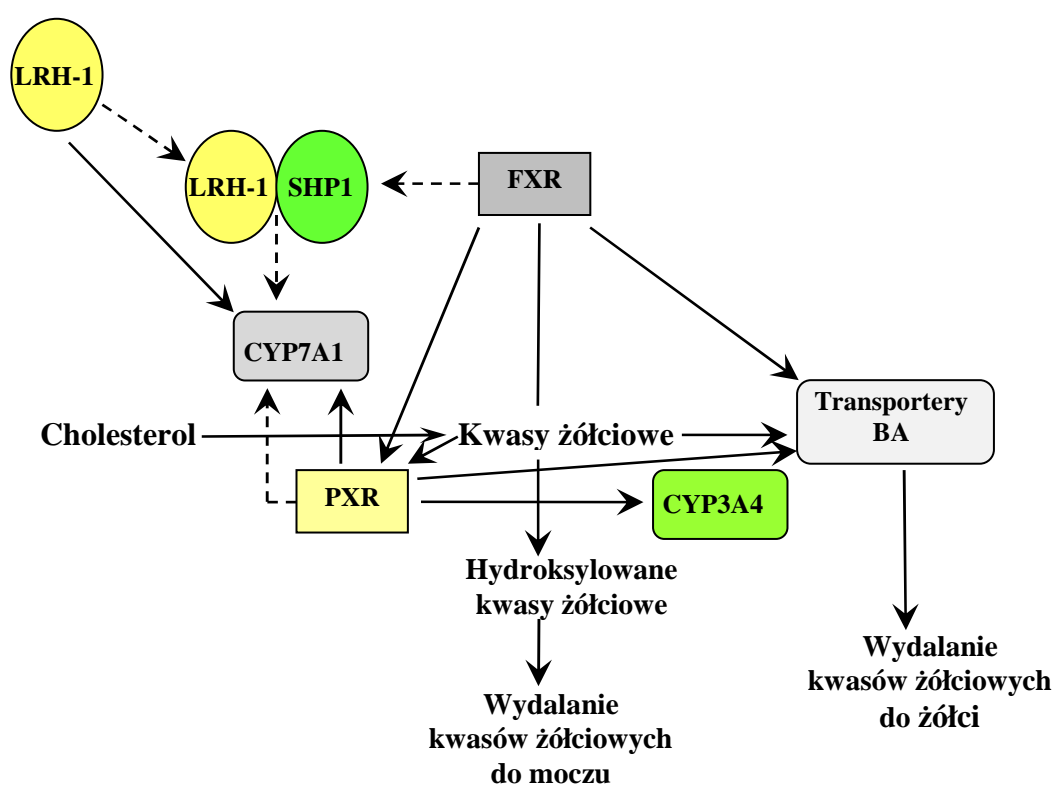


Rycina 14. Indukcja metabolizmu leku poprzez receptor pregnanu X regulującego ekspresję genu CYP3A4. Ligand, np. lek wnika do komórki i wiąże się z PXR, który tworzy kompleks z receptorem kwasu retinoidowego X, wiążąc się z sekwencją DNA w rejonie przed genem docelowym. Kompleks ten aktywuje koaktywator (CoA), który oddziałuje z białkiem TBP wiążące ramkę TATA aktywując transkrypcję.

Sugeruje się, że HNF4 α może zwiększać indukcję CYP3A4 poprzez PXR [Tirona i wsp., 2003]. Jednakże istnieją kontrowersje odnośnie konieczności wiązania HNF4 α do sekwencji DNA. Wnioskuje się, że element wiążący HNF4 w XREM jest wymagany dla wzmocnienia działania receptora pregnanu X [Tirona i wsp., 2003], natomiast istnieją sugestie, że PXR aktywowany ryfampicyną oddziałuje z HNF4 α na zasadzie białko-białko niezależnie od obecności sekwencji DNA wiążącej HNF4 α [Li i Chiang, 2006]. Wykazano także, iż SHP (ang. *small heterodimeric partner*) może oddziaływać z PXR i hamować jego transkrypcję [Ourlin i wsp., 2003], przy czym aktywowany ryfampicyną receptor pregnanu X może obniżać transkrypcję SHP, co umożliwi maksymalną indukcję genów docelowych, m.in. CYP3A4 [Li i Chiang, 2006]. Doniesiono, że poziom białka PXR może być regulowany przez mikroRNA, który wpływa także na poziom ekspresji CYP3A4. Jednakże doniesienia z tego zakresu wymagają dalszych analiz. Ponadto, obecność mutacji w sekwencji DR3 lub ER6 powoduje obniżenie aktywności genu CYP3A4 o 20-50%, natomiast mutacje występujące zarówno w DR3 i ER6 redukują aktywność tego genu ponad 80%. Dodatkowe obserwacje potwierdzają, że PXR oraz RXR α są indukowane przez receptor glukokortykoidowy (GR) na drodze pośredniej regulacji CYP3A [Pascussi i wsp., 2000a; Pichard i wsp., 1992; Schuetz i wsp., 1993]. Aktywacja GR przez glukokortykoidy, np. deksametazon prowadzi do indukcji PXR/RXR oraz czynnika transkrypcyjnego CAR [Pascussi i wsp., 2000b]. Odwrotny efekt ma miejsce pod wpływem cytokiny zapalnej IL-6, to częściowo wyjaśnia występowanie hamowania aktywności niektórych enzymów CYP450 przez cytokiny [Abdel-Razzak i wsp., 1993; Muntane-Relat i wsp., 1995].

Badania z udziałem zwierząt eksperymentalnych dowiodły, że myszy pozbawione PXR nie wykazywały indukcji CYP3A po podaniu klasycznych induktorów, a brak PXR nie zmienił podstawowego poziomu ekspresji tej podrodziny [Xie i wsp., 2000a]. Transgeniczne myszy z ludzkim PXR natomiast wykazywały indukcję CYP3A po podaniu specyficznych induktorów, którego przykładem jest m.in. ryfampicyna. W dodatku PXR reguluje ekspresję genów transporterów OATP2 i MRP2 biorących udział w homeostazie kwasów żółciowych [Staudinger i wsp., 2001; Kast i wsp., 2002]. Wykazano również, że wtórny kwas żółciowy - kwas lithocholowy (LCA) aktywuje PXR, co wskazuje na zaangażowanie tego receptora w ochronie wątroby przed patofizjologicznym poziomem kwasów żółciowych, które mogą być niezmiernie toksyczne, gdy ich poziom zostaje podwyższony (Rycina 15) [Fisher i wsp., 1996]. W badaniach eksperymentalnych z udziałem zwierząt modelowych, takich jak mysz i szczur wykazano, że gryzonie traktowane PCN, który jest agonistą PXR, ma zdolność

blokowania hepatotoksyczności i śmiertelności powodowanej przez LCA. Stwierdzenie to tłumaczy się, iż związek PCN aktywuje PXR, który bierze udział w wątrobie w hamowaniu 7α -hydroksylazy (CYP7A1), enzymu konwertującego cholesterol do kwasów żółciowych i indukuje ekspresję CYP3A umożliwiając ich hydroksylację, a następnie wydalenie do moczu [Staudinger i wsp., 2001, Saradhi i wsp., 2006]. Istotny jest również fakt, iż podniesiony poziom LCA zaobserwowano u pacjentów cierpiących na chorobę chroniczną wątroby – cholestazę związaną z osłabieniem przepływu żółci, [Fisher i wsp., 1996] u których wykazano w moczu podniesiony poziom 6-hydroksylowanych kwasów żółciowych, będącymi produktami genu CYP3A4 aktywowanego przez PXR [Araya i Wikvall, 1999].



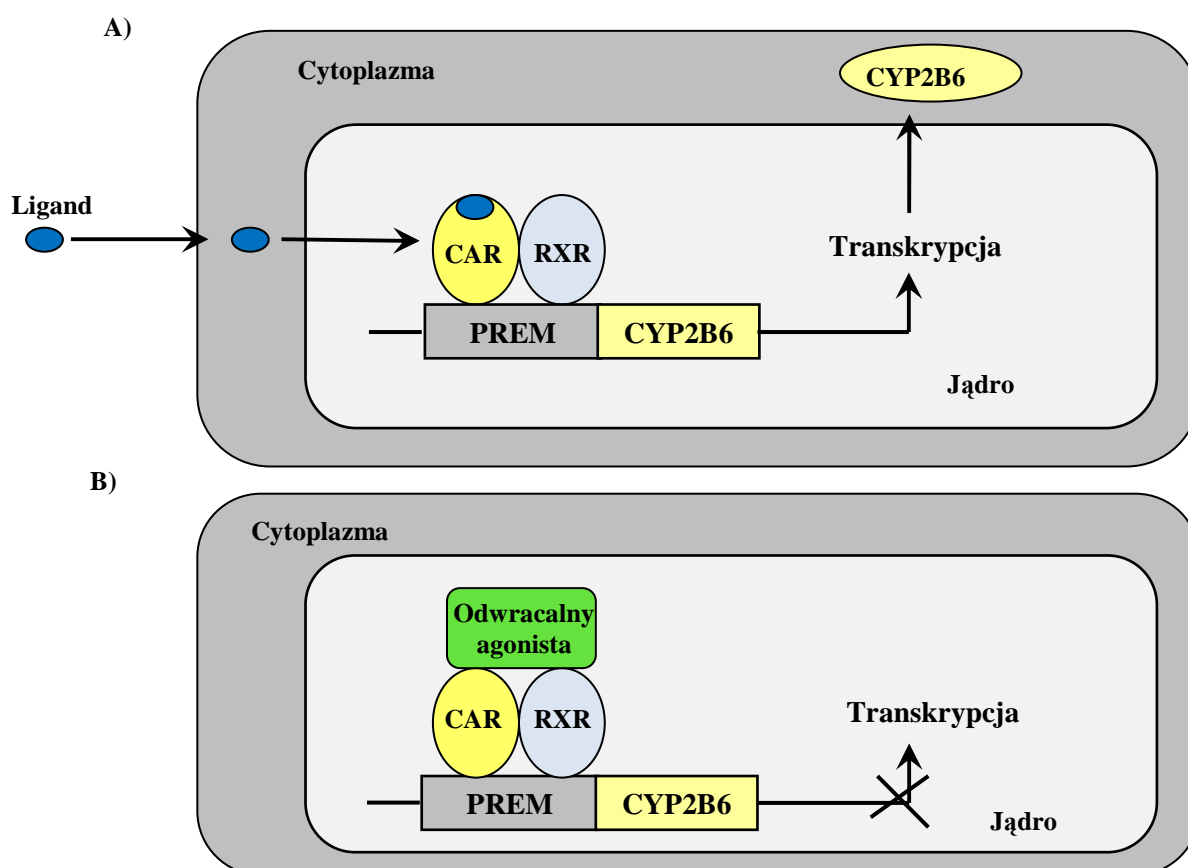
Rycina 15. Rola receptora pregnanu X (PXR) w metabolizmie kwasów żółciowych i ich udział w regulacji jego aktywności. Aktywacja PXR i farnazylowego receptora X (FXR) poprzez kwasy żółciowe prowadzi do ekspresji genów związanych z biosyntezą i transportem wspomnianych kwasów. Aktywowany FXR w hepatocytach hamuje pośrednio 7α -hydroksylazę (CYP7A1) poprzez indukcję ekspresji SHP1, przy czym heterodimeryzacja SHP z LHR-1 oraz LHR-1 w formie niezwiązanej z SHP powoduje indukcję transkrypcji CYP7A1. Ponadto, FXR indukuje również transkrypcję PXR. Aktywowane receptory jądrowe PXR oraz FXR stymulują bezpośrednio ekspresję transporterów kwasów żółciowych (transportery BA) i wzmacniają wydzielenie tych kwasów do żółci. Ponadto, PXR uczestniczy w hamowaniu ekspresji CYP7A1, jak również indukuje transkrypcję CYP3A umożliwiając hydroksylację powyżej wspomnianych kwasów żółciowych i ich wydalenie do moczu, chroniąc tym samym wątrobę przed ich toksycznością. Strzałka przerywana oznacza regulację poprzez tzw. sprzężenie zwrotne [Saradhi i wsp., 2006].

1.4.1.2. Konstytywny receptor androstanu (CAR)

W proces regulacji transkrypcji CYP450 zaangażowany jest również receptor sierocy CAR - konstytywny receptor androstanu. Wykazuje podobieństwo względem receptora pregnanu X sugerując, iż powstał w wyniku duplikacji pierwotnego genu PXR [Reschly i Krasowski, 2006]. Ulega głównie ekspresji w wątrobie [Baes i wsp., 1994] oraz w nerkach, czyli w narządach odpowiedzialnych za metabolizm ksenobiotyków, w tym również leków, [Nishimura i wsp., 2004]. Pośredniczy w indukcji CYP2B, CYP3A, CYP2C oraz enzymów II fazy metabolizmu leków GST, SULT i UGT. Uczestniczy w indukcji CYP2B6 i w mniejszym stopniu CYP3A4 [Sueyoshi i wsp., 1999; Tzamelis i wsp., 2000], przy czym wyniki badań wskazują również na jego udział w regulacji CYP2C8 i CYP2C9 [Pascussi i wsp., 2000b]. Receptor ten jest regulowany przez IL-6, która obniża jego aktywność, co może tłumaczyć hamowanie enzymów P450 przez czynniki zapalne [Abdel-Razzak i wsp., 1993; Muntane-Relat i wsp., 1995]. W cytozolu CAR występuje jako nieaktywny kompleks z białkami opiekuńczymi typu HSP90 (ang. *HSP90 chaperon*) i białkiem cytoplazmatycznym CCRP (ang. *cytoplasmic CAR retention protein*), które zaangażowane są w proces fałdowania i stabilizacji tego receptora [Kobayashi i wsp., 2003]. Po aktywacji CAR uwalnia się z powyższego kompleksu i ulega translokacji do jądra komórkowego, gdzie tworzy heterodimer z RXR (Rycina 16). Efekt ten wynika częściowo z obecności działania ligandów na powyższy receptor, m.in. 5 β -pregnanu, potencjalnego aktywatora CAR regulującego ekspresję genów docelowych. Do receptora CAR wiążą się również deaktywatory i odwracalni agoniści, w tym androstanol i klotrimazol, które hamują geny aktywowane przez ten receptor [Forman i wsp., 1998; Moore i wsp., 2000a].

Istotny jest również fakt, iż CAR ulega aktywacji odmiennie od większości receptorów, ponieważ może być konstytywnie aktywny bez udziału ligandu, ze względu na posiadanie niezwyklej struktury w domenie wiążącej ligand, określanej mianem subdomeny AF-2, która jest stabilizowana do aktywnej konformacji [Xu i wsp., 2004; Suino i wsp., 2004; Shan i wsp., 2004]. Jednakże dla aktywacji tej wymagany jest kompleks z kofaktorem. Wykazano, że CAR może oddziaływać z wieloma kofaktorami, takimi jak: SRC-1, PGC-1 i GRIP1 [Timsit i Negishi, 2007]. Po związaniu odwracalnego agonisty, CAR ulega deaktywacji poprzez uwolnienie koaktywatora SRC-1 z domeny wiążącej ligand [Forman i wsp., 1998; Moore i wsp., 2000a]. Podobnie do PXR, CAR wymaga heterodimeryzacji z RXR w celu wiązania się z sekwencją DNA promotora genów docelowych. Heterodimer

CAR/RXR wiąże się do zachowawczej sekwencji określanej jako PBREM (ang. *phenobarbital-responsive enhancer module*) w regionie 5' genu CYP2B i do miejsca ER6 i DR3 w sekwencji genu CYP3A4, przy czym PXR może wiązać się z sekwencją DR4 w PREM i regulować ekspresję CYP2B [Honkakoski i wsp., 1998; Sueyoshi i wsp., 1999; Maglich i wsp., 2003].



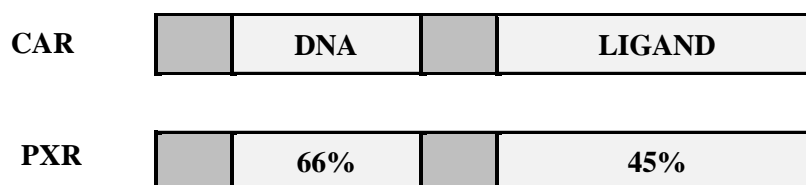
Rycina 16. Mechanizm regulacji CYP2B6 poprzez konstytutywny receptor androstanu (CAR). A – ligand (agonista) aktywujący ekspresję genu CYP2B6, B – odwracalny agonista hamujący ekspresję genu CYP2B6.

Klasycznym przykładem związku indukującego enzymy metabolizujące ksenobiotyki i wpływającego na wiele procesów komórkowych poprzez receptor jądrowy CAR jest fenobarbital, mimo iż dokładny mechanizm indukcji tego czynnika poprzez ten ligand nie został jeszcze w pełni poznany. Istnieją jednakże dane wskazujące na fakt, że fenobarbital nie tylko ułatwia translokację CAR do jądra komórkowego, ale także aktywuje ten receptor w jądrze [Kawamoto i wsp., 1999; Maglich i wsp., 2003]. Etap ten zależy od fosforylacji, ponieważ translokacja i aktywacja są hamowane przez inhibitory fosfatazy białkowej (PP) i kinazy CaM (CK) [Negishi, 2000]. Model ten znalazł potwierdzenie w badaniach, w których

wykazano, że w mysich hepatocytach CAR zlokalizowany jest w cytoplazmie i ulega translokacji do jądra jedynie po podaniu induktora [Kawamoto i wsp., 1999]. Geny indukowane przez fenobarbital należą do podrodzin CYP2A, CYP2B, CYP2C i CYP3A, przy czym największej indukcji w podrodzynie CYP2B ulega u człowieka CYP2B6 [Denison i Whitlock, 1995; Chang i wsp., 1997; Honkakoski i Negishi, 1998; Moore i wsp., 2000a].

1.4.1.3. Szlaki sygnalizacji CAR i PXR

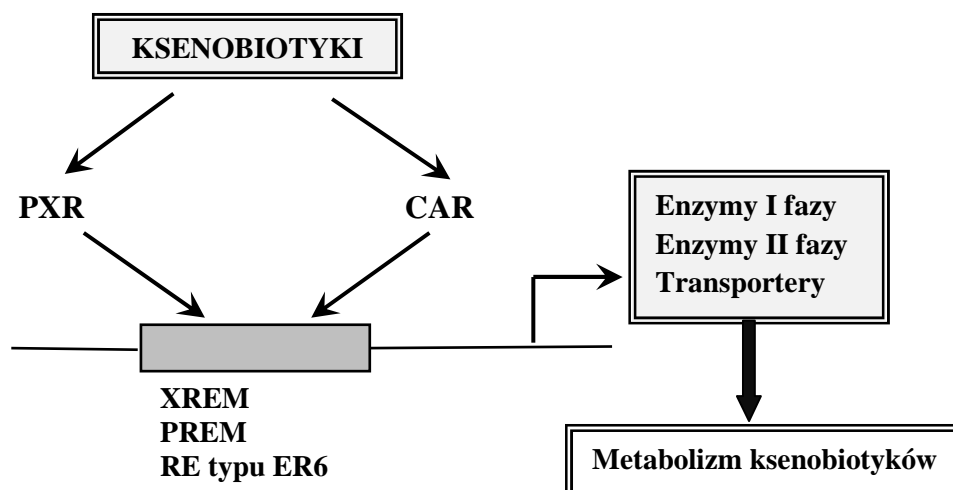
Zarówno konstytutywny receptor androstanu jak i receptor pregnanu X biorą udział w regulacji transkrypcji licznych genów w wątrobie i jelicie, które są zaangażowane w biotransformację i eliminację ksenobiotyków z organizmu. Pod względem homologii sekwencji aminokwasowej ludzki CAR wykazuje podobieństwo 66% w domenie DBD i 45% w domenie LBD w porównaniu z ludzkim PXR (Rycina 17). Podobnie jak receptor pregnanu X, CAR dimeryzuje z RXR i ulega ekspresji w wątrobie oraz jelicie, gdzie zachodzą głównie procesy detoksykacji.



Rycina 17. Schemat homologii domen PXR i CAR u człowieka

Dodatkowe obserwacje potwierdzają, że czynniki transkrypcyjne PXR i CAR wykazują swoistość gatunkową oraz wybiórczość względem ligandów. Wynika to częściowo ze zróżnicowania w sekwencji nukleotydowej w domenie wiążącej ligand, co przekłada się istotnie na zróżnicowanie farmakologiczne w aktywacji PXR i CAR, np. klotrimazol aktywuje PXR, natomiast hamuje CAR. Inną różnicę w zdolności wiązania ligandu przez powyższe receptory jądrowe określono w przypadku ryfampicyny, która aktywuje ludzki PXR ale nie mysie i szurczy PXR, jak również względem meklozyny aktywującej preferencyjnie mysie CAR a hamującej gen indukowany przez ludzki CAR [Gonzalez i Tukey, 2006]. W niektórych przypadkach postuluje się, że wpływ ksenobiotyku na transkrypcję określonego genu jest istotnie złożony i zależy od jego działania zarówno na CAR i PXR. Geny CYP3A zawierają w swojej sekwencji ER6 i XREM z motywem DR3, natomiast geny

CYP2B posiadają charakterystyczną sekwencję PBREM z motywem DR4, co tłumaczy fakt, iż szlak sygnalizacji różni się dla CAR i PXR. Jednakże wiele badań donosi, że PXR może wiązać się do sekwencji typu DR4 w PBREM i regulować ekspresję genów CYP2B [Goodwin i wsp., 2001; Smirlis i wsp., 2001; Xie i wsp., 2000b], natomiast CAR może rozpoznawać sekwencje typu DR3 i ER6 regulując tym samym transkrypcję CYP3A (Rycina 18) [Goodwin i wsp., 2001; Wei i wsp., 2000; Xie i wsp., 2000b].



Rycina 18. Związek pomiędzy szlakami sygnalizacji PXR a CAR. Receptory te w sposób skoordynowany regulują liczne geny w wątrobie i jelicie, związane z detoksykacją i eliminacją ksenobiotyków z organizmu [Kliwer i wsp., 2002].

Uważa się, że regulacja ekspresji genów CYP2B i CYP3A poprzez aktywowany CAR i PXR przebiega odpowiednio na wyższym poziomie i wynika ze skuteczności wiązania ligandu oraz indukcji określonych genów docelowych, np. ryfampicyna wywiera znaczący efekt na ekspresję genów CYP3A, podczas gdy CITCO oddziałuje bardziej na CYP2B [Maglich i wsp., 2003]. Interesujący jest również fakt, iż zarówno heterodimer CAR/RXR jak i PXR/RXR wiąże się z sekwencją typu ER6 w proksymalnym regionie regulatorowym CYP3A4, co wskazuje na możliwość regulacji aktywności tej izoformy poprzez wspomniane powyżej receptory. Dodatkowo, niektóre enzymy II fazy metabolizmu leków, m.in. GST, UGT, SULT i acetylotransferazy mogą być także aktywowane zarówno poprzez PXR jak i CAR, co przedstawiono w Tabeli 16.

Tabela 16. Regulacja genów uczestniczących w metabolizmie ksenobiotyków przy udziale PXR i CAR [Rosenfeld i wsp., 2003].

	GENY REGULOWANE PRZEZ PXR	GENY REGULOWANE PRZEZ CAR	GENY REGULOWANE PRZEZ PXR i CAR
Faza I	karboksyesterazy 2,3 ADH3A2 CAR	esterazy 1 FMOC5 CYP1A AhR	AldH1A1, 1A7 CYP2A, 2B, 3A
Faza II	UGT1a Sta2 GSTA4, M2	BHMT SulTN GSTA3, T1, P2	PAPSS2 GSTA1, M1
Transportery	MDR1A, 1B OATP2 ABCB9	MRP1, 2	MRP3

ABC- białka kasetowe wiążące ATP, ADH - dehydrogenaza alkoholowa, AldH – dehydrogenaza aldehydowa, AhR – receptor węglowodorów arylowych, BHMT – metylotransferaza betainowo-homocysteinowa, FMOC5 – monooksygenaza 5 zawierająca flawinę, PAPSS2 – synteza 3'-fosfoadenozyno 5'- fosfosiarczanowa 2, STa2 – sulfotransferaza a2, SulTN – sulfotransferaza typu N.

1.5. Badania eksperymentalne w oparciu o model zwierzęcy (szczur)

Jednym z aspektów bezpiecznej farmakoterapii jest poznanie molekularnego podłoża interakcji pomiędzy preparatami ziołowymi a syntetycznymi przyjmowanymi przez pacjenta. Powyższe stwierdzenie wynika z faktu, iż powszechne stosowanie preparatów roślinnych podczas farmakoterapii oraz w celach szeroko rozumianej profilaktyki, jak również utrzymujący się trend samoleczenia niosą ze sobą ryzyko wystąpienia działań niepożądanych oraz interakcji. W tej sytuacji przy braku dostatecznej wiedzy na temat zagrożeń wynikających z wzajemnej relacji składników leku syntetycznego i preparatów roślinnych oraz ich bezpiecznego stosowania, konieczne jest podjęcie badań w kierunku pełnego poznania tego typu interakcji poprzez wyjaśnienie podłoża molekularnych mechanizmów ich powstawania. W tym celu prowadzone są intensywne badania przedkliniczne z wykorzystaniem modelu zwierzęcego zmierzające do oceny wpływu standaryzowanych ekstraktów roślinnych na poziom ekspresji enzymów z nadrodziny P450 odpowiedzialnych za metabolizm leków w wątrobie. Wynika to z faktu, iż izoformy enzymów CYP wykazują zmienność międzygatunkową na różnym poziomie ich aktywności, mimo to pewna konserwatywność i podobieństwo sekwencyjne niektórych z nich pozwala na ustalenie analogicznych ludzkich sekwencji u zwierząt i prowadzenie badań z udziałem organizmów modelowych (Tabela 17).

Tabela 17. Ortologiczne odpowiedniki ludzkich enzymów CYP i receptorów jądrowych w modelu zwierzęcym (szczur) w prezentowanym badaniu *in vivo* [wg <http://www.genecards.org>.]

CZŁOWIEK	SZCZUR	HOMOLOGIA SEKWENCJI NUKLEOTYDOWEJ (n) I AMINOKWASOWEJ (a)	
CYP3A4	CYP3A1	78,26% (n)	73,56% (a)
CYP2D6	CYP2D2	~ 77% (n)	~ 74% (a)
PXR (NR1I2)	PXR (Nr1i2)	82,52% (n)	76,92% (a)
CAR (NR1I3)	CAR (Nr1i3)	81,47% (n)	79,71% (a)

1.5.1. Podrodzina CYP3A

U szczura zidentyfikowano wiele izoform podrodziny CYP3A, m.in. CYP3A1, 3A2, 3A9, 3A18 oraz 3A62, których ekspresja determinowana jest przez płeć. Aktywność CYP3A2 i CYP3A18 jest specyficzna dla płci męskiej, co związane jest z silną aktywacją tej formy przez androgeny, podczas gdy CYP3A9 dominuje u płci żeńskiej [Aiba i wsp., 2005; Robertson i wsp., 1998]. Ostatnie badania z udziałem CYP3A62 wnioskuje, iż jego profil ekspresji wykazuje podobieństwo względem ludzkiego CYP3A4 i szczurzego CYP3A9. Izoforma CYP3A62 dominuje w przestrzeni jelitowej, natomiast CYP3A1 i CYP3A2 ulegają tylko ekspresji w wątrobie [Matsubara i wsp., 2004].

Ortologicznymi odpowiednikami ludzkich izoform CYP3A4 i CYP3A5 są odpowiednio szczurze enzymy CYP3A1 i CYP3A2, które wykazują częściowe podobieństwo sekwencji [Takada i wsp., 2004], a także zdolność do metabolizowania tych samych substratów, np. antybiotyków makrolidowych. Ponadto proces indukcji wspomnianych izoform szczurzych przebiega z udziałem tych samych substancji, np. glukokortykoidów [Eliasson i wsp., 1994]. Odnotowano jednakże różnice w funkcjonowaniu enzymów CYP3A1 i CYP3A2, ze względu na brak metabolizowania dihydropirydynowych blokerów kanałów wapniowych, [Guengerich, 1997b] oraz indukcji przez ryfampicynę, substancji syntetycznej stanowiącej ludzki induktor CYP3A. Mimo pewnych różnic w metabolizowaniu niektórych substancji, szczurza izoforma CYP3A1 jest wykorzystywana w badaniach *in vivo* nad aktywnością tego enzymu w oparciu o model zwierzęcy, który pozwala w znacznej mierze przenieść uzyskane wyniki do badań klinicznych względem ludzkiego CYP3A4, odpowiedzialnego za biotransformację większości leków stosowanych klinicznie.

1.5.2. Podrodzina CYP2D

Analiza genomu u szczura pozwoliła na zidentyfikowanie 6 izoform, takich jak: CYP2D1, 2D2, 2D3, 2D4, 2D5 oraz 2D18 wykazujące blisko 70% homologii sekwencyjnej z ludzkim enzymem CYP2D6. Izoformy CYP2D5 i CYP2D18 wykazują podobieństwo w sekwencji aminokwasowej odpowiednio względem CYP2D1 i CYP2D4 [Venhorst *i wsp.*, 2003]. Podobnie jak ludzki CYP2D6, szczurze izoenzymy ulegają ekspresji w różnych tkankach, m.in. w wątrobie, nerkach i mózgu, przy czym ich rozmieszczenie jest specyficznie tkankowe [Hiroi *i wsp.*, 1998]. CYP2D2 i CYP2D3 występują głównie w wątrobie, nerkach i jelicie cienkim, natomiast CYP2D1/5 ulegają ekspresji w różnych tkankach. Izoformy CYP2D4 i CYP2D18 spotykane są w mózgu, gruczołach nadnerczy, jajnikach i jądrach oraz w wątrobie, nerkach i jelicie cienkim [Hiroi *i wsp.*, 2002]. Na podstawie ich specyficznie tkankowego rozmieszczenia sugeruje się, że każda izoforma posiada charakterystyczne właściwości katalityczne i pełni kluczową rolę w różnych tkankach, czego przykładem może być izoenzym CYP2D1 przeprowadzający reakcje N-oksydacji (*R*)-mianzerinu, podczas gdy wszystkie izoformy katalizują 8-hydroksylację [Hiroi *i wsp.*, 2002; Chow *i wsp.*, 1999].

Najwyższą analogię wobec ludzkiego CYP2D6 zarówno pod względem homologii sekwencji jak również pod względem skuteczności wiązania ligandu wykazuje szczurzy CYP2D2, mimo iż CYP2D1, który wykazuje różnice w metabolizowaniu niektórych substancji często jest uważany za ortologiczny odpowiednik wspomnianego powyżej ludzkiego cytochromu [Nelson *i wsp.*, 1996; Venhorst *i wsp.*, 2003]. Ponadto w przeprowadzonym doświadczeniu w oparciu o analizę aktywności CYP2D2 stwierdzono wysoką specyficzność w wiązaniu deksstrometofanu, będącego katalitycznym markerem dla CYP2D6 [Kobayashi *i wsp.*, 2002]. Z drugiej strony, chinidyna jako specyficzny inhibitor ludzkiego enzymu, nie wykazywała specyficzności w wiązaniu CYP2D2, co świadczyło o pewnych różnicach w funkcjonowaniu tych izoform [Kobayashi *i wsp.*, 2002]. Jednakże powyższe stwierdzenie odnośnie podobieństwa sekwencji i zdolności wiązania ligandu przez CYP2D2 odniesieniu do ludzkiego CYP2D6, pozwala na wykorzystanie tej szczurzej izoformy w modelu *in vivo* w aspekcie badań nad regulacją jej aktywności i określeniu interakcji farmakologicznych badanych związków, co pozwoli w badaniach klinicznych częściowo przewidzieć potencjalne zdarzenia niepożądane wywołane przez daną substancję.

2. CELE PRACY

- Ocena zmian poziomu transkrypcji genów CYP3A1 i CYP2D2, będących enzymami I fazy metabolizmu leków, w modelu *in vivo* po podaniu standaryzowanych wyciągów z roślin leczniczych.
- Analiza poziomu ekspresji czynników transkrypcyjnych PXR i CAR biorących udział w regulacji transkrypcji genu CYP3A1 pod wpływem standaryzowanych wyciągów roślinnych.
- Określenie istotnych różnic pomiędzy średnimi analizowanych grup celem oszacowania związku pomiędzy ilością transkryptu CYP3A1 a poziomem ekspresji receptorów jądrowych PXR i CAR w regulacji ekspresji badanej izoformy.
- Próba określenia na podstawie analizy molekularnych mechanizmów zmian w aktywności CYP3A1 i CYP2D2 pod wpływem preparatów roślinnych w odniesieniu do szybkości metabolizowania innych ich substratów i ryzyka wystąpienia potencjalnych interakcji.

3. MATERIAŁY I METODY

3.1. Badania *in vivo*

3.1.1. Zwierzęta laboratoryjne

Badania *in vivo* przeprowadzono na szczurach rasy Wistar (samce) o masie ciała 220-350 g, które zakupiono z Hodowli Zwierząt Laboratoryjnych w Brwinowie. Zwierzęta przetrzymywano w plastikowych klatkach, w warunkach standardowych, tj. w pomieszczeniach o temperaturze ok. 20°C, wilgotności 60%, z 12-godzinnym cyklem oświetleniowym. Szczury karmiono standardową paszą laboratoryjną (Labofeed B – Wytwórnia Pasz i Koncentratów, Kcynia) i pojoło wodą *ad libitum*. Po okresie dwóch tygodni kwarantanny, zwierzęta podzielono losowo na grupy liczące 10 sztuk, którym podawano odpowiednio standaryzowane substancje roślinne oraz standardowe związki chemiczne wykazujące właściwości induktorów i inhibitorów enzymów CYP450 analizowanych w niniejszym doświadczeniu.

Badania farmakologiczne wykonano we współpracy z Katedrą i Zakładem Farmakologii Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, które obejmowały podanie zwierzętom odpowiednich preparatów, ich dekapitację oraz wypreparowanie i zabezpieczenie tkanki wątrobowej.

3.1.2. Substancje roślinne i wzorcowe zastosowane w modelu *in vivo*

W ramach prowadzonego eksperymentu dotyczącego wpływu substancji roślinnych na aktywność enzymów cytochromu P450 z wykorzystaniem zwierząt laboratoryjnych (szczur), zgromadzono odpowiedni materiał roślinny standaryzowany na zawartość określonych związków biologicznie aktywnych. Wyciągi roślinne z dziurawca zwyczajnego, kozłka lekarskiego, jeżówki purpurowej, miłorzębu dwuklapowego i żeń-szenia otrzymano z Phytopharm Klęka S.A., natomiast granulaty czosnku uzyskano z PZZ Herbapol S.A., Poznań. W przypadku zielonej herbaty, ekstrakt ten otrzymano z TTD International (Australia), a materiał sojowy dostarczono z Pierre Fabre Sante (Francja).

W badaniu wykorzystano następujące podane poniżej standaryzowane substancje roślinne:

- dziurawiec zwyczajny (*Hypericum perforatum*) – suchy wyciąg alkoholowy o zawartości 0,3% hiperycyny i 0,61% hiperforyny

- kozłek lekarski (*Valeriana officinalis*) – suchy wyciąg alkoholowy o zawartości 0,82% kwasu walerenowego
- jeżówka purpurowa (*Echinacea purpurea*) – płynny wyciąg alkoholowy o zawartości 3,7% związków polifenolowych w przeliczeniu na kwas kawowy
- czosnek pospolity (*Allium sativum*) – granulata o zawartości 0,81% allicyny
- zielona herbata (*Camellia sinensis*) – suchy wyciąg alkoholowy o zawartości 61% katechin
- żeń-szeń (*Panax ginseng*) – suchy wyciąg alkoholowy o zawartości 27,1% ginsenozydów przeliczeniu na Rg1
- miłorząb dwukłapowy (*Gingko biloba*) – suchy wyciąg alkoholowy o zawartości 24,5% glikozydów flawonolowych, 13% laktonów terpenowych i 5,0 ppm kwasu ginkolowego
- soja zwyczajna (*Glycine max*) – suchy wyciąg alkoholowy o zawartości 37% izoflawonów w przeliczeniu na genisteinę.

Ponadto, w doświadczeniu dla wyjaśnienia mechanizmu indukcji interakcji zastosowano poniżej podane syntetyczne substancje wzorcowe, stanowiące odpowiednio induktory i inhibitory aktywności badanych enzymów wątrobowych CYP450:

- izoniazyd (Sigma - Aldrich)
- deksametazon - Dexaven (PGF Cefarm - Poznań Sp. z o.o.)
- chinina (Sigma - Aldrich)
- ketokonazol (Sigma - Aldrich).

Podobnie jak w przypadku substancji roślinnych dokonano również przeglądu literaturowego, w celu ustalenia odpowiednich dawek dla substancji wzorcowych, wykazujących odpowiedni efekt farmakologiczny pod względem modulacji ekspresji analizowanych genów.

3.1.3. Procedura doświadczenia z wykorzystaniem modelu zwierzęcego

Eksperyment na szczurach rasy Wistar przeprowadzono zgodnie z ustawą o ochronie zwierząt z dnia 21 sierpnia 1997 r. (Dz. Ust. Nr 111, poz. 724 z dn. 23.09.1997 r.), za zgodą Lokalnej Komisji Etycznej nr 43/2005. Doświadczenie wykonano dwóch seriach, ze względu na liczebność prób. W pierwszej, zwierzęta podzielono losowo na grupy po 10 sztuk w każdej, przyjmujące odpowiednio substancje syntetyczne o właściwości induktorów

i inhibitorów enzymów wątrobowych CYP450. Preparaty wzorcowe podawano dootrzewnowo (i.p.) przez okres 3 i 10 dni w dawce prezentowanej w Tabeli 18.

Tabela 18. Wykaz dawek preparatów syntetycznych podawanych zwierzętom laboratoryjnym (szczur)

PREPARAT SYNTETYCZNY	DAWKA
Induktory	
Izoniazyd (CYP2D2)	150 mg/kg, i.p.
Deksametazon (CYP3A1)	50 mg/kg, i.p.
Inhibitory	
Chinina (CYP2D2)	20 mg/kg, i.p.
Ketokonazol (CYP3A1)	10 mg/kg, i.p.

Druga seria badań obejmowała podawanie zwierzętom dożołądkowo za pomocą metalowej sondy standaryzowanych ekstraktów roślinnych w dawkach najczęściej stosowanych i wykazujących efekty farmakologiczne (Tabela 19). Doświadczenie prowadzono przez okres 3 i 10 dni, podobnie jak w przypadku substancji syntetycznych, stanowiących model wzorcowy indukcji i inhibicji wobec analizowanych enzymów CYP450. Zarówno w pierwszej jak również w drugiej serii badań wydzielono grupę kontrolną zwierząt karmionych standardową dietą, stanowiącą odniesienie dla grup poddanych procedurze eksperymentalnej.

Tabela 19. Wykaz dawek substancji roślinnych podawanych zwierzętom laboratoryjnym (szczur)

SUBSTANCJE ROŚLINNE	DAWKA
Dziurawiec zwyczajny – wyciąg alkoholowy	300 mg/kg, p.o.
Kozłek lekarski – wyciąg alkoholowy	300 mg/kg, p.o.
Jeżówka purpurowa – wyciąg alkoholowy	50 mg/kg, p.o.
Czosnek pospolity – granulata	250 mg/kg, p.o.
Zielona herbata – wyciąg alkoholowy	300 mg/kg, p.o.
Żeń-szeń – wyciąg alkoholowy	30 mg/kg, p.o.
Miłorząb dwukłapowy – wyciąg alkoholowy	200 mg/kg, p.o.
Soja zwyczajna – wyciąg alkoholowy	100 mg/kg, p.o.

Po upływie czasu podawania określonych powyżej preparatów, zwierzęta poddano dekapitacji, a następnie pobrano prawe płaty wątroby, które umieszczono w ciekłym azocie. Materiał biologiczny w postaci tkanki wątrobowej właściwie zabezpieczono i odpowiednio oznaczono, dla wykonania ewentualnych powtórzeń analiz i możliwości uniknięcia popełnienia błędu laboratoryjnego na pierwszych etapach badań molekularnych.

3.2. Badania molekularne

Ilościowe określenie poziomu ekspresji badanych genów wykonano w Zakładzie Farmakologii i Biotechnologii Instytutu Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich w Poznaniu, który posiada specjalistyczny sprzęt laboratoryjny do prowadzenia analiz genetycznych.

3.2.1. Roztwory i odczynniki

W celu przeprowadzenia izolacji RNA, oceny jakościowej i ilościowej preparatów RNA, syntezy cDNA i reakcji PCR w czasie rzeczywistym (rt-PCR) wykorzystano następujące odczynniki i komercyjnie dostępne zestawy:

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

3.2.2. Sprzęt laboratoryjny

W niniejszej pracy doktorskiej wykorzystano odpowiedni sprzęt laboratoryjny, który umożliwił przeprowadzenie izolacji RNA według zmodyfikowanej metody Chomczyńskiego i Sacchi, pomiaru spektrofotometrycznego preparatów RNA, reakcji rt-PCR oraz pozwolił na dokonanie oceny uzyskanych wyników:

- pipety z nastawialną objętością (Eppendorf, USA)
- pipety z nastawialną objętością (Labmate, Wielka Brytania)
- wirówka Centrifuge 5415D/R (Eppendorf, USA)
- wirówka MiniSpin (Eppendorf, USA)
- termomikser Compact (Eppendorf, USA)
- zamrażarka niskotemperaturowa Joun VXE 380 (Kendromed, Polska)
- kuchenka mikrofalowa Electrolux EMS 2840 (Electrolux, Szwecja)
- wytrząsarka WL-1 (Biomix, Polska)
- spektrofotometr BioPhotometer (Eppendorf, USA)
- komora do elektroforezy poziomej (BioRad, USA)
- komputerowy system wizualizacji i analizy obrazu UV: UVI-KS4000/Image PC (System Biotech Molecular Biology Instruments, USA)
- lodówka ERE 3000 (Electrolux, Szwecja)
- zamrażarka EUC -2100 (Electrolux, Szwecja)
- waga elektroniczna WPE 600 (Radwag, Polska)
- komora laminarna Heraeus Herasafe KS (Kendro, Niemcy)
- komora PCR UV-CLEANER UVC/T-M-AR (Biosan, USA)
- wytwornica lodu płatkowego iShin IF 300-150 (Biocom, USA)
- homogenizator tkankowy Power Gen 125 (Fisherbrand, Fisher Scientific, USA)
- termocykler PTC 200 (MJ Research, USA)
- aparat LightCycler (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany).

3.2.3. Izolacja RNA z tkanki wątrobowej

Izolację całkowitego RNA z pobranego materiału przeprowadzono z użyciem odczynnika TriPure Isolation Reagent (Roche) według zmodyfikowanej metody Chomczyńskiego i Sacchi. Pobrany materiał w postaci fragmentu tkanki wątrobowej 0,2 g zalano 1ml odczynnika TriPure Isolation Reagent i homogenizowano mechanicznie. Po maceracji, dodano do próbek 200 μ l chloroformu i intensywnie wytrząsano, po czym wirowano w warunkach 12 000 x g, 4°C przez okres 15 min. Następnie zebrano górną fazę, do świeżej próbki i podano izopropanol w stosunku objętościowym 1:1. Zawartość próbek zmieszano i umieszczono przez 30 min w temperaturze -80°C. Po rozmrożeniu, próbki z zawartością poddano wirowaniu w warunkach 4°C, 12 000 x g przez 10 min. Następnie usunięto nadsącz, a osad RNA jednokrotnie płukano w 1 ml 75% etanolu przygotowanego z użyciem wody dejonizowanej i autoklawowanej w obecności DEPC. 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 próbek podano 200 μ l wody wolnej od RNaz i w celu pełnego rozpuszczenia RNA próbki umieszczono w termobloku w temperaturze 65°C przez 5 min. Po upływie inkubacji próbki z zawartością delikatnie zworteksowano i krótko zwirowano, a następnie przechowywano w -80°C. W ten sposób przygotowany RNA wykorzystywano jako matrycę do syntezy cDNA w procesie odwrotnej transkrypcji, po wcześniejszej jego analizie jakościowej i ilościowej.

3.2.4. Analiza ilościowa i jakościowa RNA

Ilość i jakość wyizolowanego RNA oceniono poprzez pomiar spektrometryczny i rozdział elektroforetyczny w żelu agarozowym. Dla oceny jakościowej preparatów wykorzystano pomiar spektrofotometryczny. Preparaty rozcieńczono w sterylnej H₂O w proporcji 1 μ l RNA : 99 μ l H₂O, która również posłużyła do kalibracji spektrofotometru. Absorbancję mierzono przy trzech długościach fali:

- 260 nm – maksimum absorpcji dla RNA
- 280 nm – maksimum absorpcji dla białek
- 320 nm – absorpcja dla drobin komórkowych (tzw. tło).

Stężenie RNA (C) obliczono według podanego poniżej wzoru:

$$C(\mu\text{g/ml})=(A_{260}-A_{320}) \times 40 \times R$$

gdzie:

A_{260} – wartość absorbancji przy $\lambda= 260$ nm

A_{280} – wartość absorbancji przy $\lambda= 280$ nm

R – krotność rozcieńczenia

40($\mu\text{g/ml}$) – stężenie RNA, dla którego absorbancja jest równa 1 przy 260 nm.

Wartość absorbancji przy 320 nm odjęto od absorbancji 260 nm celem uwzględnienia wartości tła. Jakość preparatu RNA obliczono ze stosunku:

$$A_{260}/A_{280}$$

gdzie uzyskana wartość pomiędzy 1,7 - 2,0 świadczyła o wysokiej czystości tego preparatu.

Jakość wyizolowanego RNA oceniono również poprzez rozdział elektroforetyczny w 1% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyyny. Przed nałożeniem materiału na żel do probówek zawierających RNA w ilości 0,5 μg podano bufor obciążający 6 x SB. Elektroforezę prowadzono przez 1 godz., przy napięciu 60V (7,5V/cm). Obraz rozdziału obserwowano w świetle UV transluminatora.

Uzyskane preparaty RNA następnie wykorzystano do syntezy cDNA z użyciem starterów oligo-dT w reakcji odwrotnej transkrypcji w celu przeprowadzenia reakcji PCR w czasie rzeczywistym.

3.2.5. Odwrotna transkrypcja

Reakcję odwrotnej transkrypcji przeprowadzano przy użyciu zestawu SuperScript First Strand Synthesis System (Invitrogen) i z wykorzystaniem termocyklera PTC 200 DNA Engine Gradient Cycler firmy MJ Research Inc. Całą procedurę wykonywano pod komorą laminarną, na lodzie według standardowej procedury protokołu. Do 2 μg RNA rozpuszczonego w wodzie wolnej od RNaz dodawano 1 μl mieszaniny deoksyrybonukleotydów (dNTP) (stężenie wyjściowe 10 mM), 1 μl oligo(dT)₂₀ (stężenie wyjściowe 50 μM) i uzupełniano wodą wolną od RNaz do objętości 10 μl . Zawartość probówki mieszano i wirowano przez 30 sek. po czym umieszczano w termobloku na 5 min, w temperaturze 65°C w celu denaturacji RNA. Następnie probówkę przenoszono do lodu na 1 min, wirowano, ponownie umieszczano w lodzie i dodawano następujące składniki:

- 2 µl stężonego buforu 10 x
- 2 µl DTT (stężenie wyjściowe 0,1 M)
- 4 µl MgCl₂ (stężenie wyjściowe 25 mM)
- 1 µl inhibitora rybonukleaz Rnase OUT (40 U/µl)
- 1 µl odwrotnej transkryptyazy SuperScript III RT (200 U/µl).

Probówkę wstrząsano, krótko wirowano i umieszczano w termobloku. Syntezę cDNA prowadzono w czasie 50 min w temperaturze 50°C. Po zakończeniu syntezy próbki poddawano działaniu temperatury 85°C przez 5 min w celu zatrzymania reakcji. Następnie podawano 1 µl RNase H i inkubowano 20 min w temperaturze 37°C. Po zakończeniu procedury próbki z cDNA przechowywano w temperaturze 4°C. W ten sposób uzyskany cDNA wykorzystano jako matrycę do reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (ang. *real-time* PCR).

3.2.6. PCR w czasie rzeczywistym

Dla oszacowania zmian w poziomie ekspresji badanych genów wykorzystano reakcję łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (rt-PCR) z użyciem specyficznych par starterów (TIB Molbiol) komplementarnych do fragmentu kodującego, pozwalające na uzyskanie specyficznego produktu reakcji wyłącznie z cDNA (Tabela 20).

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

IZOFORMA	ACCESSION NUMBER (GenBank)	SEKWENCJA STARTERÓW FORWARD (5' → 3') REVERSE (5' → 3')	WIELKOŚĆ PRODUKTU (pz)
CYP2D2	NM_012730	F. TGA GTG GCG AGA GCA GAG R. CGA GCA TAA ACA AGG GAG G	201
CYP3A1	NM_013105	F. TGG TAA TAG ACT TGA GAG AG R. GGG CAG ATA TAC ATA AGG A	196
PXR	NM_05298	F. TCC ACT GCA TGC TGA AGA AG R. AAC CTG TGT GCA GGA TAGGG	187
CAR	NM_022941	F. GGA GGA CCA GAT CTC CCT T R. GAC CGC ATC TTC CAT CTT GT	130
GAPDH	NM_017008	F. GAT GGT GAA GGT CGG TGT G R. ATG AAG GGG TCG TTG ATG G	108

Startery dla poszczególnych badanych genów zaprojektowano z wykorzystaniem programu Oligo 4.0 (National Biosciences).

Dokonano optymalizacji techniki rt-PCR dla określenia w sposób precyzyjny i szybki poziomu transkryptu analizowanych genów w zależności od zastosowanego preparatu syntetycznego i ekstraktu oraz czasu ich podawania. Reakcję PCR w czasie rzeczywistym prowadzono w szklanych kapilarach, z wykorzystaniem cDNA pozyskanego w reakcji odwrotnej transkrypcji oraz zestawu Fast Start DNA Master Sybr Green I (Roche Diagnostic). Do amplifikacji wykorzystano aparat LightCycler real-time 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 analizowanych transkryptów standaryzowano względem genu referencyjnego – GAPDH (dehydrogenaza gliceroaldehydofosforanowa), należącego do rodziny *housekeeping gene*, którego poziom ekspresji jest stały w warunkach eksperymentu. Reakcję dla badanych genów prowadzono w warunkach określonych poniżej.

Skład mieszaniny reakcyjnej na pojedynczą próbę w celu amplifikacji transkryptów genów CYP2D2, PXR, CAR i GAPDH:

- 7,1 µl wody wolnej od RNaz
- 0,4 µl MgCl₂ (stężenie końcowe 2 mM)
- 0,25 µl starter Forward (stężenie końcowe 0,5 µM)
- 0,25 µl starter Reverse (stężenie końcowe 0,5 µM)
- 1µl LightCycler Fast-Start Reaction Mix SYBR Green I (10 x stężony)
- 1µl cDNA.

Skład mieszaniny reakcyjnej na pojedynczą próbę w celu amplifikacji transkryptu genu CYP3A1:

- 6,9 µl wody wolnej od RNaz
- 0,6 µl MgCl₂ (stężenie końcowe 2,5 mM)
- 0,25 µl starter Forward (stężenie końcowe 0,5 µM)
- 0,25 µl starter Reverse (stężenie końcowe 0,5 µM)
- 1µl LightCycler Fast-Start Reaction Mix SYBR Green I (10 x stężony)
- 1µl cDNA.

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

Tabela 21. Warunki reakcji PCR w czasie rzeczywistym

IZOFORMA	LICZBA CYKLI	WARUNKI REAKCJI RT-PCR				
		DENATURACJA WSTĘPNA	DENATURACJA	WIĄZANIE STARTERÓW	SYNTEZA	SYNTEZA KOŃCOWA
CYP2D2	35	95°C, 600s	95°C, 2s	54°C, 10s	72°C, 8s	72°C, 20s
CYP3A1	35		95°C, 14s	56°C, 4s	72°C, 6s	
PXR	35		95°C, 8s	55°C, 8s	72°C, 8s	
CAR	35		95°C, 8s	58°C, 8s	72°C, 8s	
GAPDH	30		95°C, 4s	56°C, 8s	72°C, 8s	

Reakcję przeprowadzano odpowiednio w podanej ilości cyklach dla badanych genów obejmujących poszczególne etapy amplifikacji, po czym zachodziło topienie produktów reakcji w wyniku wzrostu temperatury do wartości 95°C. Ilość transkryptu wyznaczano z krzywej wzorcowej, którą sporządzono poprzez wykorzystanie rozcieńczeń cDNA uzyskanego po odwrotnej transkrypcji mRNA. Uzyskane wyniki pochodzące z co najmniej dwóch niezależnych powtórzeń eksperymentu standaryzowano wobec genu referencyjnego GAPDH, po czym przedstawiono w postaci wykresów jako wartość względną w odniesieniu do grupy niepoddanej procedurze eksperymentalnej.

3.2.7. Rozdział elektroforetyczny

Rozdział elektroforetyczny przeprowadzono w 1% żelu agarozowym dla oceny jakościowej preparatów RNA i w 1,5% żelu agarozowym w celu potwierdzenia wielkości produktów reakcji PCR w czasie rzeczywistym (Tabela 22). Powyższą analizę wykonano z użyciem buforu 1 x TBE, sporządzonego z 10 x stężonego TBE (88 mM TRIS, 89 mM kwas borowy, 2 mM EDTA). Żel wybarwiano bromkiem etydy (0,5 µg/ml), w celu uwidocznienia uzyskanych produktów reakcji przy długości fali 312 nm. Elektroforezę

przewodzący przez 1 godz., przy napięciu 60V (7,5V/cm). Obraz rozdziału obserwowano w świetle UV transluminatora.

Próby dla potwierdzenia długości amplifikowanych fragmentów cDNA przygotowano dodając do 10 µl produktu rt-PCR, 3 µl buforu obciążającego (6x-bufor obciążający: 0,25% błękit bromofenolowy; 0,25% ksylencjanol; 30% glicerol), natomiast dla oceny jakościowej preparatu RNA do 4 µl roztworu RNA i 6 µl wody dodano 2 µl buforu obciążającego.

Tabela 22. Skład 1% i 1,5% żelu agarozowego

1% ŻEL AGAROWY	1,5% ŻEL AGAROWY
<ul style="list-style-type: none"> ▪ 1g agarozy ▪ 10 ml buforu 10 x TBE ▪ do 100 ml woda 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 1,5g agarozy ▪ 10 ml buforu 10 x TBE ▪ do 100 ml woda

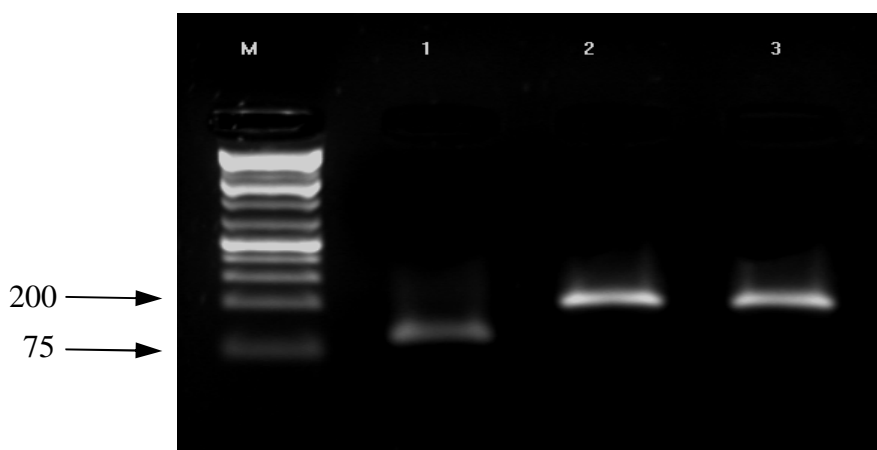
3.2.8. Analiza statystyczna

W celu przeprowadzenia analizy statystycznej uzyskanych w niniejszej pracy wyników reakcji PCR w czasie rzeczywistym wykorzystano program Microsoft Excel, w którym obliczono średnie wartości dla poszczególnych prób, odchylenie standardowe oraz współczynnik SEM. Uzyskane wyniki oznaczeń ilościowych mRNA w badanych próbach normalizowano względem standardu wewnętrznego, czyli mRNA genu referencyjnego GAPDH, należącego do grupy genów ulegających konstytutywnej ekspresji (*housekeeping gene*). W kolejnym etapie utworzono bazę danych uwzględniającą średnie wartości poziomu ekspresji analizowanych genów dla poszczególnych prób w Edytorze Danych SPSS 17.0 PL for Windows, gdzie za pomocą programu statystycznego wykorzystującego jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA dokonano obliczeń poziomu istotności. Wartość $p < 0,05$ przyjęto za statystycznie istotną. Ponadto, dla dokładniejszej analizy statystycznej w określeniu różnic pomiędzy średnimi w badanych grupach zastosowano test Tukeya oparty na tzw. studentyzowanym rozstępie. Powyższy test umożliwia porównywanie par średnich i oszacowanie istotnych różnic pomiędzy nimi, przy jednakowym poziomie istotności dla wszystkich porównywalnych par.

4. WYNIKI

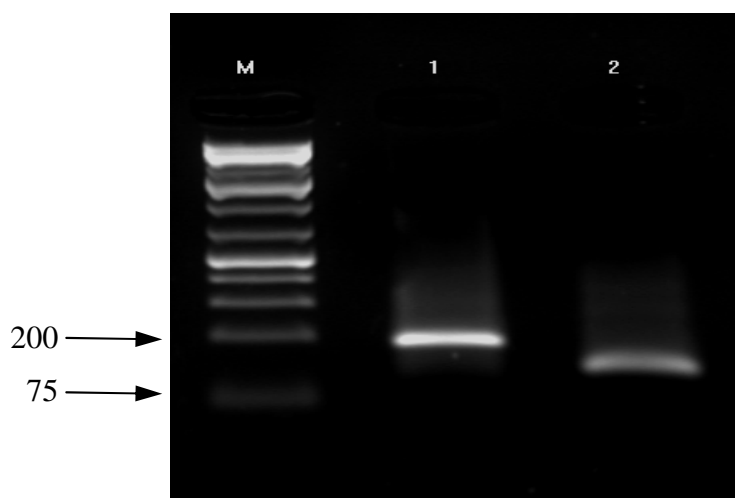
4.1. Rozdział elektroforetyczny produktów RT- PCR

W celu potwierdzenia długości amplifikowanych fragmentów cDNA CYP2D2, CYP3A1 oraz genu referencyjnego - GAPDH przeprowadzono rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR w czasie rzeczywistym w 1,5% żelu agarozowym. Analizę elektroforetyczną prowadzono w warunkach napięcia 5V/cm w buforze 1x TBE przez ok. 1h, a następnie żel analizowano w świetle UV. Uzyskany obraz analizy elektroforetycznej produktów amplifikacji cDNA analizowanych genów przedstawiono na Rycinie 19.



Rycina 19. Rozdział elektroforetyczny amplikonów GAPDH, CYP2D2 i CYP3A1 reakcji PCR w czasie rzeczywistym w 1,5% żelu agarozowym. Tor M - marker wielkości 1 kb, tor 2 – GAPDH (108 pz), tor 3 – CYP2D2 (201 pz), tor 4 – CYP3A1 (196 pz).

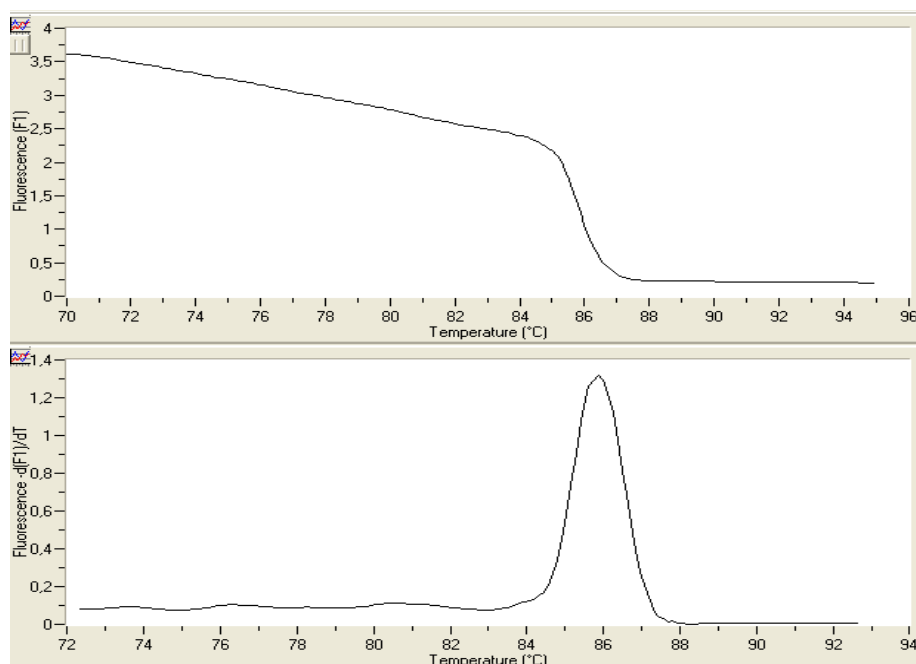
Dla potwierdzenia obecność produktów amplifikacji cDNA analizowanych czynników PXR i CAR o oczekiwanej długości przeprowadzono również rozdział elektroforetyczny otrzymanych produktów reakcji rt-PCR (Rycina 20). Analizę elektroforetyczną w żelu agarozowym prowadzono w standardowych warunkach, jak przedstawiono powyżej.



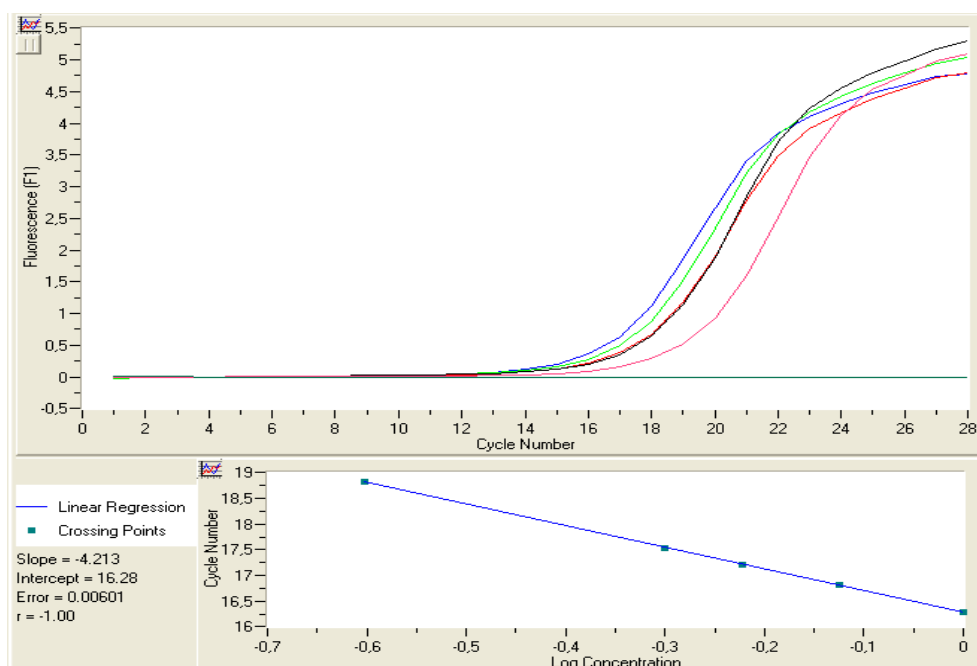
Rycina 20. Rozdział elektroforetyczny ampliconów PXR i CAR reakcji PCR w czasie rzeczywistym w 1,5% żelu agarozowym. Tor M - marker wielkości 1 kb, tor 2 – PXR (187 pz), tor 3 – CAR (130 pz).

4.2. Ocena ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym dla ampliconu genu referencyjnego

Poziom ekspresji badanych genów oznaczano za pomocą reakcji PCR w czasie rzeczywistym z użyciem starterów specyficznych dla genu docelowego i komplementarnych do fragmentu kodującego. Ilość transkryptu wyznaczano z krzywej wzorcowej, sporządzonej poprzez wykorzystanie rozcieńczeń cDNA badanego genu i oznaczono jako wynik względny, stanowiący krotność zmiany ekspresji badanego genu pod wpływem procedury doświadczalnej w odniesieniu do grupy kontrolnej. Uzyskany wynik dla analizowanego genu znormalizowano względem genu referencyjnego - GAPDH, którego poziom ekspresji w warunkach eksperymentu jest stały. Ilość transkryptu w próbach niepoddanych procedurze doświadczalnej, czyli w grupie kontrolnej uznano za względny poziom ekspresji i przyjęto dla nich wartość 1. Przykładowy wykres przedstawiający wyznaczenie temperatury topnienia produktu, przebieg reakcji amplifikacji i krzywą wzorcową dla genu referencyjnego zamieszczono odpowiednio na Rycinie 21 i Rycinie 22.



Rycina 21. Wyznaczanie temperatury topnienia produktu GAPDH w reakcji rt-PCR. Temperatura topnienia produktu amplifikacji wyniosła 85,90°C.



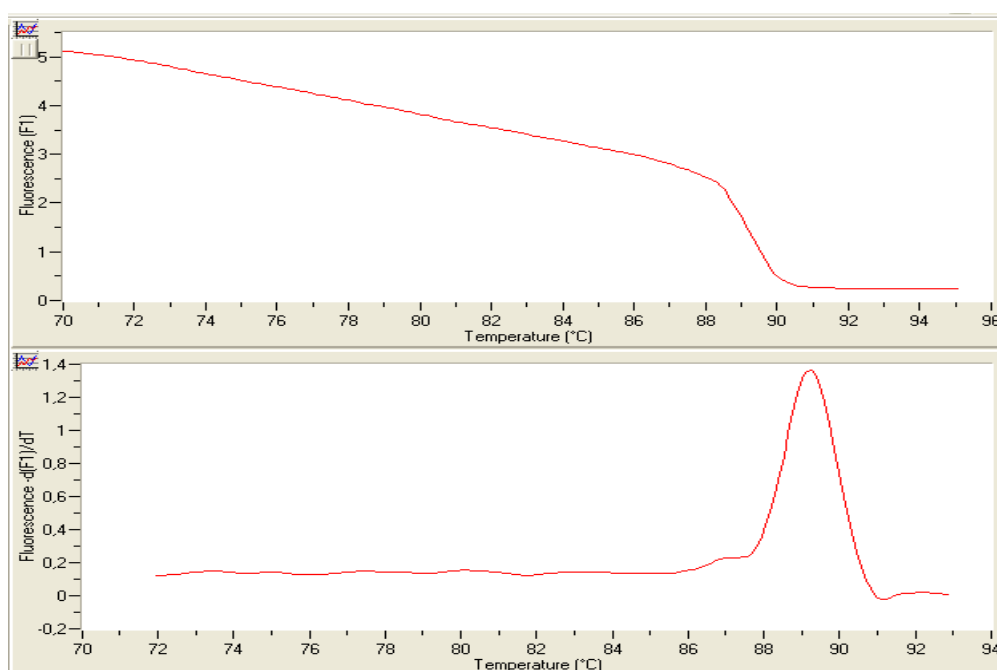
Rycina 22. Przebieg reakcji PCR w czasie rzeczywistym dla genu GAPDH przy różnych jego rozcieńczeniach cDNA. Krzywa wzorcowa dla GAPDH.

Pojedynczy pik krzywej topnienia cDNA GAPDH wskazuje na specyficzność amplifikowanego produktu (Rycina 21). W podobny sposób wykonano krzywe topnienia dla genów analizowanych w niniejszej pracy.

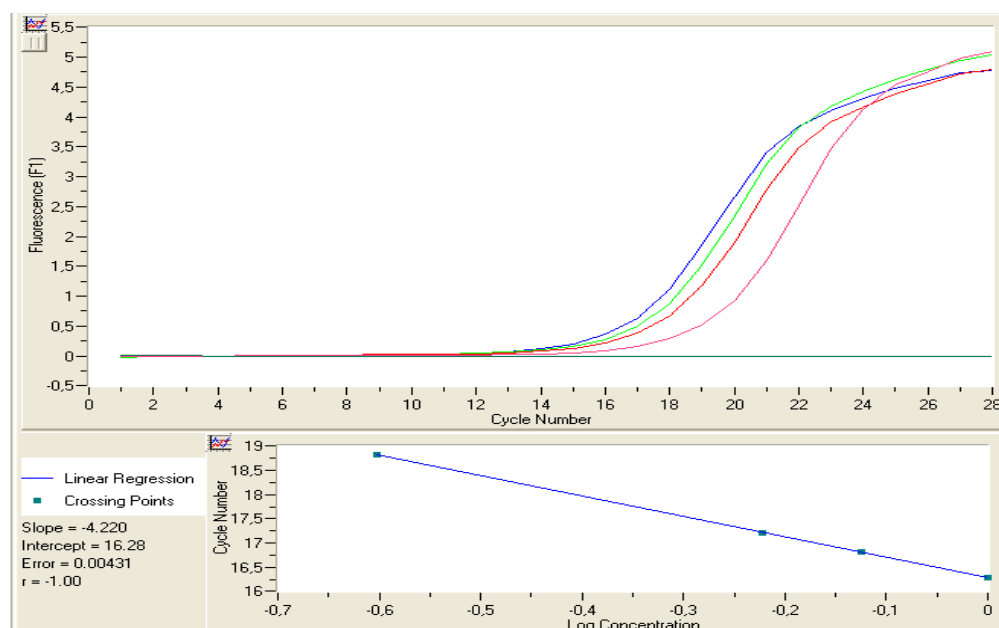
4.3. Analiza poziomu transkryptu CYP2D2 w modelu *in vivo*

4.3.1. Ocena ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym dla produktu amplifikacji cDNA CYP2D2

W ilościowej analizie ekspresji genu CYP2D2 wykorzystano bardzo czułą i powtarzalną reakcję PCR w czasie rzeczywistym. Wyznaczono temperaturę topnienia produktu (ang. *melting temperature*, T_m), zależną od jego długości i sekwencji, oraz krzywą standardową sporządzoną poprzez wykorzystanie rozcieńczeń cDNA dla tego genu (Rycina 23, Rycina 24).



Rycina 23. Wyznaczanie temperatury topnienia produktu CYP2D2 w reakcji rt-PCR. Temperatura topnienia produktu amplifikacji wyniosła 89,22°C.

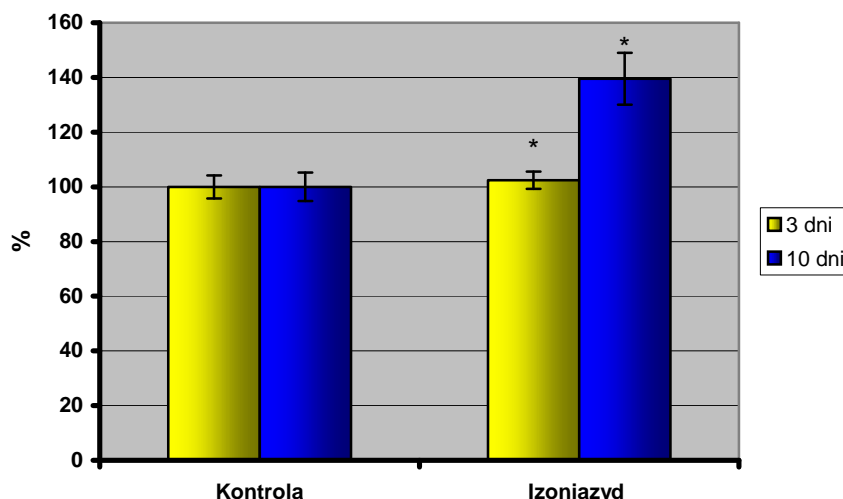


Rycina 24. Przebieg reakcji PCR w czasie rzeczywistym dla genu CYP2D2 przy różnych jego rozcieńczeniach cDNA. Krzywa wzorcowa dla CYP2D2.

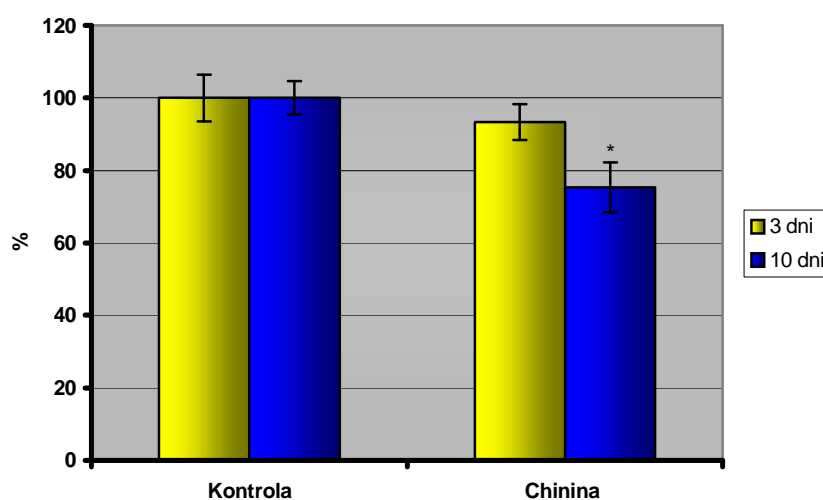
4.3.2. Analiza wpływu substancji wzorcowych na poziom transkryptu CYP2D2

W doświadczeniu, dla wyjaśnienia mechanizmu indukcji interakcji, określono jednocześnie wpływ wzorcowych syntetycznych substancji, czyli izoniazyd stanowiący odpowiednio induktor genu CYP2D2 oraz chinina, będąca potencjalnym inhibitorem aktywności tego genu. Uzyskane wyniki standaryzowano wobec genu referencyjnego – GAPDH, po czym przedstawiono w postaci wykresów jako wartość względną w odniesieniu do grupy kontrolnej. Próbkę niepoddaną procedurze doświadczalnej oznaczono jako kontrolę, dla której ilość transkryptu uznano za względny poziom ekspresji i przyjęto dla nich wartość 1.

Na podstawie uzyskanych wyników wykazano, że izoniazyd w dawce 150 mg/kg i.p. podawany przez okres 3 dni nie wywołał w komórkach wątroby zmian w ilości transkryptu CYP2D2 w porównaniu z grupą kontrolną (Rycina 25). Po 10 dniach zaobserwowano natomiast blisko 40% ($p = 0,017$) wzrost poziomu transkryptu badanego genu względem próby niepoddanej procedurze eksperymentalnej.



Rycina 25. Analiza wpływu izoniazydu na poziom transkryptu genu CYP2D2 z wykorzystaniem reakcji rt-PCR w komórkach wątroby szczurów rasy Wistar po 3 i 10 dniach podawania preparatu. Mierzone zmiany poziomu cDNA odpowiadają zmianom w ilości mRNA CYP2D2 w komórkach. Wartość ilorazu cDNA CYP2D2 do GAPDH w próbie kontrolnej przyjęto jako 1. Na wykresie przedstawiono średnie wartości dla poszczególnych grup z zaznaczoną wartością SEM. * $p < 0,05$ (jednoczynnikowa ANOVA).



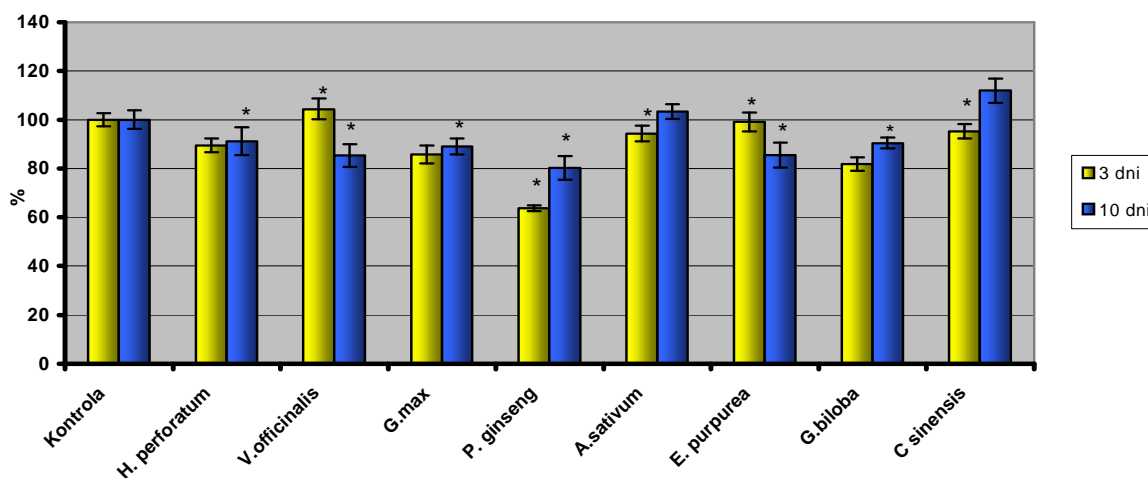
Rycina 26. Analiza wpływu syntetycznego inhibitora CYP2D - chininy na poziom transkryptu genu CYP2D2 z wykorzystaniem reakcji rt-PCR w komórkach wątroby szczurów rasy Wistar po 3 i 10 dniach podawania. Poziom cDNA odpowiada ilości mRNA CYP2D2 w komórkach. Wartość ilorazu cDNA CYP2D2 do GAPDH w próbie kontrolnej przyjęto jako 1. Na wykresie przedstawiono średnie wartości dla poszczególnych grup z zaznaczoną wartością SEM. * $p < 0,05$ (jednoczynnikowa ANOVA).

Zaobserwowano, iż chinina w dawce 20 mg/kg i.p. podawana przez 3 dni nie wywołuje zmian poziomu ekspresji CYP2D2 w porównaniu do grupy kontrolnej, natomiast po

10 dniach podawania chininy uzyskano istotny statystycznie efekt redukcji ekspresji badanego genu na poziomie blisko 25%, $p = 0,012$ (Rycina 26).

4.3.3. Analiza wpływu preparatów roślinnych na poziom ekspresji genu CYP2D2

Uzyskane wyniki badań wskazują, iż nie zaobserwowano znaczącego obniżenia poziomu ekspresji genu CYP2D2 w komórkach wątroby zwierząt otrzymujących wyciąg *H. perforatum* w dawce 300 mg/kg p.o. przez okres 3 i 10 dni (Rycina 27). W obu przypadkach przy różnica w ilości cDNA badanego genu pomiędzy grupami otrzymującymi wyciąg i grupą kontrolną wyniosła około 10%. Podobny efekt uzyskano w przypadku stosowania *G. max* w dawce 100 mg/kg p.o., gdzie poziom ilości cDNA w grupach badanych względem grupy kontrolnej mieściły się w zakresie 14% ($p = 0,502$) po 3 dniach i 11% ($p = 0,002$) po 10 dniach podawania ekstraktu.



Rycina 27. Analiza wpływu preparatów roślinnych na poziom transkryptu CYP2D2 z wykorzystaniem reakcji rt-PCR w komórkach wątroby szczurów rasy Wistar po 3 i 10 dniach podawania. Mierzony poziom cDNA odpowiada ilości mRNA CYP2D2 w komórkach. Wartość ilorazu DNA CYP2D2 do GAPDH w próbie kontrolnej przyjęto jako 1. Na wykresie przedstawiono średnie wartości dla poszczególnych grup z zaznaczoną wartością SEM. * $p < 0,05$ (jednoczynnikowa ANOVA).

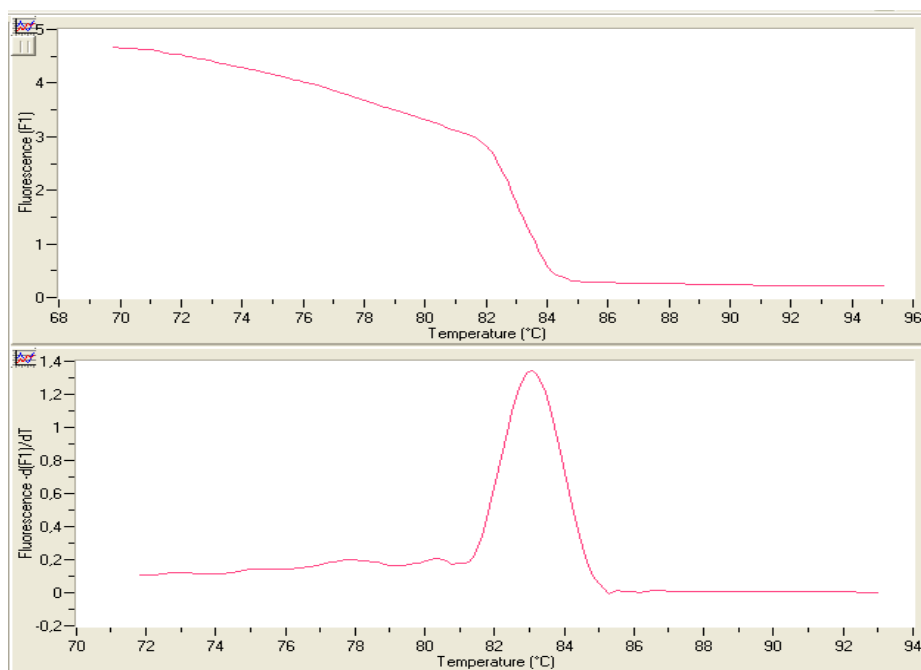
Zastosowanie kozłka lekarskiego w postaci wyciągu w dawce 300 mg/kg p.o. przez okres 3 dni nie wpłynęło znacząco na ilość transkryptu badanego genu względem grupy

niepoddanej procedurze eksperymentalnej. Efekt nieznacznego obniżenia poziomu cDNA genu CYP2D2 zaobserwowano po 10 dniach podawania ekstraktu względem grupy kontrolnej i osiągnął on wartość 15% ($p = 0,002$). Natomiast hodowla z zastosowaniem ekstraktu z żeń-szenia w dawce 30 mg/kg przez okres 3 i 10 dni redukowała poziom ekspresji CYP2D2 odpowiednio o blisko 36% ($p < 0,001$) i 20% ($p < 0,001$). W badaniu w obu przypadkach wykazano statystycznie istotną różnicę pomiędzy grupami badanymi a grupą kontrolną karmioną standardową dietą. W przypadku podawania wyciągu *A. sativum* zarówno przez 3 jak i 10 dni w dawce 250 mg/kg p.o. nie zaobserwowano zmian w poziomie mRNA badanego genu w komórkach wątroby badanych zwierząt. Stosowanie wyciągu *E. purpurea* przez 3 dni w dawce 50 mg/kg p.o. nie wywoływało również zmian w poziomie mRNA CYP2D2. W rezultacie podawania przez okres 10 dni danego ekstraktu obserwowano tendencję obniżania w ilości analizowanego transkryptu o wartość około 14% ($p = 0,004$) w porównaniu do grupy kontrolnej. U szczurów otrzymujących przez okres 3 dni wyciąg *G. biloba* podawany w dawce 200 mg/kg p.o. zanotowano niewielkie, nieistotne statystycznie obniżenie poziomu ekspresji CYP2D2 w komórkach wątroby o 18% ($p = 0,93$), natomiast przedłużenie okresu podawania preparatu z miłorzębu w danej dawce do 10 dni spowodowało istotny statystycznie spadek poziomu transkrypcji badanego genu tylko o wartość 10% ($p = 0,002$) względem grupy kontrolnej. Wyniki badań wykazały również, że *C. sinensis* w dawce 250 mg/kg p.o. nie wywołuje zmian w poziomie mRNA CYP2D2 w komórkach wątroby badanych zwierząt po 3 dniach jej podawania, natomiast po wydłużeniu doświadczenia do 10 dni zaobserwowano minimalny, osiągający zaledwie 12% ($p = 0,412$) podwyższony poziom transkryptu dla badanego genu.

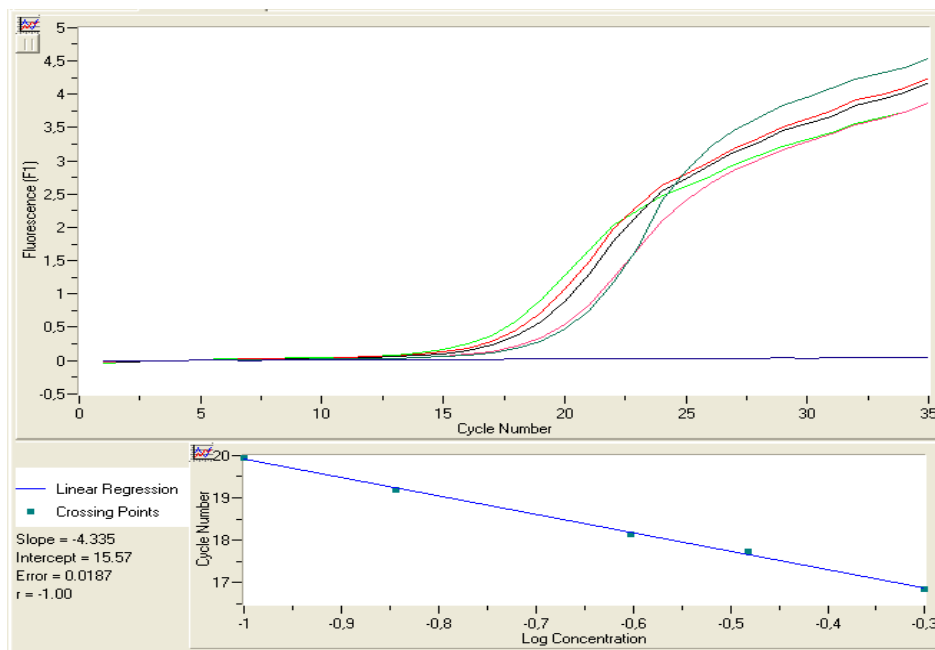
4.4. Analiza poziomu transkryptu CYP3A1 w modelu *in vivo*

4.4.1. Ocena ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym dla produktu amplifikacji cDNA CYP3A1

W analizie poziomu ekspresji CYP3A1 wyznaczono temperaturę topnienia cDNA badanego genu, wskazującą na specyficzność amplifikowanego produktu oraz krzywą wzorcową sporządzoną poprzez wykonanie serii rozcieńczeń cDNA (Rycina 28, Rycina 29).



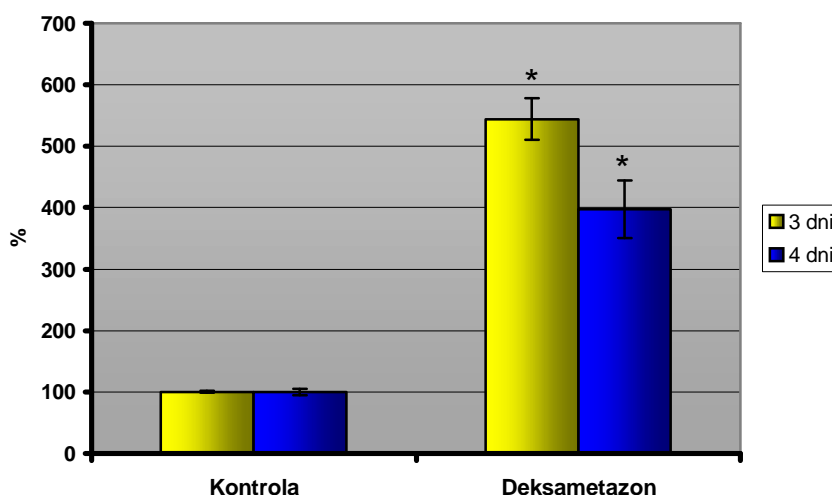
Rycina 28. Wyznaczanie temperatury topnienia produktu CYP3A1 w reakcji rt-PCR. Temperatura topnienia produktu amplifikacji wyniosła 83,06°C.



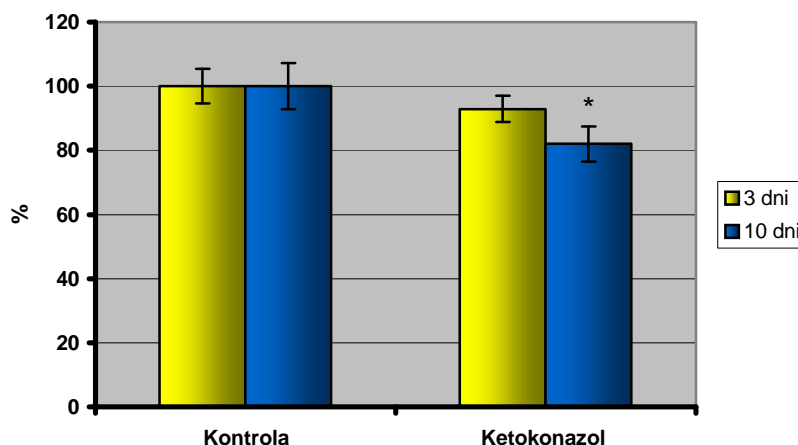
Rycina 29. Przebieg reakcji PCR w czasie rzeczywistym dla genu CYP3A1 przy różnych jego rozcieńczeniach cDNA. Krzywa wzorcowa dla CYP3A1.

4.4.2. Analiza wpływu substancji wzorcowych na poziom transkryptu CYP3A1

Deksametazon w dawce 50 mg/kg i.p. stosowany przez 3 dni wywołał indukcję CYP3A1 na poziomie 5,4-krotnym ($p < 0,001$) w porównaniu do grupy kontrolnej (Rycina 30). Efekt ten utrzymał się i po 4 dniach podawania poziom transkryptu dla tego genu osiągnął wartość blisko 4-krotnie ($p < 0,001$) wyższą względem grupy niepoddanej procedurze doświadczalnej. W przypadku wydłużenia eksperymentu do 10 dni, deksametazon w dawce 50 mg/kg i.p. wywoływał efekt śmiertelny wśród zwierząt, w wyniku wystąpienia silnej hepatotoksyczności wątroby.



Rycina 30. Analiza wpływu syntetycznego induktora CYP3A (deksametazon) na poziom transkryptu badanego genu CYP3A1 z wykorzystaniem reakcji rt-PCR w komórkach wątroby szczurów rasy Wistar po 3 i 4 dniach podawania preparatu. Mierzone zmiany poziomu cDNA odpowiadają zmianom w ilości mRNA CYP3A1 w komórkach. Wartość ilorazu cDNA CYP3A1 do GAPDH w próbie kontrolnej przyjęto jako 1. Na wykresie przedstawiono średnie wartości dla poszczególnych grup z zaznaczoną wartością SEM. * $p < 0,05$ (jednoczynnikowa ANOVA).



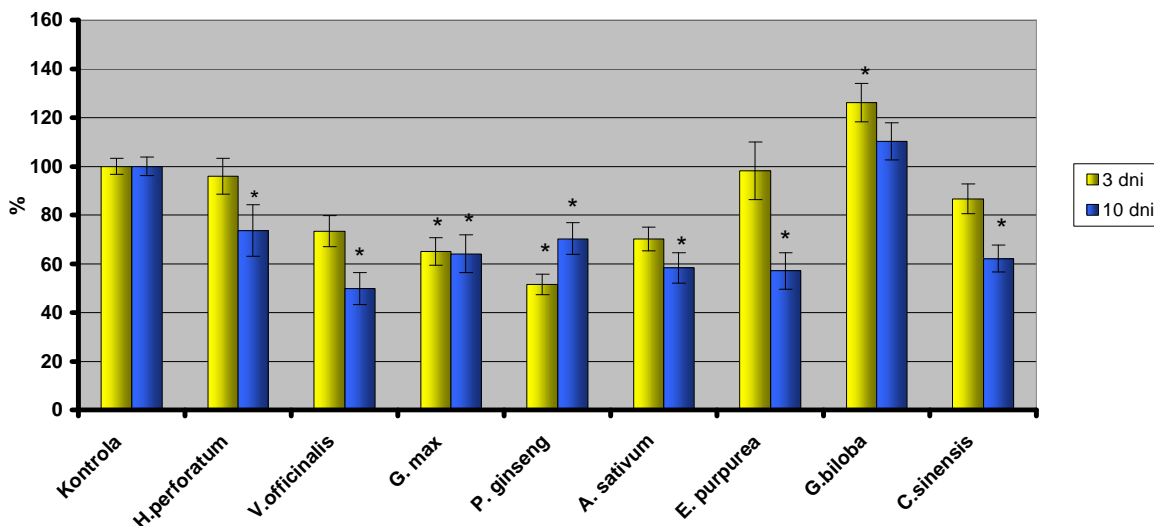
Rycina 31. Analiza wpływu ketokonazolu na poziom transkryptu genu CYP3A1 z wykorzystaniem reakcji rt-PCR w komórkach wątroby szczurów rasy Wistar po 3 i 10 dniach podawania. Poziom cDNA odpowiada ilości mRNA CYP3A1 w komórkach. Wartość ilorazu cDNA CYP3A1 do GAPDH w próbie kontrolnej przyjęto jako 1. Na wykresie przedstawiono średnie wartości dla poszczególnych grup z zaznaczoną wartością SEM. * $p < 0,05$ (jednoczynnikowa ANOVA).

Ketokonazol w dawce 10 mg/kg i.p. podawany przez 3 dni nie wywołał znaczących zmian w poziomie ekspresji CYP3A1 w porównaniu do grupy kontrolnej (Rycina 31). Po 10 dniach podawania ketokonazolu zaobserwowano natomiast tendencję hamowania ekspresji badanego genu na poziomie nie przekraczającym 18% ($p = 0,013$).

4.4.3. Analiza wpływu preparatów roślinnych na poziom ekspresji genu CYP3A1

Zastosowanie dziurawca zwyczajnego w postaci wyciągu w dawce 300 mg/kg p.o. przez okres 3 dni nie wpłynęło znacząco na ilość transkryptu badanego genu względem grupy niepoddanej procedurze eksperymentalnej (Rycina 32). Efekt obniżenia poziomu cDNA genu CYP3A1 zaobserwowano po 10 dniach podawania ekstraktu i względem grupy kontrolnej osiągnął on wartość 26% ($p = 0,009$). Wyciąg kozłka lekarskiego w dawce 300 mg/kg p.o. podawany przez okres 3 dni obniżył również istotnie statystycznie ilość transkryptu genu CYP3A1 o 27% ($p = 0,248$) względem grupy karmionej standardową dietą. Spadek ten zwiększył się po 10 dniach hodowli i wyniósł 50% w stosunku do grupy kontrolnej ($p < 0,001$). Podobny efekt zaobserwowano u szczurów otrzymujących przez okres 3 dni wyciąg soi zwyczajnej podawany w dawce 100 mg/kg p.o., gdzie zanotowano znamiennej statystycznie redukcję stężenia cDNA o 35% ($p = 0,021$) w stosunku do grupy kontrolnej.

Efekt ten utrzymywał się po wydłużeniu doświadczenia do 10 dni, a spadek ilości transkryptu tego genu wyniósł odpowiednio 36% ($p < 0,001$).



Rycina 32. Analiza wpływu preparatów roślinnych na poziom transkryptu CYP3A1 z wykorzystaniem reakcji rt-PCR w komórkach wątroby szczurów rasy Wistar po 3 i 10 dniach podawania. Mierzony poziom cDNA odpowiada ilości mRNA CYP3A1 w komórkach. Wartość ilorazu cDNA CYP3A1 do GAPDH w próbie kontrolnej przyjęto jako 1. Na wykresie przedstawiono średnie wartości dla poszczególnych grup z zaznaczoną wartością SEM. * $p < 0,05$ (jednoczynnikowa ANOVA).

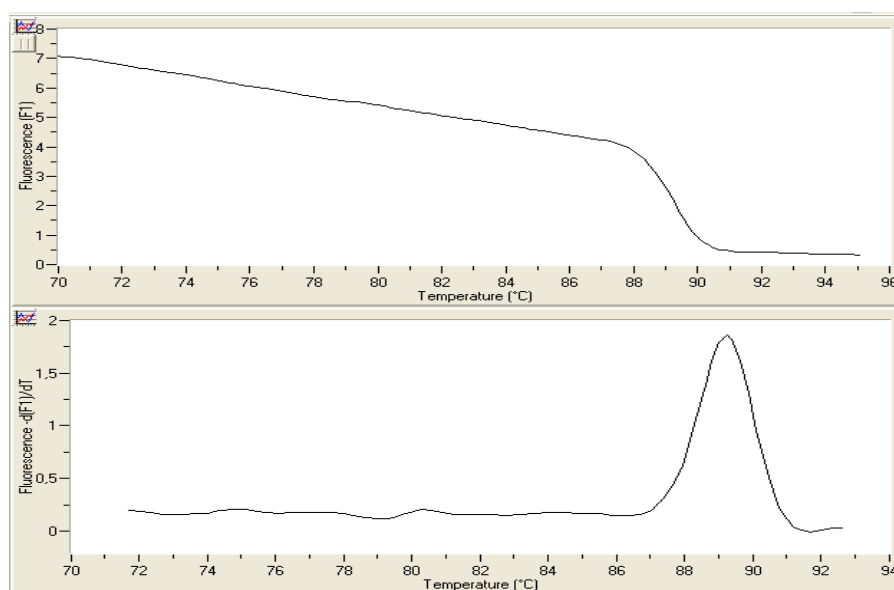
W przypadku zastosowania wyciągu z żeń-szenia przez okres zarówno 3 dni jak i 10 dni w dawce 30 mg/kg p.o. zaobserwowano istotne statystycznie obniżenie poziomu mRNA dla badanego genu odpowiednio o blisko 50% ($p < 0,001$) i 30% ($p < 0,001$) względem grupy kontrolnej karmionej standardową dietą. Granulat czosnku pospolitego podawany przez okres 3 dni w dawce 250 mg/kg p.o. redukował poziom ekspresji genu CYP3A1 w komórkach wątroby u szczurów o 30% ($p = 0,064$). Konsekwencją przedłużenia okresu podawania czosnku w podanej dawce do 10 dni zanotowano istotny statystycznie spadek poziomu transkrypcji CYP3A1 o 42% ($p < 0,001$) względem próby niepoddanej procedurze eksperymentalnej. Wyciąg jeżówki purpurowej podawany przez okres 3 dni w dawce 50 mg/kg p.o. nie wpływał na poziom ekspresji genu CYP3A1 w komórkach wątroby u szczurów, przy czym przedłużenie okresu podawania ekstraktu w podanej dawce do 10 dni wywołało istotny statystycznie spadek poziomu transkrypcji CYP3A1 o 43% ($p < 0,001$) względem grupy kontrolnej. W przypadku zwierząt laboratoryjnych (szczur), których dieta wzbogacona została wyciągiem z *G. biloba* w dawce 200 mg/kg p.o., po 3 dniach w komórkach wątroby zaobserwowano nieznaczny wzrost ilości cDNA dla genu CYP3A1

o wartość 26% ($p < 0,001$) względem grupy odniesienia. Wyniki analiz tkanki wątrobowej zwierząt po 10 dniach stosowania preparatu z miłorzębu wskazywały brak wpływu na poziom transkryptu tego genu, ponieważ zanotowano nieznaczny wzrost ilości mRNA o 10% ($p = 0,685$). Ponadto badania wykazały, że w przypadku podawania wyciągu zielonej herbaty w dawce 300 mg/kg p.o. przez okres 3 dni zanotowano niewielkie, nieistotne statystycznie obniżenie poziomu ekspresji genu CYP3A1 w komórkach wątroby o 13% ($p = 0,567$). Konsekwencją przedłużenia okresu podawania tego preparatu w danej dawce do 10 dni zaobserwowano istotny statystycznie spadek poziomu transkrypcji CYP3A1 o wartość 38% ($p < 0,001$) względem grupy kontrolnej.

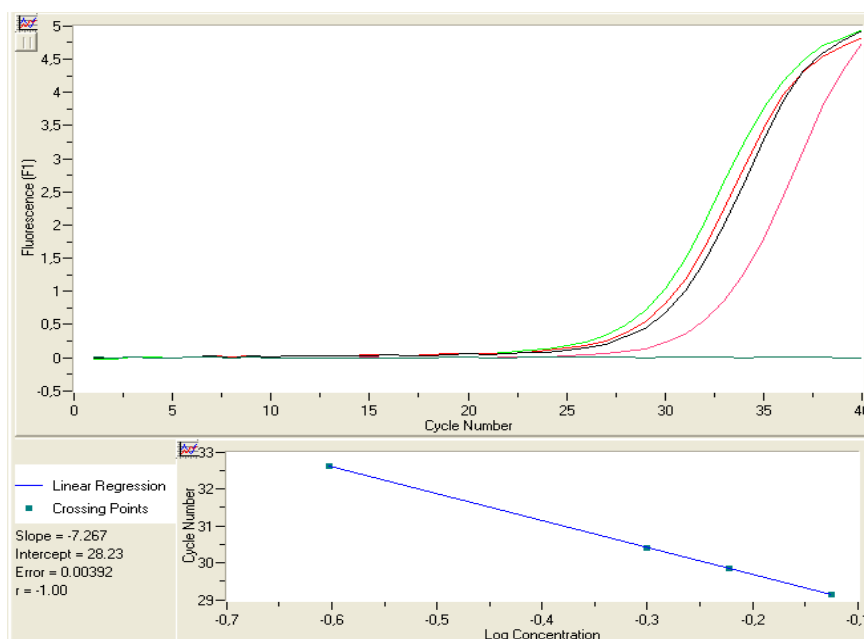
4.5. Analiza poziomu transkryptu PXR w modelu *in vivo*

4.5.1. Ocena ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym dla produktu amplifikacji cDNA czynnika PXR

Na podstawie krzywej topnienia zidentyfikowano występowanie pojedynczego pik, co wskazuje na obecność produktu amplifikacji o T_m równej $89,20^{\circ}\text{C}$ i pozwala na określenie specyficzności reakcji. Przykładowy wykres przedstawiający wyznaczenie temperatury topnienia produktu, przebieg reakcji amplifikacji i krzywą wzorcową pozwalającą oszacować ilości transkryptu analizowanego czynnika PXR zamieszczono odpowiednio na Rycinie 33 i 34.

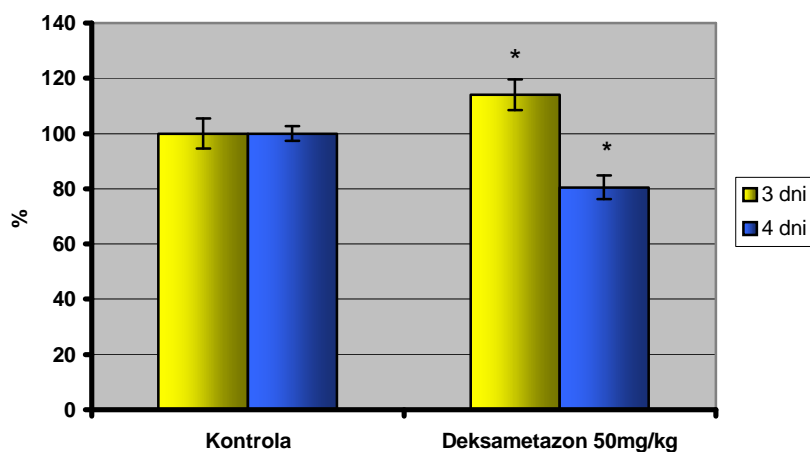


Rycina 33. Wyznaczanie temperatury topnienia produktu PXR w reakcji rt-PCR. Temperatura topnienia produktu amplifikacji wyniosła $89,20^{\circ}\text{C}$.



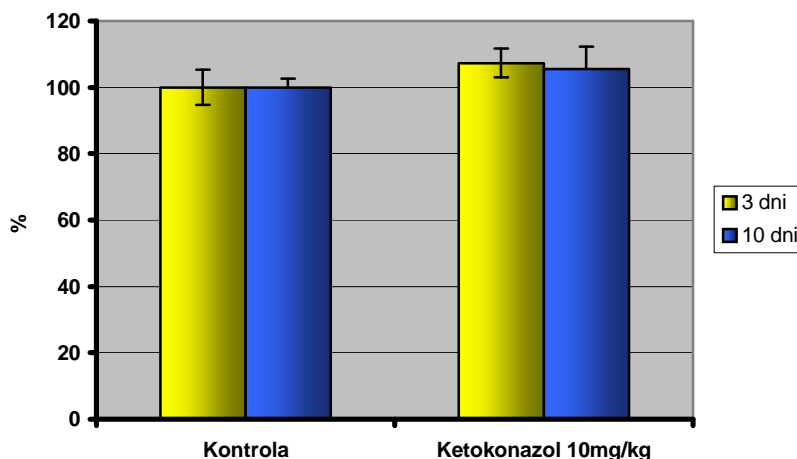
Rycina 34. Przebieg reakcji PCR w czasie rzeczywistym dla transkryptu PXR przy różnych jego rozcieńzeniach cDNA. Krzywa wzorcowa dla PXR.

4.5.2. Analiza wpływu substancji wzorcowych dla CYP3A1 na poziom transkryptu PXR



Rycina 35. Analiza wpływu deksametazonu na poziom transkryptu PXR z wykorzystaniem reakcji rt-PCR w komórkach wątroby szczurów rasy Wistar po 3 i 4 dniach podawania. Poziom cDNA odpowiada ilości mRNA czynnika PXR w komórkach. Wartość ilorazu cDNA PXR do GAPDH w próbie kontrolnej przyjęto jako 1. Na wykresie przedstawiono średnie wartości dla poszczególnych grup z zaznaczoną wartością SEM. * $p < 0,05$ (jednoczynnikowa ANOVA).

Zaobserwowano, że deksametazon stanowiący induktor CYP3A1 podawany w dawce 50 mg/kg i.p. przez okres 3 dni nie powoduje znaczących zmian w poziomie transkryptu receptora pregnanu X, natomiast po 4 dniach stosowania powyższego preparatu zauważono znamienne statystycznie obniżenie poziomu mRNA badanego genu o wartość 20% ($p < 0,001$) względem grupy kontrolnej niepoddanej procedurze eksperymentalnej (Rycina 35).



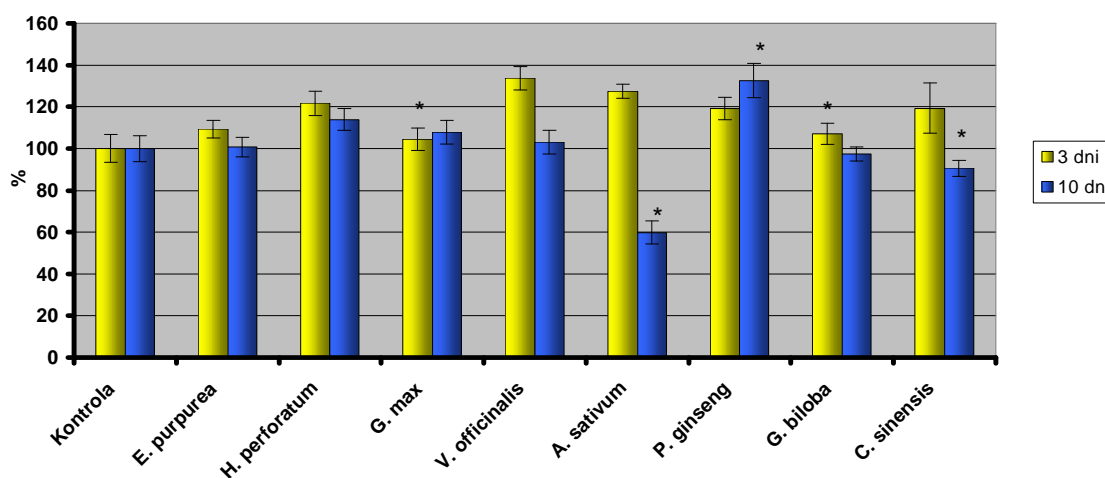
Rycina 36. Analiza wpływu ketokonazolu na poziom transkryptu PXR z wykorzystaniem reakcji rt-PCR w komórkach wątroby szczurów rasy Wistar po 3 i 10 dniach podawania. Poziom cDNA odpowiada ilości mRNA czynnika PXR w komórkach. Wartość ilorazu cDNA PXR do GAPDH w próbie kontrolnej przyjęto jako 1. Na wykresie przedstawiono średnie wartości dla poszczególnych grup z zaznaczoną wartością SEM. * $p < 0,05$ (jednoczynnikowa ANOVA).

Wykazano również, iż ketokonazol jako potencjalny inhibitorem CYP3A1 stosowany w dawce 10 mg/kg i.p. przez okres 3 i 10 dni powodował brak zmian w poziomie ekspresji czynnika PXR (Rycina 36). W związku z powyższym w obu przypadkach poziom transkryptu analizowanego receptora nie odbiegał znacząco od grupy kontrolnej, a różnica mieszcząca się w granicach 5-7% nie była istotna statystycznie.

4.5.3. Analiza wpływu preparatów roślinnych na poziom ekspresji mRNA czynnika PXR

W komórkach wątroby zwierząt otrzymujących wyciąg *E. purpurea* w dawce 50 mg/kg p.o. przez okres 3 i 10 dni wykazano brak wpływu na poziom transkryptu receptora pregnanu X względem grupy kontrolnej karmionej standardową dietą (Rycina 37). Podobny efekt uzyskano w przypadku stosowania soi zwyczajnej w postaci wyciągu (100 mg/kg p.o.)

oraz miłorzębu dwuklapowego (200 mg/kg p.o.) przez 3 i 10 dni, gdzie również nie zanotowano istotnych zmian w poziomie mRNA badanego receptora wobec próby niepoddanej procedurze eksperymentalnej. W wyniku stosowania wyciągu dziurawca zwyczajnego w dawce 300 mg/kg podawanego dożołądkowo po 3 i 10 dniach eksperymentu zaobserwowano nieznaczne podwyższenie ilość transkryptu PXR o odpowiednio o ok. 22% ($p = 0,395$) i 14% ($p = 0,452$) względem grupy kontrolnej, przy czym wyniki te nie wykazywały znamienności statystycznej. Efekt wzrostu poziomu cDNA badanego genu wykazano po 3 dniach podawania ekstraktu kozłka lekarskiego w dawce 300 mg/kg p.o. i względem grupy kontrolnej osiągnął on wartość 34% ($p = 0,62$), przy czym wynik ten również nie wykazywał znamienności statystycznej. Konsekwencją przedłużenia okresu podawania tego preparatu do 10 dni zaobserwowano natomiast brak wpływu na poziom transkryptu analizowanego receptora względem próby niepoddanej procedurze eksperymentalnej.



Rycina 37. Analiza wpływu preparatów roślinnych na poziom transkryptu PXR z wykorzystaniem reakcji rt-PCR w komórkach wątroby szczurów rasy Wistar po 3 i 10 dniach podawania. Mierzony poziom cDNA odpowiada ilości mRNA czynnika PXR w komórkach. Wartość ilorazu cDNA PXR do GAPDH w próbie kontrolnej przyjęto jako 1. Na wykresie przedstawiono średnie wartości dla poszczególnych grup z zaznaczoną wartością SEM. * $p < 0,05$ (jednoczynnikowa ANOVA).

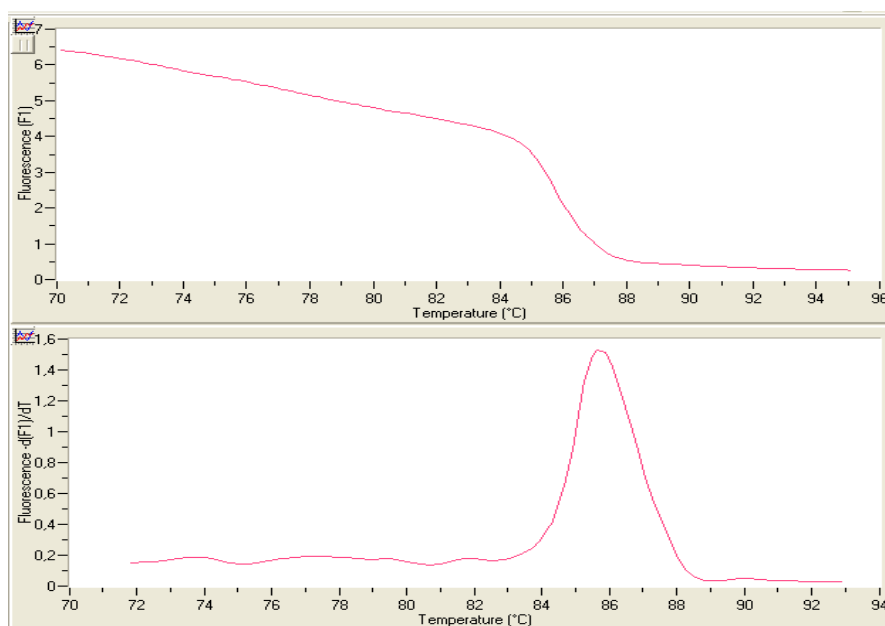
W przypadku hodowli zwierząt otrzymujących wyciąg *A. sativum* (250 mg/kg p.o.) po 3 dniach stosowania zanotowano w komórkach wątroby nieznaczne podwyższenie poziomu ekspresji PXR o 27% ($p = 0,795$). W wyniku wydłużenia doświadczenia do 10 dni wykazano istotny statystycznie spadek ilości transkryptu badanego receptora o 40% ($p < 0,001$)

względem grupy kontrolnej. Analiza rt-PCR wykazała również u zwierząt laboratoryjnych (szczur), których dieta wzbogacona została wyciągiem z *C. sinensis* w dawce 300 mg/kg p.o., nieznaczny wzrost ilości cDNA w komórkach wątroby dla PXR o wartość 19% ($p = 0,487$) po 3 dniach, natomiast po 10 dniach eksperymentu nie zanotowano znaczących zmian w poziomie transkryptu receptora, bowiem różnica względem grupy kontrolnej osiągnęła zaledwie 10% ($p = 0,034$). Ponadto, w komórkach wątroby zwierząt otrzymujących wyciąg *P. ginseng* (30 mg/kg p.o.) po 3 dniach stosowania wykazano nieznaczne podwyższenie ilości cDNA dla PXR o wartość 19% ($p = 0,025$). Podobny efekt zaobserwowano u szczurów po wydłużeniu doświadczenia do 10 dni, gdzie zanotowano znamiennej statystycznie wzrost poziomu ekspresji receptora o 33% ($p < 0,027$) w stosunku do grupy kontrolnej.

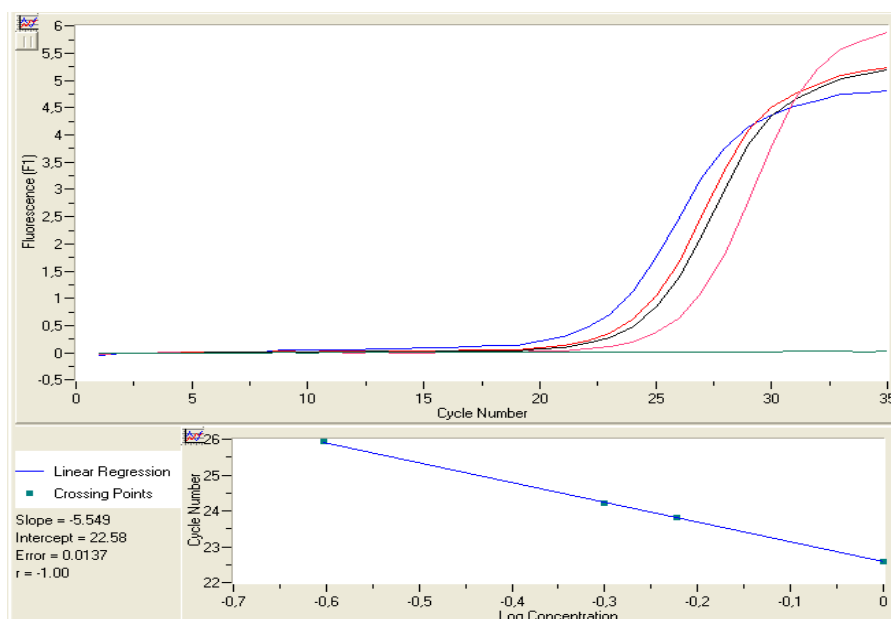
4.6. Analiza poziomu transkryptu CAR w modelu *in vivo*

4.6.1. Ocena ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym dla produktu amplifikacji cDNA czynnika CAR

Analiza krzywej topnienia dla konstytutywnego receptora androstanu – CAR wykazała obecność produktu amplifikacji o T_m równej 85,84°C. Wykresy przedstawiające temperaturę topnienia cDNA produktu, przebieg reakcji amplifikacji oraz krzywą wzorcową zamieszczono poniżej (Rycina 38, Rycina 39).

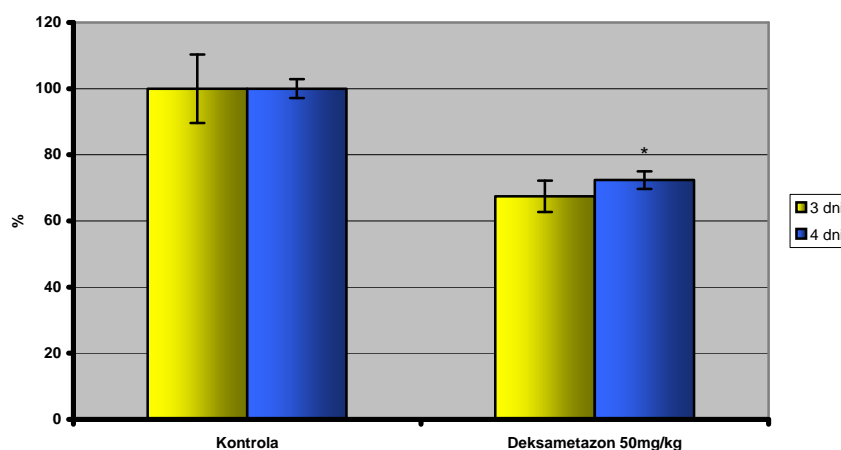


Rycina 38. Wyznaczanie temperatury topnienia produktu CAR w reakcji rt-PCR. Temperatura topnienia produktu amplifikacji wyniosła 85,84°C.



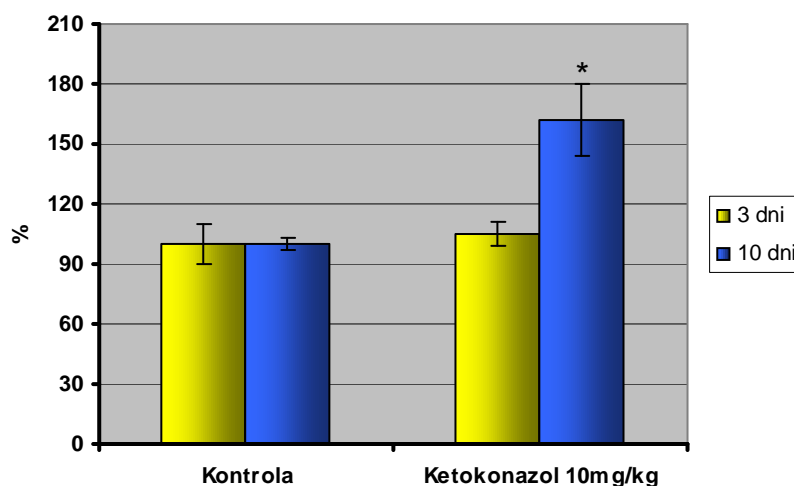
Rycina 39. Przebieg reakcji PCR w czasie rzeczywistym dla transkryptu CAR przy różnych jego rozcieńczeniach cDNA. Krzywa wzorcowa dla CAR.

4.6.2. Analiza wpływu substancji wzorcowych dla CYP3A1 na poziom transkryptu CAR



Rycina 40. Analiza wpływu deksametazonu na poziom transkryptu CAR z wykorzystaniem reakcji rt-PCR w komórkach wątroby szczurów rasy Wistar po 3 i 4 dniach podawania. Poziom cDNA odpowiada ilości mRNA czynnika CAR w komórkach. Wartość ilorazu cDNA CAR do GAPDH w próbie kontrolnej przyjęto jako 1. Na wykresie przedstawiono średnie wartości dla poszczególnych grup z zaznaczoną wartością SEM. * $p < 0,05$ (jednoczynnikowa ANOVA).

Deksametazon w dawce 50 mg/kg i.p. podawany przez okres 3 dni wywołał w komórkach wątroby spadek ilości transkryptu czynnika CAR o 33% ($p = 0,16$) w porównaniu do grupy zwierząt niepoddanej procedurze eksperymentalnej. Podobny efekt uzyskano po 4 dniach stosowania preparatu, gdzie poziom ekspresji tego genu uległ obniżeniu o blisko 28%, $p < 0,001$ (Rycina 40).



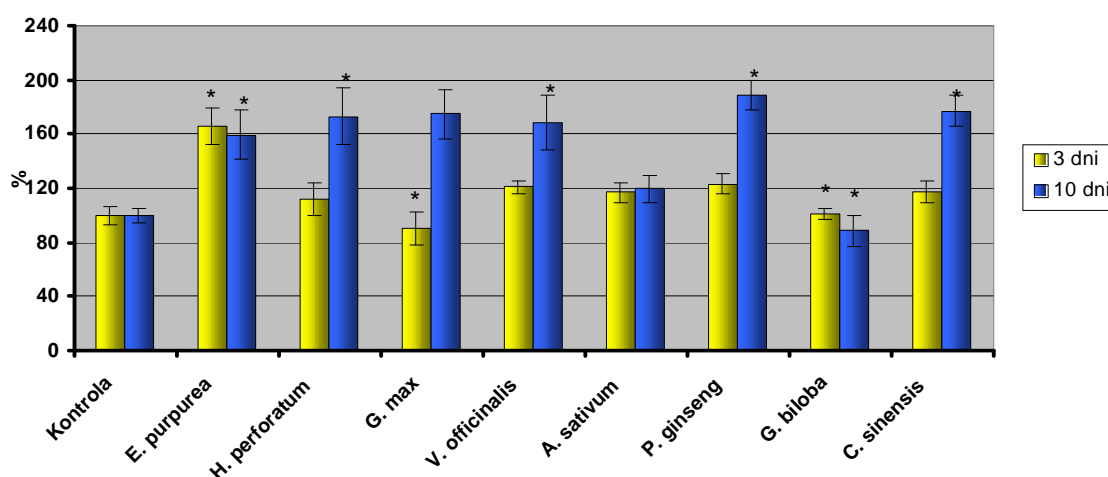
Rycina 41. Analiza wpływu ketokonazolu na poziom transkryptu CAR z wykorzystaniem reakcji rt-PCR w komórkach wątroby szczurów rasy Wistar po 3 i 10 dniach podawania. Poziom cDNA odpowiada ilości mRNA czynnika CAR w komórkach. Wartość ilorazu cDNA CAR do GAPDH w próbie kontrolnej przyjęto jako 1. Na wykresie przedstawiono średnie wartości dla poszczególnych grup z zaznaczoną wartością SEM. * $p < 0,05$ (jednoczynnikowa ANOVA).

Podawanie ketokonazolu w dawce 10 mg/kg i.p. przez okres 3 dni nie powodowało w komórkach wątroby zmian w poziomie mRNA konstytutywnego receptora androstanu, podczas gdy stosowanie tego preparatu przez 10 dni wywołało istotny statystycznie wzrost transkryptu badanego genu o 62% ($p = 0,044$) w porównaniu do grupy kontrolnej (Rycina 41).

4.6.3. Analiza wpływu preparatów roślinnych na poziom ekspresji mRNA czynnika CAR

W komórkach wątroby zwierząt otrzymujących wyciąg *E. purpurea* w dawce 50 mg/kg p.o. przez okres 3 dni wykazano znamienne statystycznie podwyższenie ilości transkryptu konstytutywnego receptora androstanu o wartość 66% ($p = 0,013$) (Rycina 42). Podobny efekt zaobserwowano u szczurów po wydłużeniu doświadczenia do 10 dni, gdzie zanotowano znamienne statystycznie wzrost poziomu ekspresji receptora o 60% ($p = 0,033$)

w stosunku do grupy niepoddanej procedurze eksperymentalnej. W przypadku hodowli zwierząt laboratoryjnych poddanych działaniu preparatu *H. perforatum* (300 mg/kg p.o.) przez okres 3 dni nie zaobserwowano wpływu zastosowanego wyciągu na poziom oznaczanego w reakcji ilości transkryptu badanego genu. Po 10 dniach eksperymentu nastąpiło podwyższenie poziomu transkryptu CAR, przy czym względem grupy kontrolnej była to zmiana wielkości 73% ($p = 0,015$). Podobny efekt obserwowano w wyniku podawania soi zwyczajnej w dawce 100 mg/kg p.o., gdzie zanotowano po 10 dniach wzrost poziomu ekspresji CAR o 75% ($p = 0,837$) w stosunku do próby niepoddanej procedurze eksperymentalnej.



Rycina 42. Analiza wpływu preparatów roślinnych na poziom transkryptu CAR z wykorzystaniem reakcji rt-PCR w komórkach wątroby szczurów rasy Wistar po 3 i 10 dniach podawania. Mierzony poziom cDNA odpowiada ilości mRNA czynnika CAR w komórkach. Wartość ilorazu cDNA CAR do GAPDH w próbie kontrolnej przyjęto jako 1. Na wykresie przedstawiono średnie wartości dla poszczególnych grup z zaznaczoną wartością SEM.

* $p < 0,05$ (jednoczynnikowa ANOVA).

Zastosowanie wyciągu kozłka lekarskiego w dawce 300 mg/kg p.o. przez okres 3 dni wywołało nieznaczne podwyższenie ilości cDNA analizowanego receptora o wartość 21% ($p = 0,837$), natomiast w przypadku wydłużenie okresu podawania tego preparatu do 10 dni wykazano znamienne statystycznie wzrost poziomu transkrypcji CAR o 68% ($p = 0,023$) względem grupy kontrolnej. Podobny efekt uzyskano odnośnie hodowli z wykorzystaniem wyciągu żeń-szenia w dawce 30 mg/kg podawanego dożołądkowo, przy czym wzrost ilości transkryptu tego receptora po 10 dniach kształtował się na poziomie 88% ($p < 0,001$). Ponadto, wyniki analiz tkanki wątrobowej zwierząt po 3 dniach stosowaniu preparatu

z *G. biloba* w dawce 200 mg/kg p.o. wskazywały na brak znaczących różnic w poziomie transkrypcji CAR względem próby niepoddanej procedurze eksperymentalnej. Podobny rezultat uzyskano przy dłuższym stosowaniu tego ekstraktu, bowiem różnica względem grupy kontrolnej osiągnęła wartość 12% ($p < 0,045$). U szczurów otrzymujących przez okres 3 dni wyciąg *A. sativum* podawany w dawce 250 mg/kg p.o. zanotowano niewielki wzrost stężenia cDNA w komórkach wątroby o 17% ($p = 0,582$) w stosunku do grupy kontrolnej, przy czym efekt ten utrzymał się i po 10 dniach zmiana ta wyniosła 20% ($p = 0,692$). W przypadku zwierząt laboratoryjnych, których dieta wzbogacona została wyciągiem z *C. sinensis* w dawce 300 mg/kg p.o. po 3 dniach w komórkach wątroby zaobserwowano nieznaczne podwyższenie ilości mRNA dla receptora CAR o wartość 17% ($p = 0,639$). Konsekwencją przedłużenia okresu podawania zielonej herbaty w podanej powyżej dawce do 10 dni zanotowano natomiast znamienne statystycznie wzrost poziomu transkrypcji CAR o 77% ($p < 0,001$) względem próby niepoddanej procedurze eksperymentalnej.

4.7. Określenie związku pomiędzy poziomem ekspresji CYP3A1 a receptorami jądrowymi PXR i CAR

W celu określenia istotnych różnic pomiędzy średnimi grupowanymi w układzie analizy wariancji wykorzystano test post-hoc (tzw. test Tukeya), który pozwala stwierdzić, które średnie różnią się istotnie między sobą. Na podstawie uzyskanych wyników z powyższej analizy poczyniono próbę określenia zależności pomiędzy ilością transkrypcji CYP3A1 a poziomem ekspresji receptorów jądrowych PXR i CAR uczestniczącymi w regulacji wspomnianej izoforny. Test ten wykonano ze względu na możliwość dokładniejszego oszacowania wpływu podawanych substancji roślinnych na poziom ekspresji badanych genów. Dla prawidłowego założenia niniejszej pracy odnośnie wykazania związku pomiędzy ekspresją CYP3A1 a badanymi receptorami jądrowymi zaangażowanymi w proces transkrypcji wspomnianej izoforny u podstaw molekularnego mechanizmu regulacji zastosowano substancje wzorcowe. Uzyskane wyniki testu porównań wybranych par średnich dla określenia wyżej prezentowanych założeń przedstawiono odpowiednio w Tabeli 23 i 24.

Tabela 23. Porównanie średnich dla poszczególnych prób w odniesieniu do analizowanych genów po zastosowaniu substancji wzorcowych, (n = 10)

Preparat	Gen	Średnia	Różnica średnich	Błąd standar.	P*	Średnia	Różnica średnich	Błąd standar.	P*
Induktor CYP3A1		3 dni				4 dni			
Deksametazon (50 mg/kg, i.p.)	CYP3A1	5,44	-4,458 ^a	0,212	< 0,001	3,97	-2,933 ^a	0,227	< 0,001
	PXR	1,14	-0,177 ^a 4,303 ^b	0,212 0,284	0,960 < 0,001	0,81	0,269 ^a 3,16 ^b	0,227 0,356	0,841 < 0,001
	CAR	0,67	0,304 ^a 4,769 ^b	0,212 0,284	0,708 < 0,001	0,72	0,422 ^a 3,242 ^b	0,227 0,356	0,442 < 0,001
Inhibitor CYP3A1		3 dni				10 dni			
Ketokonazol (10 mg/kg, i.p.)	CYP3A1	0,92	0,071 ^a	0,753	0,932	0,82	0,25 ^a	0,137	0,463
	PXR	1,07	-0,011 ^a -0,144 ^b	0,753 0,071	1,0 0,124	1,05	-0,034 ^a -0,236 ^b	0,137 0,161	1,0 0,325
	CAR	1,05	0,031 ^a -0,119 ^b	0,753 0,071	0,998 0,229	1,62	-0,445 ^a -0,799 ^b	0,137 0,161	0,953 < 0,001

^a Różnica średnich między grupą kontrolną a grupą badaną.

^b Różnica średnich między grupą badaną dla CYP3A1 a grupami PXR i CAR.

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

W oparciu o prezentowane dane z powyższej analizy wykazano, że wartości średnie odpowiednio zestawione dla poszczególnych badanych genów różnią się statystycznie istotnie zarówno po 3 jak i 4 dniach stosowania deksametazonu ($p < 0,001$ - istotna różnica między grupą kontrolną a grupą badaną dla CYP3A1 oraz pomiędzy grupami CYP3A1 a PXR i CAR). W przypadku ketokonazolu zaobserwowano jedynie po 10 dniach podawania istotną różnicę pomiędzy poziomem ekspresji CYP3A1 a czynnikiem CAR. W związku z tym, uzyskane wyniki w odniesieniu do substancji wzorcowych dla CYP3A1 wnoszą o pewnej zależności ekspresji tej izoformy względem ilości transkryptu CAR w hepatocytach, co natomiast trudno jest odnieść powyższy wysunięty postulat w stosunku do receptora pregnanu X, uwzględniając brak znaczących zmian w poziomie jego ekspresji.

Tabela 24. Porównanie średnich dla poszczególnych prób w odniesieniu do analizowanych genów po zastosowaniu standaryzowanych substancji roślinnych, (n = 10)

Preparat	Gen	Średnia	Różnica średnich	Błąd standar.	P*	Średnia	Różnica średnich	Błąd standar.	P*
Substancja roślinna		3 dni				10 dni			
<i>E. purpurea</i> (50 mg/kg, p.o.)	CYP3A1	0,98	-0,159 ^a	0,127	0,807	0,57	0,495 ^a	0,129	0,004
	PXR	1,09	0,201 ^a -0,111 ^b	0,127 0,147	0,613 0,737	1,01	0,067 ^a -0,459 ^b	0,129 0,175	0,995 0,036
	CAR	1,65	-0,434 ^a -0,676 ^b	0,127 0,147	< 0,001 < 0,001	1,59	-0,444 ^a -1,049 ^b	0,129 0,175	0,14 < 0,001
<i>H. perforatum</i> (300 mg/kg, p.o.)	CYP3A1	0,96	-0,136 ^a	0,108	0,803	0,74	0,33 ^a	0,148	0,242
	PXR	1,22	0,077 ^a -0,257 ^b	0,108 0,125	0,979 0,118	1,14	-0,065 ^a -0,403 ^b	0,148 0,206	0,998 0,145
	CAR	1,11	0,109 ^a -0,155 ^b	0,108 0,125	0,910 0,441	1,73	-0,58 ^a -0,996 ^b	0,148 0,206	0,003 < 0,001
<i>G. max</i> (100 mg/kg, p.o.)	CYP3A1	0,65	0,172 ^a	0,103	0,56	0,64	0,426 ^a	0,129	0,021
	PXR	1,05	0,248 ^a -0,394 ^b	0,103 0,118	0,174 0,007	1,08	-0,004 ^a -0,437 ^b	0,129 0,169	1,0 0,039
	CAR	0,91	0,314 ^a -0,258 ^b	0,103 0,118	0,040 0,091	1,75	-0,599 ^a -1,109 ^b	0,129 0,169	< 0,001 < 0,001
<i>V. officinalis</i> (300 mg/kg, p.o.)	CYP3A1	0,73	0,089 ^a	0,081	0,875	0,49	0,569 ^a	0,139	0,002
	PXR	1,34	-0,043 ^a -0,604 ^b	0,081 0,08	0,994 < 0,001	1,03	0,043 ^a -0,533 ^b	0,139 0,184	1,0 0,19
	CAR	1,21	0,017 ^a -0,473 ^b	0,081 0,08	1,0 < 0,001	1,68	-0,532 ^a -1,187 ^b	0,139 0,184	0,005 < 0,001
<i>A. sativum</i> (250 mg/kg, p.o.)	CYP3A1	0,70	0,121 ^a	0,08	0,654	0,58	0,483 ^a	0,091	< 0,001
	PXR	1,27	0,019 ^a -0,573 ^b	0,08 0,079	1,0 < 0,001	0,59	0,476 ^a -0,015 ^b	0,091 0,106	< 0,001 0,989
	CAR	1,17	0,562 ^a -0,466 ^b	0,08 0,079	0,981 < 0,001	1,19	-0,045 ^a -0,614 ^b	0,091 0,106	0,996 < 0,001
<i>P. ginseng</i> (30 mg/kg, p.o.)	CYP3A1	0,52	0,307 ^a	0,0834	0,007	0,70	0,363 ^a	0,101	0,008
	PXR	1,19	0,101 ^a -0,677 ^b	0,0834 0,086	0,829 < 0,001	1,33	-0,251 ^a -0,622 ^b	0,101 0,122	0,145 < 0,001
	CAR	1,23	-0,009 ^a -0,717 ^b	0,0834 0,0856	1,0 < 0,001	1,88	-0,731 ^a -1,18 ^b	0,101 0,122	< 0,001 < 0,001
<i>G. biloba</i> (200 mg/kg, p.o.)	CYP3A1	1,26	-0,439 ^a	0,083	< 0,001	1,10	-0,347 ^a	0,096	0,999
	PXR	1,07	0,2239 ^a 0,192 ^b	0,083 0,084	0,093 0,072	0,97	0,1 ^a 0,127 ^b	0,096 0,115	0,902 0,515
	CAR	1,01	0,2139 ^a 0,252 ^b	0,083 0,084	0,122 0,014	0,88	0,268 ^a 0,218 ^b	0,096 0,115	0,074 0,158
<i>C. sinensis</i> (300 mg/kg, p.o.)	CYP3A1	0,86	-0,043 ^a	0,107	0,999	0,62	0,445 ^a	0,092	< 0,001
	PXR	1,19	0,1 ^a -0,327 ^b	0,107 0,124	0,940 0,035	0,90	0,168 ^a -0,284 ^b	0,092 0,107	0,447 0,034
	CAR	1,17	0,065 ^a -0,308 ^b	0,107 0,124	0,990 0,049	1,77	-0,617 ^a -1,148 ^b	0,092 0,107	< 0,001 < 0,001

^a Różnica średnich między grupą kontrolną a grupą badaną.^b Różnica średnich między grupą badaną dla CYP3A1 a grupą PXR i CAR. * $p < 0,05$ (test Tukeya).

Na podstawie prezentowanych wyników w Tabeli 24 wykazano istotne różnice po zastosowaniu substancji roślinnych pomiędzy rozpatrywanymi grupami, szczególnie względem CYP3A1 i CAR co wskazuje, iż wartości średnie odpowiednio zestawione dla poszczególnych badanych genów różnią się statystycznie istotnie. Powyższy fakt zaobserwowano szczególnie podczas dłuższego czasu trwania eksperymentu, gdzie zanotowano spadek poziomu ekspresji CYP3A1, natomiast wzrost poziomu transkryptu konstytutywnego receptora androstanu po zastosowaniu ekstraktów takich jak: *E. purpurea*, *H. perforatum*, *C. sinensis*, *G. max* oraz *P. ginseng*. W przypadku podawania ekstraktu *G. biloba* w dawce 200 mg/kg przez 3 dni wykazano istotną różnicę pomiędzy grupą kontrolną a grupą badaną dla CYP3A1, jak również pomiędzy grupami analizowanymi CYP3A1 i CAR. Efekt ten wynikał z nieznacznej zwiększenia ilości mRNA CYP3A1 po krótkim stosowaniu powyższej substancji, przy jednoczesnym braku znaczących zmian w poziomie ekspresji dla analizowanych receptorów jądrowych, co w pewnym stopniu sugeruje o adaptacji aktywności powyższej izoformy do prowadzonych warunków eksperymentalnych. W przypadku *A. sativum* istotne różnice zaobserwowano wobec niektórych analizowanych par średnich, przy czym uzyskany rezultat badań nie wykazywał związku pomiędzy poziomem ekspresji analizowanych genów w regulacji transkrypcji CYP3A1. Mimo powyższego stwierdzenia w oparciu o przedstawione wyniki analiz, podobny wniosek o pewnej zależności pomiędzy poziomem ekspresji CYP3A1 a analizowanym receptorem jądrowym CAR można przełożyć na rezultat uzyskany względem substancji wzorcowych, co świadczy w pewnym sensie o prawidłowym wysuniętym postulatcie odnośnie regulacji CYP3A1 poprzez CAR. W przypadku receptora pregnanu X natomiast nie obserwuje się związku pomiędzy poziomem ekspresji badanej izoformy a badanym czynnikiem PXR, uczestniczącego w molekularnym mechanizmie regulacji transkrypcji CYP3A1.

5. DYSKUSJA

5.1. Ocena metody badawczej zastosowanej do pomiaru poziomu ekspresji analizowanych genów w modelu *in vivo*

Technika real-time PCR jest jedną z najpopularniejszych metod analitycznych o niezwykłej czułości i dokładności stosowana do jednoczesnego namnażania i monitorowania ilości powstającego amplikonu. Analiza produktu w czasie rzeczywistym pozwala na wgląd w kinetykę reakcji PCR i oszacowanie początkowej ilości badanego DNA, co nie jest możliwe przy zastosowaniu konwencjonalnego PCR. Ponadto w metodzie tej istnieje możliwość określenia wpływu analizowanego czynnika, np. leku na zmianę syntezy białka i oszacowanie zmian dokonujących się na poziomie transkryptomu. W związku z powyższym, w niniejszej pracy doktorskiej dla określenia poziomu ekspresji badanych genów zastosowano właściwą metodę skriningową opierającą się na analizie rt-PCR, która pozwoliła na dokładne i szybkie oszacowanie wpływu podawanych substancji na poziom wybranych enzymów wątrobowych z nadrodziny cytochromu P450 oraz czynników transkrypcyjnych biorących udział w regulacji CYP3A1. Dokonano optymalizacji metody rt-PCR w celu uzyskania powtarzalności wyników dla prawidłowego określenia poziomu ekspresji analizowanych genów. Wyniki oznaczeń ilościowych mRNA w badanych próbach analizowano względem standardu wewnętrznego w odniesieniu do grupy kontrolnej, czyli próby niepoddanej procedurze doświadczalnej. Dla uzyskania precyzyjnych wartości pomiaru ilości mRNA w analizowanych próbach dokonano normalizacji ekspresji badanego genu, w stosunku do genu GAPDH o stabilnej ekspresji, w celu możliwości wykluczenia odstępstw pod względem ilości i jakości RNA pomiędzy różnymi próbkami. Dla uzyskania specyficznych produktów reakcji wyłącznie z cDNA użyto odpowiednie pary starterów specyficzne dla badanych genów, jak również zastosowano najwyższej jakości odczynniki, które zapewniały prawidłowość przebiegu reakcji. Do detekcji amplikonu wykorzystano w pracy fluorochrom SYBR Green I interkalujący w dwuniciowy DNA, a specyficzność stosowanej metody potwierdzono poprzez analizę krzywej topnienia produktu, przy założeniu, iż czułość oraz powtarzalność techniki z użyciem powyższego barwnika jest porównywalna do metody z sondami fluorescencyjnymi. Ponadto dla określenia ilościowej analizy ekspresji badanych genów wykorzystano aparat LightCycler® ze systemem kapilarowym, który charakteryzuje się większą czułością i dokładnością niż system płytkowy.

W oparciu o pewną konserwatywność i podobieństwo sekwencyjne oraz zdolność do metabolizowania podobnych substancji w odniesieniu do ludzkich enzymów, w niniejszej pracy doktorskiej wykorzystano model zwierzęcy, który pozwala na uzyskanie bardziej wiarygodnych danych eksperymentalnych niż w przypadku zastosowania modelu *in vitro*. Powyższe stwierdzenie wynika z faktu, iż badania *in vivo* z udziałem organizmów modelowych pozwalają nie tylko na dokonywanie różnorodnych manipulacji eksperymentalnych, badanie anatomicznych, fizjologicznych i molekularnych procesów, ale również umożliwiają przewidywanie efektu działania substancji egzogennych, m.in. leków w aspekcie funkcjonowania organizmu. W związku z tym, badania z wykorzystaniem zwierząt laboratoryjnych stanowią najbardziej zbliżony model eksperymentalny w odniesieniu do człowieka poprzez możliwość lepszego poznania biochemicznych i molekularnych mechanizmów działania, ponieważ badania *in vitro* nie zawsze odzwierciedlają stan *in vivo* i trudno jest wówczas ekstrapolować uzyskane wyniki do badań klinicznych w odniesieniu do funkcjonowania organizmu.

5.2. Określenie potencjalnych interakcji preparatów roślinnych z lekami syntetycznymi z wykorzystaniem substancji modelowych

Problem interakcji nabiera szczególnego znaczenia w dobie narastania popularności leku roślinnego i jego łącznego przyjmowania z lekami syntetycznymi, ze względu iż preparaty roślinne zawierają kompleks związków farmakologicznie aktywnych, które mogą modulować aktywność enzymów cytochromu P450, odpowiedzialnych głównie za metabolizm leków, będących ich substratami. Indukcja bądź inhibicja tych izoform CYP450 może mieć potencjalny wpływ na toksyczność i skuteczność stosowanych leków syntetycznych, a tym samym może powodować istotne klinicznie konsekwencje. W związku z czym, badania w tym zakresie są niezmiernie ważne, w celu zrozumienia molekularnych mechanizmów interakcji pomiędzy preparatami roślinnymi a lekami syntetycznymi.

W związku z powyższym celem niniejszej pracy doktorskiej była ocena zmian poziomu ekspresji genów CYP3A1 i CYP2D2 kodujących enzymy I fazy metabolizmu leków oraz czynników transkrypcyjnych PXR i CAR biorących udział w regulacji transkrypcji CYP3A1 pod wpływem standaryzowanych wyciągów z roślin leczniczych. Podjęto również próbę określenia molekularnych podstaw interakcji pomiędzy preparatami roślinnymi a lekami syntetycznymi metabolizowanymi przez ludzkie izoformy CYP3A4 i CYP2D6. Dla próby wyjaśnienia mechanizmu indukcji interakcji, oszacowano jednocześnie wpływ

wzorcowych syntetycznych substancji stanowiących odpowiednio induktory i inhibitory aktywności badanych genów (Tabela 25). W przypadku CYP3A1 zastosowano deksametazon w dawce 50mg/kg stanowiący marker indukcji aktywności tej izoformy. Na podstawie uzyskanych wyników zaobserwowano znamienne statystycznie wzrost poziomu ekspresji badanego genu w komórkach wątroby szczurów po 3 i 4 dniach podawania preparatu w porównaniu do grupy kontrolnej karmionej standardową dietą. Odwrotną zależność w ilości transkryptu po podaniu deksametazonu wykazano dla konstytutywnego receptora androstanu, gdzie zanotowano znamienne spadki ilości mRNA o około 30% zarówno po 3 jak i 10 dniach stosowania. W przypadku receptora pregnanu X po 3 dniach zaobserwowano brak wpływu na poziom transkryptu, natomiast po 4 dniach stosowania tego preparatu zauważono znamienne statystycznie obniżenie poziomu mRNA badanego genu o 20%. Podobny efekt indukcji CYP3A1 w odniesieniu do wyników uzyskanych w niniejszej pracy na szczurzych mikrosomach wątroby zaobserwowano w doświadczeniu przeprowadzonym przez *Halpert'a* [1988]. Powyższą zależność w przypadku zastosowania deksametazonu względem aktywności powyższego izoenzymu potwierdzono także w innych badaniach przeprowadzonych przez zespoły *Arlotto i wsp.* [1987] oraz *Ross i wsp.* [1993]. Podobny rezultat indukcji ekspresji CYP3A1 poprzez wyżej wymieniony glukokortykoid otrzymał również zespół *Schuetz EG i wsp.* [1984]. Pod względem analizy aktywacji PXR wykazano natomiast, że deksametazon może potencjalnie aktywować ten receptor umożliwiając heterodimeryzację z kwasem retinoidowym, a tym samym mieć istotny wpływ na poziom ekspresji ludzkiego CYP3A4, jak i szczurzego CYP3A1 [*Lehman i wsp.*, 1998; *Schuetz i wsp.*, 1984; *Barwick i wsp.*, 1996]. Ponadto wynik indukcji receptora pregnanu X i receptora kwasu α -retinoidowego przez deksametazon w kulturze ludzkich hepatocytów wykazano również w doświadczeniu przeprowadzonym przez zespół *Pascussi i wsp.* [2000a]. Podobny efekt po podaniu powyższego glukokortykoidu zaobserwowano również wobec konstytutywnego receptora androstanu, gdzie wykazano wzrost indukcji tego genu, zaangażowanego w regulację transkrypcji enzymów CYP450, takich jak: CYP3A4, CYP2B6 i CYP2C8 [*Pascussi i wsp.*, 2000c]. W innym doświadczeniu natomiast zaprezentowanym przez *Honkakoskiego i wsp.* [1998] wykazano brak wpływu deksametazonu na aktywność CAR, co mogło wynikać z zastosowanej niskiej dawki tego preparatu [*Honkakoski i wsp.*, 1998].

Na podstawie przedstawionych wyników odnośnie modulowania aktywności konstytutywnego receptora androstanu poprzez powyższy glukokortykoid zaprezentowano

niejednoznaczny wpływ deksametazonu w proces aktywacji CAR sugerując, iż regulacja aktywności tego receptora może przebiegać na różnych szlakach jego aktywacji, m.in. w sposób konstytutywny za pośrednictwem HNF4 α bez udziału ligandu, pośrednio poprzez receptor glukokortykoidowy lub jeszcze inny endogenny mechanizm regulacji. Podobny postulat o pośrednim mechanizmie regulacji aktywności PXR można wysunąć w oparciu o uzyskany wynik badań w pracy doktorskiej, oceniający poziom ekspresji tego receptora pod wpływem podawania syntetycznego induktora CYP3A1. Uzyskany rezultat powyższego badania może wynikać z zarówno z czasu i sposobu podawania analizowanego preparatu, jak również z zastosowanej jego dawki.

Warto podkreślić, iż w niniejszej pracy analizowano również wpływ syntetycznego inhibitora na poziom transkryptu CYP3A1. W tym celu zastosowano ketokonazol w dawce 10 mg/kg, który wywołał nieznaczne hamowanie ekspresji tego genu. Podobny rezultat badań uzyskano w przypadku PXR i CAR, przy czym po 10 dniach stosowania ketokonazolu w komórkach wątroby zanotowano wzrost poziomu mRNA receptora CAR o 62% w porównaniu do grupy kontrolnej. W oparciu o nieliczne dane literaturowe, znaczny spadek aktywności CYP3A w modelu *in vivo* z wykorzystaniem zwierząt modelowych (szczur) obserwowano po dożylnym podaniu ketokonazolu w dawce 10-20 mg/kg [Kageyama i wsp., 2005]. Podobny efekt inhibicji w odniesieniu do ludzkiej izoformy CYP3A4 wykazano po zastosowaniu powyższego preparatu w doświadczeniach przeprowadzonych przez zespoły badawcze Baldwin i wsp. [1995] oraz Bourrié i wsp. [1996], gdzie określono ketokonazol jako silny i selektywny inhibitor enzymu CYP3A4. W badaniu wykonanym przez zespół Duret i wsp. [2006] analizowano natomiast w komórkach HeLa i HepG2 oraz w pierwotnej hodowli ludzkich hepatocytów wpływ tego preparatu na aktywność transkrypcyjną ludzkiego receptora glukokortykoidowego (hGR), uczestniczącego w regulacji ekspresji CAR i PXR. Na podstawie uzyskanych wyników wykazano hamowanie aktywności GR poprzez ketokonazol i konkurowanie z deksametazonem o miejsce wiązania z hGR. Ponadto, w prezentowanym doświadczeniu z wykorzystaniem pierwotnej hodowli ludzkich hepatocytów zaobserwowano również hamowanie ekspresji genów CAR i PXR biorących udział w regulacji ekspresji genów odpowiedzialnych za metabolizm leków, m.in. CYP2B6, CYP2C9 i CYP3A4 oraz ich transport [Duret i wsp., 2006]. W związku z powyższymi wynikami, prezentowanymi w badaniach nad wpływem ketokonazolu na aktywność szczurzego CYP3A1 i ludzkiego CYP3A4 wykazano, że preparat ten stanowi potencjalny inhibitor enzymów CYP3A. Niejednoznaczny efekt modulacji aktywności ekspresji

analizowanych genów poprzez substancje syntetyczne przedstawiono wobec CAR i PXR, tłumacząc iż uzyskany rezultat badań w pracy doktorskiej względem analizowanych receptorów może wynikać zarówno z czasu i sposobu podawania preparatu, jak również z zastosowanego dawkowania. Należy podkreślić, iż w przypadku modulacji PXR po zastosowaniu syntetycznego induktora bądź inhibitora aktywności CYP3A1 można wnioskować o pośrednim mechanizmie regulacji tego czynnika transkrypcyjnego poprzez GR lub HNF4 α odpowiedzialnego za konstytutywną jego ekspresję. W odniesieniu do aktywności CAR uczestniczącego w regulacji CYP3A można w oparciu o uzyskane wyniki w przedstawionej pracy postulować o mechanizmie jego działania na zasadzie antagonizmu kompetytywnego. Należy zaznaczyć, iż ketokonazol użyty w doświadczeniu wykazuje właściwości antagonisty kompetytywnego, a jego wpływ na aktywność genów docelowych uzależniony jest od dawki i czasu jego stosowania. Dotychczas przeprowadzono niewiele badań nad potencjalnym wpływem deksametazanu i ketokonazolu na aktywność CAR oraz PXR, dlatego wymagane są dalsze eksperymenty z tego zakresu, w celu pełnego poznania mechanizmu regulacji wspomnianych receptorów.

Tabela 25. Wpływ wzorcowych syntetycznych substancji podawanych dootrzewnowo (i.p.) na poziom ekspresji badanych genów w zależności od czasu, (n = 10)

GEN	SUBSTANCJA SYNTETYCZNA	DAWKA	CZAS PODAWANIA	ŚREDNIA \pm SEM (grupa badana)	P*
CYP2D2	Izoniazyd	150mg/kg	3 dni	102,4 \pm 3,12	0,005
			10 dni	139,47 \pm 9,49	0,017
CYP3A1	Deksametazon	50 mg/kg	3dni	544,36 \pm 34,07	< 0,001
			4 dni	397,64 \pm 46,78	< 0,001
PXR	Deksametazon	50 mg/kg	3 dni	114,02 \pm 5,5	0,033
			4 dni	80,5 \pm 4,26	< 0,001
CAR	Deksametazon	50 mg/kg	3 dni	67,47 \pm 4,91	0,16
			4 dni	72,36 \pm 2,63	< 0,001
CYP2D2	Chinina	20 mg/kg	3 dni	93,32 \pm 4,91	0,636
			10 dni	75,3 \pm 6,88	0,012
CYP3A1	Ketokonazol	10 mg/kg	3 dni	92,92 \pm 4,07	0,3
			10 dni	81,97 \pm 5,56	0,013
PXR	Ketokonazol	10 mg/kg	3 dni	107,36 \pm 4,31	0,879
			10 dni	105,52 \pm 6,7	0,686
CAR	Ketokonazol	10 mg/kg	3 dni	104,9 \pm 6,37	0,72
			10 dni	161,97 \pm 17,71	0,044

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

Grupa kontrolna karmiona standardową dietą została określona jako 100%.

Zwraca się uwagę, iż dotychczas nie poznano potencjalnych ludzkich induktorów CYP2D6, a tym samym szczurzych CYP2D2, mimo to w prezentowanej pracy doktorskiej wykazano, iż izoniazyd (150 mg/kg), stanowiący induktor aktywności CYP2E1, powodował

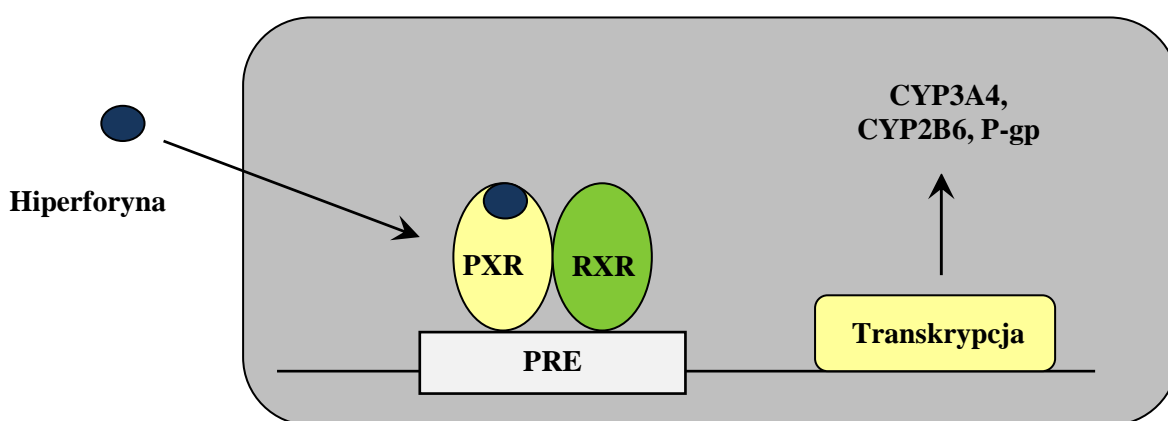
po 10 dniach podawania wzrost poziomu ekspresji genu CYP2D2 około 40%. W analizie wpływu syntetycznego inhibitora CYP2D2 na ilość transkrypty zastosowano natomiast chininę (20 mg/kg), która powodowała znamiennej statystycznie efekt redukcji ekspresji badanego genu o blisko 25% po wydłużeniu eksperymentu do 10 dni. Podobny rezultat dotyczący hamowania aktywności CYP2D2 przez chininę wykazano w badaniu przeprowadzonym przez zespół *Kobayashi i wsp.* [1989]. W związku z powyższym, w oparciu o uzyskane wyniki można wnioskować o prawidłowych założeniach doświadczenia pod względem wpływu substancji wzorcowych na modulację ekspresji analizowanych izoform CYP450.

5.2.1. Interakcje *Hypericum perforatum* z lekami syntetycznymi

H. perforatum jest jednym z najbardziej powszechnie stosowanych surowców zielarskich w tradycyjnej fitoterapii. Preparaty na bazie dziurawca zwyczajnego zawierają związki biologicznie czynne, m.in. hiperycynę, hiperforynę oraz amentoflawon i stosowane są głównie jako środek antydepresyjny. Liczne badania farmakologiczne potwierdzają, że związki aktywne ziela *H. perforatum* wywierają głównie wpływ na komórki nerwowe, receptory pre- i postsynaptyczne, jak również na enzymy biorące udział w metabolizmie neurotransmiterów poprzez hamowanie głównie aktywności enzymów monoaminooksydaz (MAO) [*Bladt i Wagner*, 1993]. W odniesieniu do przeprowadzonych badań stwierdza się również, że właściwości farmakologiczne ekstraktów *H. perforatum* mają istotny wpływ na receptory OUN, m.in.: serotoninowe, dopaminowe, opatowe oraz adrenergiczne, co może w pewien sposób wyjaśniać ich działanie neuroprotektoryjne [*Butterweck i wsp.*, 2002a,b]. Hiperforyna oraz w mniejszym stopniu hiperycyna mogą hamować wychwyty zwrotne neurotransmiterów, jak serotoniny i noradrenaliny oraz GABA i L-glutaminianu [*Müller i wsp.*, 2001; *Butterweck i wsp.*, 2002a,b]. W związku z tym, stosowanie *H. perforatum* w terapii skojarzonej z syntetycznymi inhibitorami wychwyty serotoniny, m.in. paroksetyny, sertraliny, wenlafaksyny prowadzi do wzajemnej interakcji tych środków w fazie farmakodynamicznej ze względu na ich synergizm działania. Ponadto preparaty z dziurawca zwyczajnego wykazują działanie również poza OUN na aktywność zarówno spazmolityczną jak i żółciopędą [*Jakovljevic i wsp.*, 2000; *Gilani i wsp.*, 2005].

Z przeglądu bibliograficznego wynika, że dziurawiec zwyczajny jest najbardziej przebadanym surowcem roślinnym pod względem interakcji. W badaniach *in vitro* wykazano,

że hiperycyna indukuje ekspresję CYP1A2, natomiast hiperforyna CYP3A4. Stwierdzono również, że dziurawiec może indukować aktywność CYP2C9 [Bachmann i wsp., 2004; Mrozikiewicz, 2001]. W związku z tym, spośród opisanych relacji lek syntetyczny - preparat roślinny szczególne znaczenie ma sugerowany w badaniach związek właściwości substancji aktywnych wyciągów z dziurawca zwyczajnego (*H. perforatum*) z lekami metabolizowanymi przez ludzki CYP3A4. Do interakcji dochodzi na etapie indukcji utleniania inhibitora proteazy HIV indinawiru, immunosupresanta cyklosporyny oraz doustnych środków antykoncepcyjnych [Breidenbach i wsp., 2000; Bon i wsp., 1999]. Konsekwencją tego działania jest obniżenie stężenia leku syntetycznego w osoczu, jak również jego biologicznego czasu półtrwania, co może prowadzić do osłabienia efektu terapeutycznego stosowanych leków. Na podstawie przeprowadzonych niewielu badań, odnośnie wpływu *H. perforatum* na aktywność receptora pregnanu X, wykazano oddziaływanie jego związków czynnych na aktywność PXR regulującego transkrypcję genu CYP3A4. Istotna jest sugestia iż, hiperforyna stanowiąca ligand tego receptora indukuje transkrypcję powyższej izoformy, prowadząc do wzrostu ekspresji białka enzymatycznego, co wiąże się z przyspieszonym metabolizmem leków, będących substratami enzymu CYP3A4 (Rycina 43) [Moore i wsp., 2000b; Wentworth, 2000]. Wykazano ponadto, że *H. perforatum* wpływa również na proces indukcji ekspresji genu oporności wielolekowej MDR1, kodującego glikoproteinę P przez co może modulować jelitowy i mózgowy transport leków.



Rycina 43. Indukcja CYP3A4 i CYP2B6 przez hiperforynę (St. John's wort) przy udziale PXR.

Związanie hiperforyny z PXR prowadzi do utworzenia kompleksu, który wiąże się z sekwencją odpowiedzi na pregnan (PRE), prowadząc do ekspresji CYP3A4, CYP2B6 i glikoproteiny P (P-gp) [Ekins i Erickson, 2002; Xie i Evans, 2001].

W oparciu o wyniki badań klinicznych stwierdza się, iż interakcje zachodzące pomiędzy preparatami dziurawca oraz lekami syntetycznymi mogą mieć istotny wpływ na

profil bezpieczeństwa przyjmowanych leków oraz ich efekt terapeutyczny [Ożarowski i Mrozikiewicz, 2004]. Wynika to z faktu, iż przetwory z dziurawca zwyczajnego mogą wchodzić w interakcje m.in. z lekami antydepresyjnymi, przeciwpadaczkowymi, jak również z cytostatykami obniżając skuteczność stosowanej terapii. Regularne przyjmowanie dziurawca zmniejsza również biodostępność werapamilu ze względu na wzrost aktywności enzymu CYP3A4 w jelicie, powodując zwiększony efekt pierwszego przejścia tego leku [Tannergreen i wsp., 2004]. Ponadto stosowanie antykoagulantów, m.in. warfaryny oraz fenpropukomonu ze składnikami dziurawca prowadzi do interakcji w wyniku aktywacji układów enzymatycznych cytochromu P450 zmniejszając działanie przeciwzkrzepowe tych leków [Jiang i wsp., 2004].

W związku z tym, iż dziurawiec zwyczajny może oddziaływać na aktywność enzymów CYP450, w niniejszej pracy analizowano wpływ ekstraktu *H. perforatum* na poziom ekspresji izoform CYP2D2 i CYP3A1, uczestniczących głównie w metabolizmie przyjmowanych leków (Tabela 26). Wykazano, że stosowanie tego preparatu w dawce 300 mg/kg p.o. przez okres 3 dni nie wpłynęło znacząco na ilość transkryptu badanego genu, przy czym dłuższe jego podawanie obniżyło poziom ekspresji CYP3A1 o wartość 26% ($p < 0,05$). Ponadto zaobserwowano brak zmian w ilości transkryptu CYP2D2 w komórkach wątroby zwierząt, ponieważ w obu przypadkach przy istotności $p < 0,05$ różnica w ilości cDNA badanego genu pomiędzy grupami otrzymującymi wyciąg i grupą kontrolną wyniosła około 10%.

Tabela 26. Wpływ ekstraktu *H. perforatum* (300 mg/kg, p.o.) na poziom ekspresji badanych genów w zależności od czasu podawania, (n = 10)

GEN	CZAS PODAWANIA	ŚREDNIA ± SEM (grupa badana)	P*
CYP2D2	3 dni	89,48 ± 2,76	0,117
	10 dni	91,16 ± 5,68	0,038
CYP3A1	3 dni	95,90 ± 7,33	0,123
	10 dni	73,66 ± 10,51	0,009
PXR	3 dni	121,65 ± 5,85	0,395
	10 dni	113,94 ± 5,28	0,452
CAR	3 dni	111,4 ± 12,12	0,449
	10 dni	173,25 ± 20,81	0,015

*Wartość $p < 0,05$ przyjęto za statystycznie istotną (jednoczynnikowa ANOVA). Grupa kontrolna karmiona standardową dietą została określona jako 100%.

W odniesieniu do danych literaturowych, w doświadczeniu na szczurach przeprowadzonym przez Nöldera i Chatterje [2001] wykazano brak zmian w aktywności katalitycznej enzymów CYP po podaniu 300 mg/kg ekstraktu z ziela dziurawca przez 10 dni.

W innym badaniu na zwierzętach zanotowano natomiast po podaniu ekstraktu w dawce 1000 mg/kg przez 14 dni wzrost ekspresji wątrobowego CYP3A1/2 [Durr i wsp., 2000]. Na tej podstawie stwierdzono istotną zależność pomiędzy dawką i czasem stosowania ekstraktu z ziela *H. perforatum* a efektem indukowania izoenzymów CYP450 [Cantoni i wsp., 2003].

W badaniu przeprowadzonym przez zespół Dostalek i wsp. [2005] zaobserwowano możliwość zachodzenia interakcji pomiędzy ekstraktem *H. perforatum* a lekami syntetycznymi poprzez zastosowanie odpowiednich substratów będących markerami aktywności CYP2D2 (dekstrometorfan) i CYP3A2 (midazolam). Na podstawie wyników pomiarów farmakokinetycznych leków wykazano, że ekstrakt ten powoduje wzrost aktywności CYP2D2 oraz CYP3A2 w wątrobie szczura w porównaniu z grupą kontrolną. Obach [2000] w modelu *in vitro* zaobserwował natomiast, że surowy ekstrakt St. John's wort powodował inhibicje izoenzymów: CYP2D6, CYP2C9, CYP3A4, CYP1A2 oraz CYP2C19. W oparciu o uzyskane wyniki, autor tego doświadczenia zwrócił szczególną uwagę na zawarty w ekstrakcie związek flawonoidowy I3 i I18-biapigeninę, które były uznawane za silne kompetytywne inhibitory CYP3A4 ($K_i = 0,038 \mu\text{M}$), CYP2C9 ($K_i = 0,32 \mu\text{M}$) i CYP1A2 ($K_i = 0,95 \mu\text{M}$). Efekt hamowania zaobserwowano także w przypadku hiperforyny jako niekompetytywnego inhibitora aktywności CYP2D6 ($K_i = 1,5 \mu\text{M}$) i kompetytywnego inhibitora CYP2C9 ($K_i = 1,8 \mu\text{M}$) oraz CYP3A4 ($K_i = 0,48 \mu\text{M}$), natomiast hiperycyna wykazała silną inhibicję aktywności wielu enzymów CYP (Tabela 27).

Podobny efekt hamowania aktywności CYP450 w badaniu *in vitro* uzyskał zespół Budzinski i wsp. [2000], który wskazał udział hiperforyny, stanowiącej silny niekompetytywny inhibitor CYP2D6 i kompetytywny inhibitor CYP3A4 i CYP2C9. W związku z tym, wyniki otrzymane w modelu *in vitro* w przypadku stosowania St. John's wort i jego związków będących inhibitorami enzymów metabolizujących leki trudno jest przenieść do modelu *in vivo*, ze względu na niejednoznaczne wyniki doświadczeń, które mogą wynikać z profilu ekstraktu, dawki i czasu jego stosowania. Zależność tą potwierdzają rezultaty badań zespołu Wang i wsp. [2001], który zaobserwował, że krótkoterminowe przyjmowanie ekstraktu St. John's wort (3x300mg) nie wywoływało zmian w aktywności enzymów CYP, natomiast dłuższe jego stosowanie (3x300mg, 14 dni) powodowało znaczny wzrost klirensu midazolamu, co świadczyło o indukcji CYP3A. Podobny efekt zaprezentowano w badaniu Komoroski i wsp. [2004] w kulturze ludzkich hepatocytów, które miały na celu określenie działania hiperforyny i hiperycyny na aktywność enzymów rodziny cytochromów P450. Pomiar funkcjonowania izoenzymów odpowiedzialnych za biotransformacje leków dokonano poprzez pomiar

metabolizowania substratu, określenie poziomu białka techniką Western blot oraz oszacowanie ilości transkryptu mRNA analizowanych genów. W tym celu dla wyjaśnienia potencjalnego wpływu związków biologicznie czynnych *H. perforatum* na aktywność CYP450 zastosowano odpowiednie substraty: testosteron dla CYP3A4, dekstrometorfan dla CYP2D6, flurbiprofen dla CYP2C9 i rezorufinę dla CYP1A2. W oparciu o uzyskane wyniki wykazano zwiększanie aktywności CYP3A4 oraz CYP2C9 w zależności od stosowanej dawki hiperforyny i hiperycyny. Zaobserwowano także znaczne zwiększenie ekspresji mRNA dla badanych enzymów po podaniu hiperforyny przy niewielkim obniżeniu ilości transkryptu CYP1A2 i CYP2C9. W przypadku analizy Western blot wykazano wzrost immunoreaktywności izoform CYP3A4 i CYP2C9 po zastosowaniu hiperforyny, przy czym tego efektu nie zaobserwowano dla analizowanych enzymów po podaniu hiperycyny.

Tabela 27. Stałe inhibicji dla składników St. John's wort na aktywność ludzkiego cytochromu P450 [Obach, 2000]

SKŁADNIKI ST. JOHN'S WORT	ENZYMY CYP	K _i ^a (μM)	TYP INHIBICJI
Hiperforyna	CYP2C9	1,8 ± 0,9	Kompetytywny
	CYP2D6	1,5 ± 0,9	Niekompetytywny
	CYP3A4	0,49 ± 0,24	Kompetytywny
I3,II8-Biapigenina	CYP1A2	0,95 ± 0,22	Kompetytywny
	CYP2C9	0,32 ± 0,14	Kompetytywny
	CYP2D6	2,3 ± 1,8	Kompetytywny
	CYP3A4	0,038 ± 0,006	Kompetytywny
Hiperycyna	CYP2C9	1,4 ± 1,1	Kompetytywny
	CYP2D6	2,6 ± 0,9	Kompetytywny
	CYP3A4	4,2 ± 2,2	Kompetytywny
Kwercetyna	CYP1A2	3,3 ± 0,6	Niekompetytywny

^a Wartości wyrażono jako średnia ± S.D.

W innym doświadczeniu wykonanym przez zespół *Johne i wsp.* [2002] dokonano analizy odnośnie udziału polimorfizmu CYP2D6, 2D9 oraz 2C19 w przebiegu interakcji pomiędzy ekstraktem *H. perforatum* a amitryptyliną ze względu, iż lek ten metabolizowany jest przy niskich stężeniach do nortryptyliny z udziałem CYP2C19, natomiast przy większych stężeniach przez CYP3A4 oraz CYP2D6. W eksperymencie tym, zaobserwowano wzrost aktywności CYP3A4 i CYP2D6 po zastosowaniu ekstraktu z dziurawca zwyczajnego oraz zależność pomiędzy wpływem tego preparatu na parametry kinetyczne amitryptyliny i jej

metabolitów a fenotypami UM i PM. W badaniu klinicznym typu otwartego przeprowadzonym przez zespół *Burstein i wsp.* [2000] u zdrowych ochotników w przedziale wiekowym od 24 do 43 lat wykazano brak znaczących różnic w metabolizmie karbamazepiny zarówno przed i po podawaniu ekstraktu z ziela *H. perforatum* (HPE). Uzyskany rezultat tłumaczono, że biotransformacja tego leku podawanego równocześnie z HPE zależy od czasu trwania terapii. Ponadto z wcześniejszych doświadczeń zaobserwowano, że dłuższe niż 14-dniowe stosowanie ekstraktu powoduje istotne zmiany w parametrach farmakokinetycznych karbamazepiny. W innym badaniu klinicznym przeprowadzonym przez zespół *Markowitz i wsp.* [2003a] na 12 zdrowych ochotników wykazano dwukrotne zwiększenie klirensu dla alprazolamu po zastosowaniu ekstraktu z ziela *H. perforatum* jako efekt wzrostu aktywności izoenzymu CYP3A4. W związku z tym, na podstawie uzyskanych wyników z powyższego doświadczenia postuluje się, że długotrwałe przyjmowanie ekstraktu z dziurawca może powodować zmniejszenie skuteczności terapeutycznej alprazolamu, będącego substratem enzymu CYP3A4. Podobne rezultaty odnośnie indukcji aktywności CYP3A4 w badaniu klinicznym uzyskał zespół *Eich-Höchli i wsp.* [2003], gdzie zaobserwowano możliwość wystąpienia interakcji farmakokinetycznej pomiędzy ekstraktem z ziela *H. perforatum* a metadonem. W doświadczeniu tym, na podstawie parametrów farmakokinetycznych wykazano, że stosowanie ekstraktu znacząco redukowało współczynnik zależności stężenia od dawki metadonu i powodowało obniżenie stężenia leku w osoczu, prowadząc do zmniejszenia jego efektu terapeutycznego. Wybrane wyniki badań odnośnie wpływu ekstraktu *H. perforatum* na aktywność enzymu CYP3A4 uczestniczącego w metabolizmie większości leków stosowanych klinicznie zaprezentowano w Tabeli 28.

W badaniu klinicznym przeprowadzonym przez zespół *Wang i wsp.* [2001] na 12 zdrowych ochotnikach, którym podawano koktajl złożony z pojedynczych dawek midazolamu (substrat dla CYP3A4), dekstrometorfanu (substrat dla CYP2D6), kofeiny (substrat dla CYP1A2) oraz tolbutamidu (substrat dla CYP2C9) zaobserwowano, że efekt interakcji z midazolem był zależny od czasu trwania terapii w połączeniu z ekstraktem dziurawca zwyczajnego. Na podstawie uzyskanych wyników wykazano, że przyjmowanie ekstraktu z ziela *H. perforatum* przez okres 14 dni w dawce 300 mg 3dziennie zmniejszało biodostępność midazolamu przy 2-krotnym zwiększeniu klirensu, co świadczyło o indukcji CYP3A4 w ścianie jelita, natomiast pojedyncza dawka 900 mg ekstraktu nie wywoływała znaczących zmian w parametrach farmakokinetycznych stosowanego leku. W przypadku dekstrometorfanu zaobserwowano brak istotnych różnic w metabolizmie tego leku po

zastosowaniu ekstraktu i zmian w aktywności CYP2D6 [Wang i wsp., 2001; Markowitz i wsp., 2000].

Tabela 28. Wpływ *H. perforatum* na aktywność izoformy CYP3A4 w badaniach klinicznych

WPLYW NA AKTYWNOŚĆ CYP3A4	DAWKA I CZAS STOSOWANIA EKSTRAKTU <i>H. PERFORATUM</i>	SUBSTRAT	PIŚMIENICTWO
Indukcja	900 mg/ 28dni	Cyklosporyna A	Mai i wsp., 2004
Indukcja	900 mg/14 dni	Simwastatyna	Sugimoto i wsp., 2001
Indukcja	900 mg/31 dni	Metadon	Eich-Höchli i wsp., 2003
Indukcja	900 mg/14 dni	Takrolimus	Hebert i wsp., 2004
Indukcja	900 mg/14 dni	Karbamazepina	Burstein i wsp., 2000
Indukcja	600 mg/14 dni	Takrolimus	Mai i wsp., 2003
Indukcja	900 mg/12 dni	Midazolam	Dresser i wsp., 2003
Niewielka indukcja	120 mg/11 dni	Alprazolam (w „koktajlu”)	Arold i wsp., 2005
Indukcja	900 mg/14 dni	Alprazolam	Markowitz i wsp., 2003a
Indukcja	900 mg/28 dni	Midazolam (w „koktajlu”)	Gurley i wsp., 2002
Indukcja	900 mg/14 dni	Midazolam	Wang i wsp., 2001
Brak wpływu	900 mg/1 dzień		

Podobną zależność do zespołu Wang i wsp. [2001] odnośnie indukcji CYP3A4 pod wpływem stosowania ekstraktu z ziela *H. perforatum* wykazała grupa badawcza Gurley'a i wsp. [2005a]. Eksperymentem objęto 6 mężczyzn i 6 kobiet, w którym zaobserwowano, że długoterminowe stosowanie ekstraktu dziurawca o zawartości 0,3% hiperycyn w dawce 300 mg 3xdziennie przez okres 28 dni łącznie z midazolamem powodowało znaczną indukcję CYP3A4, jak również wzrost aktywności CYP2E1 w przypadku przyjmowania chloroksazonu wraz z *H. perforatum*. Ponadto nie zaobserwowano istotnie statystycznych zmian w metabolizmie kofeiny po 28 dniowej terapii ekstraktem, co świadczyło o braku zmian w aktywności CYP1A2 oraz po podaniu debryzochiny, substratu dla CYP2D6 [Gurley i wsp., 2005a]. Podobną zależność w przypadku izoenzymu CYP2D6 zanotował zespół Gurley i wsp. [2002], który po zastosowaniu ekstraktu

z ziela dziurawca (St. John's wort) w dawce 300 mg, 3dziennie przez 28 dni wykazał brak zmian w aktywności CYP2E1 i CYP2D6.

W badaniu klinicznym przeprowadzonym przez *Sugimoto i wsp.* [2001] na 16 zdrowych ochotnikach płci męskiej wykazano, że stosowanie przez 14 dni ekstraktu *H. perforatum* w dawce 300 mg 3dziennie oraz 14. dnia pojedynczą dawkę 10 mg simwastatyny powoduje obniżenie stężenia tego leku w osoczu, natomiast podanie 20 mg prawastatyny zamiast simwastatyny nie wywołuje znaczących zmian w metabolizmie prawastatyny. W związku z tym, autorzy eksperymentu wnioskuje o możliwej interakcji pomiędzy ekstraktem dziurawca zwyczajnego a lowastatyną oraz atorwastatyną, który może obniżać efekt terapeutyczny statyn ze względu na indukcję aktywności CYP3A4. W przypadku badania klinicznego zespołu *Arold i wsp.* [2005] przeprowadzonego na 56 ochotnikach zaobserwowano nieznaczną indukcją CYP1A2, CYP2C9, CYP3A4 oraz P-gp po 10 dniowym stosowaniu ekstraktu *H. perforatum* w dawce 240 mg dziennie. W przeciwieństwie do wcześniejszego badania wykazano natomiast zupełnie inne wyniki w indukowaniu tych enzymów ze względu na stosowanie większej dawki (900 mg dziennie) ekstraktu dziurawca zwyczajnego przez dłuższy okres czasu (Tabela 29).

Tabela 29. Wpływ ekstraktów *Hypericum perforatum* na aktywność izoform cytochromu P450 w badaniach klinicznych

IZOFORMA	EFEKT	DAWKA I CZAS STOSOWANIA EKSTRAKTU <i>H. PERFORATUM</i>	SUBSTRAT	PIŚMIENNICTWO
CYP3A4 CYP2D6	Indukcja	900 mg/14 dni	Amitryptylina	Johne i wsp., 2002
CYP1A2	Niewielka indukcja	900 mg/ 15 dni	Teofilina	Morimoto i wsp., 2004
CYP2E1	Indukcja	900 mg/28 dni	Chlorzoksazon (w „koktajlu”)	Gurley i wsp., 2005a
CYP1A2	Brak wpływu	900 mg/14 dni	Kofeina (w „koktajlu”)	Arold, 2005
CYP1A2	Brak wpływu	900 mg/28 dni	Kofeina (w „koktajlu”)	Gurley i wsp., 2005a

Na podstawie powyższych prezentowanych prac badawczych można wywnioskować pewną zależność pomiędzy wielkością dawki i czasu stosowania ekstraktu *H. perforatum* a ryzykiem wystąpienia interakcji. Przedstawione dane postulują, że ekstrakt z dziurawca

stosowany w małych dawkach i krótkotrwale wywołuje nieznaczne indukcje izoenzymów CYP3A4, CYP1A2 oraz CYP2C9, a tym samym może powodować niewielkie zmiany w parametrach farmakokinetycznych leków będących substratami tych izoform. W tym celu, aby zminimalizować ryzyko wystąpienia działań niepożądanych i zwiększenia bezpieczeństwa w przypadku stosowania terapii kojarzonej, należy brać pod uwagę możliwość wystąpienia interakcji pomiędzy preparatami na bazie dziurawca a lekami syntetycznymi z uwzględnieniem indywidualnej zmienności.

W niniejszej pracy analizowano także wpływ standaryzowanego ekstraktu *H. perforatum* na aktywność czynników transkrypcyjnych biorących udział w regulacji izoenzymu CYP3A4. W oparciu o uzyskane wyniki stosowania wyciągu dziurawca zwyczajnego w dawce 300 mg/kg podawanego dozoładowo po 3 i 10 dniach eksperymentu zaobserwowano nieznaczne podwyższenie ilości transkryptu PXR odpowiednio o 22% i 14% względem grupy kontrolnej, przy czym wyniki te nie wykazywały znamienności statystycznej (Tabela 26). W przypadku konstytutywnego receptora androstanu nie zaobserwowano po 3 dniach stosowania wyciągu wpływu na zmianę poziomu oznaczanego w reakcji ilości transkryptu badanego genu, natomiast dłuższe podawanie dziurawca zwyczajnego prowadziło do wzrostu poziomu ekspresji czynnika CAR o 73% ($p < 0,05$). W tym aspekcie, porównując uzyskane wyniki doświadczenia z dostępnymi danymi literaturowymi wykazano, że ekstrakt z ziela *H. perforatum* stanowi skuteczny aktywator PXR a jego aktywacja indukuje wątrobowy metabolizm leków poprzez regulację ekspresji, m.in. genu CYP3A4, prowadząc do przyspieszonej biotransformacji leków będących substratami tego enzymu [Moore i wsp., 2000b; Wentworth i wsp., 2000]. Podobną sugestię odnośnie wpływu dziurawca oraz jego aktywnych składników na indukcję konstytutywnego receptora androstanu postulował w jednym swym badaniu zespół Wentworth i wsp. [2000]. W przeprowadzonym eksperymencie nad działaniem *H. perforatum* na aktywność PXR zaobserwowano, że hiperforyna może stanowić potencjalny ligand dla tego receptora, mimo iż strukturalnie różni się od ryfampicyny, będącej markerem indukcji CYP3A4. Ten wysunięty postulat można wyjaśnić na podstawie wcześniejszych obserwacji, w których wykazano, że PXR może oddziaływać z dużą liczbą różniącymi się strukturalnie steroidami i ksenobiotykami, sugerując posiadanie przez ten receptor dużej i zmiennej strukturalnie kieszeni wiążącej ligand [Blumberg i wsp., 1998; Lehmann i wsp., 1998; Bertilson i wsp., 1998]. Jednakże należy podkreślić, iż dotychczas przeprowadzono niewiele badań, które nie pozwalają jednoznacznie stwierdzić wpływ ekstraktu *H. perforatum* i jego aktywnych związków na

aktywność czynników transkrypcyjnych uczestniczących w regulacji ekspresji CYP3A4, zaangażowanego w metabolizm większości leków stosowanych klinicznie. W tym aspekcie wymagane są dalsze badania z tego zakresu, które pozwolą zminimalizować ryzyko wystąpienia potencjalnych interakcji.

5.2.2. Interakcje *Echinacea purpurea* z lekami syntetycznymi

Preparaty na bazie jeżówki purpurowej (*E. purpurea*) należą do najczęściej stosowanych w fitoterapii w przypadku chorób infekcyjnych. Wykazują one działanie immunomodulujące poprzez wpływ obecnego kwasu kawowego na wzrost produkcji czynnika martwicy nowotworów α , interferonu β_2 oraz interleukiny-1. Zaobserwowano również, że zawarte w surowcu leczniczym polisacharydy mogą stymulować makrofagi i hamować aktywność hialuronidazy zmniejszając procesy zapalne. Przetwory z jeżówek znajdują głównie zastosowanie we współczesnej medycynie w leczeniu pierwszych objawów infekcji górnych dróg oddechowych [Freeman i Spelman, 2008]. Są na ogół dobrze tolerowane przez organizm, jednak zwraca się szczególną uwagę na możliwość zachodzenia interakcji pomiędzy lekami syntetycznymi a preparatami roślinnymi zawierające związki biologicznie aktywne [Budzinski i wsp., 2000]. Istnieją doniesienia dotyczące wystąpienia reakcji alergicznych, jak również dolegliwości żołądkowo-jelitowych i zaburzeń ze strony układu nerwowego u niektórych osób stosujących preparaty z jeżówek.

E. purpurea może wchodzić interakcje z lekami immunostymulującymi lub immunosupresyjnymi ze względu na niespecyficzne działanie pobudzające układ odpornościowy [Miller, 1998]. Wykazano, że preparaty na bazie tej rośliny leczniczej nie powinny być przyjmowane z lekami stosowanymi w immunosupresji, m.in. cyklosporyną i glukokortykosteroidami [Miller, 1998]. Istotny jest również fakt, iż w przypadku długotrwałego stosowania preparatów z *E. purpurea* można wywołać efekt odwrotny do stymulacji, czyli immunosupresję układu odpornościowego. Ponadto, badania *in vitro* wykazały, że aktywne składniki jeżówki mogą zmieniać metabolizm i efektywność leków szczególnie będących substratami dla izoenzymu CYP3A4 [Budzinski, 2000]. Dowodem są badania Gorski i wsp. [2004] potwierdzające indukcję aktywności CYP3A4 poprzez zwiększony klirens osoczowy midazolamu, przy jednoczesnym spadku aktywności izoform CYP1A2, CYP2C9 oraz CYP3A po zastosowaniu suplementacji *E. purpurea*. Wykazano również, że długoterminowe przyjmowanie preparatów z jeżówek wywołuje działanie

hepatotoksyczne, w związku z tym nie powinny być stosowane z lekami, które potencjalnie uszkadzają wątrobę, m.in. ketokonazolem, amiodaronem, metotreksatem, steroidami anabolicznymi i paracetamolem [Mullins, 2002].

Z przeglądu literaturowego wynika, iż badań dotyczących wpływu preparatów *Echinacea spp.* na izoenzymy cytochromu P450 jest niewiele a interakcje pomiędzy przetworami z jeżówek, lekami syntetycznymi oraz suplementami diety nie są do końca naukowo wyjaśnione. W związku z powyższym, konieczne jest poszerzenie badań w tym kierunku, w celu zminimalizowania ryzyka wystąpienia działań niepożądanych przy jednoczesnym stosowaniu preparatów na bazie *E. purpurea* z lekami syntetycznymi.

W oparciu o uzyskane wyniki w niniejszej pracy doktorskiej zaobserwowano, że stosowanie wyciągu *E. purpurea* przez 3 dni w dawce 50 mg/kg p.o. nie wywołało zmian w poziomie ekspresji CYP2D2, przy czym dłuższe stosowanie ekstraktu wykazało tendencję obniżania w ilości analizowanego transkryptu o wartość około 14% w porównaniu do grupy kontrolnej ($P < 0,05$) (Tabela 30).

Tabela 30. Wpływ ekstraktu *E. purpurea* (50 mg/kg, p.o.) na poziom ekspresji badanych genów w zależności od czasu podawania, (n = 10)

GEN	CZAS PODAWANIA	ŚREDNIA ± SEM (grupa badana)	P*
CYP2D2	3 dni	99,14 ± 3,76	0,004
	10 dni	85,55 ± 5,12	0,004
CYP3A1	3 dni	98,22 ± 11,75	0,25
	10 dni	57,14 ± 7,49	< 0,001
PXR	3 dni	109,28 ± 4,22	0,17
	10 dni	100,71 ± 4,58	0,401
CAR	3 dni	165,79 ± 13,13	0,013
	10 dni	159,65 ± 18,62	0,033

*Wartość $p < 0,05$ przyjęto za statystycznie istotną (jednoczynnikowa ANOVA). Grupa kontrolna karmiona standardową dietą została określona jako 100%.

W eksperymentach prowadzonych *in vitro* wykazano, że przetwory otrzymywane z korzeni jeżówek umiarkowanie hamowały klirens substratów CYP1A2 i CYP3A4, podobnie jak echinakozyd, natomiast kwas cykoriowy charakteryzował się znacznie słabszym efektem działania na aktywność analizowanych izoform [Gorski i wsp., 2004; Gurley i wsp.]. W badaniach prezentowanych przez zespoły Gorski i wsp. [2004] oraz Gurley i wsp. [2004] analizowano również międzyosobniczą zmienność w metabolizmie różnych preparatów na bazie *E. purpurea*. Autorzy tego doświadczenia wykazali minimalne ryzyko interakcji pomiędzy przetworami z jeżówek a stosowanymi lekami syntetycznymi. Jednakże dane te

sugerują, że dalsze badania odnośnie zmienności międzyosobniczej są konieczne, ze względu na możliwość indukcji bądź inhibicji enzymów CYP u niektórych osobników stosujących preparaty z jeżówek łącznie z lekami syntetycznymi.

Mouly i wsp. [2005] wykazali, że selektywne substraty mogą powodować wzrost aktywności CYP3A w wątrobie, ale mogą nie mieć wpływu na działanie CYP3A4 w jelicie lub przeciwnie, substraty te mogą oddziaływać na enzymy jelitowe bez wpływu na wątrobowe. Podobną zależność zanotował zespół *Gorski i wsp.* [2004], który zaobserwował hamowanie aktywności izoenzymów jelitowych podrodziny CYP3A, przy jednoczesnej indukcji ich aktywności w wątrobie poprzez stosowanie ekstraktów z jeżówek. Należy jednak podkreślić, iż rezultaty badań odnośnie zróżnicowanego działania enzymów w zależności od rodzaju tkanki są słabo poznane i dlatego wymagane są dalsze badania w tym kierunku, w celu wyjaśnienia ich aktywności tkankowo specyficznej. Ponadto sugeruje się, że izoenzym CYP3A4 odgrywa kluczową rolę w metabolizmie leków przeciwnowotworowych [*Meijerman i wsp.*, 2006]. W związku z tym, informacje dotyczące działania jeżówki na modulację aktywności CYP3A4 mogą mieć istotne znaczenie, szczególnie dla pacjentów przyjmujących chemioterapię. Badania *in vivo* podejmowane w tym kierunku wykazały, że preparaty z nadziemnej części *E. purpurea* powodowały obniżoną skuteczność chemioterapii w przypadku leukemii [*Bauer*, 1996; *Melchart i wsp.*, 1995; *Roesler i wsp.*, 1991], podczas gdy przetwory z korzeni tej rośliny stymulowały komórki NK [*Gan i wsp.*, 2003; *Lersch i wsp.*, 1990] i wydłużały czas życia myszy chorych na białaczkę [*Currier i wsp.*, 2001]. W dodatku postuluje się, że wiele gatunków *Echinacea* i jej aktywne związki w warunkach *in vitro* mogą wywoływać bezpośrednio aktywność przeciwnowotworową i dlatego rekomendacje odnośnie ich stosowania są wymagane szczególnie u pacjentów z nowotworami niż ogólnie zaprzestanie przyjmowania preparatów z jeżówek [*Chicca i wsp.*, 2007; *Melchart i wsp.*, 2002; *Currier i wsp.*, 2000]. W badaniu *in vitro* przeprowadzonym przez zespół *Budzinski i wsp.* [2000] wykazano znaczną różnicę w działaniu przetworów z korzeni *E. purpurea* a *E. angustifolia* na aktywność CYP3A4, ponieważ zaobserwowano umiarkowane hamowanie tego enzymu po zastosowaniu jeżówki purpurowej, natomiast silny efekt inhibicji CYP3A4 wobec przyjmowania *E. angustifolia*. Ponadto, w innym eksperymencie w warunkach *in vitro* zaprezentowano także hamujący wpływ wodno-etanolowego ekstraktu z ziela jeżówki purpurowej na aktywność CYP3A4, jak również w przypadku łącznego stosowania *E. purpurea* i *E. angustifolia*, przy czym redukcja ta miała charakter umiarkowany [*Budzinski i wsp.*, 2000].

W innych badaniach eksperymentalnych podejmowano również wpływ jeżówki na działanie izoformy CYP2D6 odpowiedzialnej głównie za metabolizm leków syntetycznych stosowanych w leczeniu zaburzeń psychiatrycznych, m.in. depresji, schizofrenii, jak i w schorzeniach sercowo-naczyniowych. W badaniach klinicznych oraz w modelu *in vitro* wykazano, że produkty z jeżówki na bazie korzenia lub ziela nie wywierały wpływu na aktywność CYP2D6 [Yale i Gurlich, 2005; Gurley i wsp., 2004]. Podobne wyniki do Yale'a i Gurlich'a [2005] dotyczące interakcji pomiędzy przetworami z *E. purpurea* a substratami CYP2D6 uzyskały zespoły badawczy Gorski i wsp. [2004] oraz Gurley i wsp. [2004]. W Tabeli 31 przedstawiono zestawienie wyników różnych prac doświadczalnych odnośnie wpływu jeżówki purpurowej na działanie wybranych enzymów cytochromu P450.

Tabela 31. Wpływ *Echinacea purpurea* na aktywność enzymów CYP450 [Freeman i Spelman, 2008]

IZOFORMA	EFEKT	CZĘŚĆ ROŚLINY	DAWKA I CZAS STOSOWANIA	MODEL	SUBSTRAT	PIŚMIEN-NICTWO
CYP1A2	Inhibicja	Korzeń	1600 mg/dziennie x 8 dni	<i>In vivo</i>	Kofeina	Gorski i wsp., 2004
CYP1A2	Niewielka inhibicja	Cała roślina	1600 mg/dziennie x 28 dni	Badanie kliniczne	Kofeina	Gurley i wsp., 2004
CYP2C9	Inhibicja	Część nadziemna	Nie sprecyzowano	<i>In vitro</i>	7-metoksy-4-tri-fluorometylo - kumaryna	Yale i Gurlich, 2005
CYP2C9	Brak wpływu	Korzeń	1600 mg/dziennie x 8 dni	<i>In vivo</i>	Tolbutamid	Gorski i wsp., 2004
CYP2D6	Brak wpływu	Korzeń	1600 mg/dziennie x 8 dni	<i>In vivo</i>	Dekstrometorfan	Gorski i wsp., 2004
CYP2D6	Brak wpływu	Cała roślina	1600 mg/dziennie x 28 dni	Badanie kliniczne	Debryzochina	Gurley i wsp., 2004
CYP2E1	Brak wpływu	Cała roślina	1600 mg/dziennie x 28 dni	Badanie kliniczne	Chlorzoksazon	Gurley i wsp., 2004
CYP3A4	Brak wpływu	Korzeń	1600 mg/dziennie x 8 dni	Badanie kliniczne	Midazolam	Gorski i wsp., 2004
CYP3A4	Inhibicja	Korzeń	Nie sprecyzowano	<i>In vitro</i>	7-benzylksy-rezorufina	Budzinski i wsp., 2000
CYP3A4	Brak wpływu	Cała roślina	1600 mg/dziennie x 28 dni	Badanie kliniczne	Midazolam	Gurley i wsp., 2004

W niniejszej pracy doktorskiej analizowano również wpływ jeżówki purpurowej na poziom ekspresji PXR i CAR, potencjalnych regulatorów transkrypcji genu CYP3A4. Na podstawie uzyskanych wyników wykazano, że w komórkach wątroby zwierząt otrzymujących ekstrakt *E. purpurea* w dawce 50 mg/kg p.o. przez okres 3 i 10 dni wykazano

brak wpływu na ilość transkryptu receptora pregnanu X (Tabela 30). Zaobserwowano natomiast znamiennej statystycznie wzrost poziomu ekspresji konstytutywnego receptora androstanu. Dotychczas jednak nie analizowano wpływu *E. purpurea* na aktywność powyższych badanych receptorów, jednakże istnieją sugestie o możliwości ich modulacji poprzez preparaty na bazie tego surowca.

Ponadto, w oparciu o dostępne dane literaturowe postuluje się, że warunki ekstrakcji, rodzaj gatunku, dawka, czas stosowania, jak i odmienna część rośliny mogą wywierać zróżnicowany wpływ na aktywność systemu enzymatycznego CYP450. *Raner i wsp.* [2007] zaobserwowali, że hydrofobowe związki *E. purpurea*, np. alkilamidy mogą znacznie hamować enzymy CYP450 niż jego hydrofilowe składniki (fenylopropanoidy). Prace wykonywane w ostatnim czasie przez zespół *Spelman i wsp.* [dane nieopublikowane] wykazały zarówno ilościową jak i jakościową różnicę w zawartości alkilamidów i wpływ na modulację aktywności CYP w zależności od zastosowanej techniki ekstrakcji i przyjmowania preparatów etanolowych ze świeżych bądź suszonych korzeni *E. purpurea* [*Freeman i Spelman*, 2008]. Należy również mieć na uwadze, że etanolowy ekstrakt oraz przetwory z jeżówek charakteryzują się zróżnicowanym składem związków biologicznie aktywnych przez co mogą wywoływać zróżnicowany efekt na aktywność systemu CYP450. Ponadto dane uzyskane w przypadku jednego produktu na bazie jeżówki nie powinny być przenoszone względem innych preparatów otrzymanych z odmiennej części rośliny, jak również odnośnie stosowanej dawki, ponieważ mogą one wprowadzać w błąd na temat możliwych interakcji pomiędzy preparatami z *E. purpurea* a lekami syntetycznymi, ze względu na niejednokierunkowy charakter ich działania na enzymy CYP450.

5.2.3. Interakcje *Valeriana officinalis* z lekami syntetycznymi

W lecznictwie ludowym kozłek lekarski (*Valeriana officinalis*) znany jest od dawna jako uniwersalny środek o właściwościach sedatywnych. Preparaty na bazie tego surowca wykazują działanie uspakajające oraz rozkurczające i stosowane są głównie w histerii i padaczce. Znajdują także zastosowanie w leczeniu dolegliwości przewodu pokarmowego, nudności, chorób układu moczowego oraz w stanach nadmiernej pobudliwości i agresji [*Duke*, 1985]. Na rynku farmaceutycznym przetwory z korzeni kozłka lekarskiego cieszą się dużą popularnością wśród osób szczególnie z problemami psychoneurovegetatywnymi. Projekty badawcze z zakresu farmakologii wskazują na kierunkowe działanie preparatów

z kozłka lekarskiego, ponieważ są wykorzystywane szczególnie we wspomaganiu terapii zaburzeń snu i łagodnych stanów nerwicowych. Badania kliniczne obejmujące wskazanie farmakologicznych punktów uchwytu działania związków biologicznie aktywnych tej rośliny, stanowią podstawę dla wyjaśniania interakcji pomiędzy przetworami z *V. officinalis* a lekami syntetycznymi [ESCOP, 2003]. Niezwykle istotny jest fakt, iż preparaty na bazie kozłka lekarskiego, dostępne na rynku farmaceutycznym, standaryzowane są najczęściej pod względem kwasów walerenowych. Analiza przeprowadzona pod względem efektu na metabolizm leków wykazała, że *V. officinalis* uznana jest za potencjalny inhibitor izoenzymu CYP2D6 [Hellum i Nilsen, 2007]. Istnieją również doniesienia wskazujące na brak oddziaływania preparatów z kozłka lekarskiego na aktywność CYP2D6 oraz jego niewielki wpływ na CYP3A4 [Donovan i wsp., 2004a]. Przeprowadzone badania *in vitro* oraz *in vivo* wykazały, że związki biologicznie aktywne, głównie frakcja oleju eterycznego oraz standaryzowane ekstrakty posiadają kilka punktów farmakologicznego uchwytu i stanowią strategię badawczą w ocenie interakcji pomiędzy ekstraktami z kozłka lekarskiego a lekami syntetycznymi, ze zwróceniem szczególnej uwagi na mechanizmy receptorowe i pozareceptorowe, które są zaangażowane w aktywność związków czynnych korzeni *V. officinalis*. Dotychczas przeprowadzono niewiele badań odnośnie interakcji preparatów na bazie *V. officinalis* z lekami syntetycznymi, szczególnie dotyczących ośrodkowego układu nerwowego. Mimo to istnieją sugestie, iż przetwory z kozłka lekarskiego mogą modulować aktywność izoform CYP450, dlatego dalsze badania z zakresu interakcji farmakokinetycznych są szczególnie wymagane, ponieważ pozwolą dostarczyć informacji odnośnie bezpieczeństwa ich stosowania łącznie z lekami syntetycznymi.

W niniejszej pracy doktorskiej dla oszacowania potencjalnego wpływu preparatów z *V. officinalis* na aktywność enzymów CYP analizowano działanie ekstraktu z kozłka lekarskiego na ekspresję enzymów CYP3A1 i CYP2D2 zaangażowanych głównie w metabolizm większości leków stosowanych klinicznie. Wykazano, że przyjmowanie ekstraktu tego surowca w dawce 300 mg/kg p.o. przez okres 3 dni nie wpłynęło znacząco na ilość transkryptu genu CYP2D2 względem grupy niepoddanej procedurze eksperymentalnej (Tabela 32). Efekt nieznacznego obniżenia poziomu cDNA CYP2D2 zaobserwowano po 10 dniach podawania i względem grupy kontrolnej osiągnął on wartość 15% ($p < 0,05$). W przypadku CYP3A1 wykazano, że stosowanie ekstraktu *V. officinalis* w dawce jak powyżej po 3 dniach powodowało istotne statystycznie obniżenie ilość transkryptu badanego

genu o 27%, przy czym dłuższe podawanie prowadziło do większego spadku poziomu ekspresji.

Tabela 32. Wpływ ekstraktu *V. officinalis* (300 mg/kg, p.o.) na poziom ekspresji badanych genów w zależności od czasu podawania, (n = 10)

GEN	CZAS PODAWANIA	ŚREDNIA ± SEM (grupa badana)	P*
CYP2D2	3 dni	104,38 ± 4,32	0,001
	10 dni	85,37 ± 4,65	0,002
CYP3A1	3 dni	73,37 ± 6,35	0,248
	10 dni	49,76 ± 6,66	< 0,001
PXR	3 dni	133,72 ± 5,61	0,62
	10 dni	103,09 ± 5,77	0,62
CAR	3 dni	120,72 ± 4,94	0,837
	10 dni	168,45 ± 20,73	0,023

*Wartość $p < 0,05$ przyjęto za statystycznie istotną (jednoczynnikowa ANOVA). Grupa kontrolna karmiona standardową dietą została określona jako 100%.

Uzyskany rezultat powyższego eksperymentu potwierdzają badania *in vitro* przeprowadzone przez *Budziński i wsp.* [2000], które wykazały, że ekstrakt etanolowy z korzeni *V. officinalis* hamował aktywność CYP3A4, przy czym działanie to było znacznie słabsze w porównaniu z ekstraktem z *H. perforatum*. Podobny efekt hamowania wykazano dla wyizolowanego kwasu walerenowego, który również wywołał słabą redukcję aktywności CYP3A4 w porównaniu z hiperycyną pochodzącą z *H. perforatum* [*Budziński i wsp.*, 2000]. W związku z tym uzyskane wyniki wskazują, że etanolowy ekstrakt *V. officinalis*, jak i kwas walerenowy mogą powodować niewielkie ryzyko wystąpienia interakcji w fazie farmakokinetycznej.

Dokładniejsze badania w modelu *in vitro* dotyczące wpływu 14 komercyjnych produktów na bazie przetworów z korzeni *V. officinalis* na aktywność ludzkiego cytochromu CYP3A4 zostały przeprowadzone przez *Lefebvre i wsp.* [2004]. W tym celu dokonano pomiarów zawartości związków biologicznie czynnych, jak kwasu walerenowego, kwasu hydroksywalerenowego oraz kwasu acetoksywalerenowego, aby umożliwić wykazanie zależności pomiędzy stężeniem kwasów walerenowych w analizowanych produktach a efektem oddziaływania na CYP3A4. Na podstawie uzyskanych wyników, zaobserwowano hamowanie aktywności CYP3A4 o różnym nasileniu w zależności od zastosowanego rozpuszczalnika ekstrakcyjnego, m.in. wody, 70% etanolu czy acetonitrylu. W badaniu tym wykazano nieznaczną redukcję w aktywności tego izoenzymu po podaniu wodnych ekstraktów oraz wyższe hamowanie w przypadku stosowania acetonitrylu. W innym

doświadczeniu przeprowadzonym przez zespół *Donovan i wsp.* [2004a] na 12 zdrowych ochotnikach nie wykazano zachodzenia klinicznie znaczącej interakcji wynikającej z hamującego działania związków czynnych ekstraktu *V. officinalis* na CYP3A4 podobnie jak na CYP2D6. W tym celu dla określenia wpływu ekstraktu z korzeni kozłka lekarskiego na metabolizm leków będących substratami dwóch głównych izoform cytochromu P450 zastosowano alprazolam dla CYP3A4 oraz dekstrometorfan dla CYP2D6. Preparat na bazie waleriany podawano w dawce 1000 mg przez okres 14 dni, a następnie po upływie tego czasu stosowano dekstrometorfan (30 mg) oraz alprazolam (2 mg). Na podstawie pomiarów parametrów farmakokinetycznych, wykazano niewielki wpływ hamujący na CYP3A4 (alprazolam) oraz CYP2D6 (dekstrometorfan). Jednakże wyniki te nie wskazały na możliwość zachodzenia klinicznie znaczącej interakcji z substratami dla tych analizowanych izoform.

W kolejnym badaniu klinicznym przeprowadzonym przez *Gurley i wsp.* [2005b] dokonano oszacowania u 12 zdrowych ochotników wpływu długotrwałego podawania przez okres 28 dni kolejno 4 różnych ekstraktów na bazie *Valeriana officinalis*, *Hydrastis canadensis*, *Cimicifuga racemosa*, *Piper methysticum* na aktywność enzymów cytochromu P450. W tym celu przed suplementacją podawano koktajl złożony z 4 leków będących substratami dla różnych izoform CYP450, jak: 8 mg midazolamu (CYP3A4), 100 mg kofeiny (CYP1A2), 250 mg chlorzoksazonu (CYP2E1) i 5 mg debryzochiny (CYP2D6), a następnie jeden z 4 powyżej wymienionych ekstraktów roślinnych. Po analizie uzyskanych wyników wykazano, że ekstrakt na bazie *V. officinalis* stosowany w dawce 125 mg 3xdziennie nie wywoływał znaczących zmian w aktywności badanych izoform w porównaniu do innych analizowanych ekstraktów.

Ponadto, w prezentowanej pracy doktorskiej podejmowano również próby wyjaśnienia molekularnego podłoża interakcji poprzez dokonanie oceny wpływu *V. officinalis* na poziom ekspresji PXR i CAR. W oparciu o uzyskane wyniki wykazano, że ekstrakt z kozłka lekarskiego (300 mg/kg p.o.) po 3 dniach powodował wzrost ilości cDNA PXR o wartość 34% ($p > 0,05$), natomiast przedłużenie okresu podawania tego preparatu nie wpływało zmian w poziomie transkryptu analizowanego receptora (Tabela 32). W przypadku CAR zaobserwowano po 3 dniach stosowania ekstraktu nieznaczne podwyższenie ilości mRNA badanego receptora o 21% ($p > 0,05$), przy czym wydłużenie okresu podawania do 10 dni wykazało znamiennej statystycznie wzrost poziomu transkrypcji CAR o 68% względem grupy niepoddanej procedurze eksperymentalnej.

Należy zaznaczyć, że dotychczas nie analizowano wpływu *V. officinalis* na aktywność powyższych badanych receptorów, mimo to istnieją sugestie, że związki farmakologicznie aktywne zawarte w preparatach roślinnych mogą stanowić potencjalne ligandy dla aktywności PXR i CAR. Wyniki tego eksperymentu wnoszą o możliwej pośredniej regulacji PXR poprzez receptor glukokortykoidowy, jak również poprzez inny endogeny mechanizm regulacji tego receptora, natomiast w przypadku CAR obserwuje się możliwość zachodzenia, tzw. antagonizmu kompetytywnego w odniesieniu do regulacji ekspresji CYP3A1. Ponadto prezentowane badania w niniejszej pracy postulują, iż preparaty na bazie *V. officinalis* nie wchodzi w interakcje farmakokinetyczne z lekami syntetycznymi metabolizowanymi przez ludzki CYP2D6. W przypadku izoenzymu CYP3A4 istnieje natomiast ryzyko wystąpienia interakcji w fazie farmakokinetycznej, ponieważ trudno jest je przewidzieć, ze względu na stężenia związków farmakologicznie aktywnych zawartych w ekstraktach wchodzących w skład leków roślinnych oraz suplementów diety. Autorzy powyższych doświadczeń wnoszą o możliwości ekstrapolacji uzyskanych wyników do badań z udziałem ludzi, w celu określenia efektu przyjmowania preparatu na bazie waleriany wraz z lekiem syntetycznym, stanowiący substrat dla CYP2D6 lub CYP3A4. Takie podejmowane badania pozwolą wówczas na zwiększenie bezpieczeństwa farmakoterapii kojarzonej z lekiem roślinnym i zminimalizowanie wystąpienia działań niepożądanych.

5.2.4. Interakcje *Ginkgo biloba* z lekami syntetycznymi

Preparaty z miłorzębu japońskiego (*G. biloba*) należą do najlepiej sprzedawanych produktów roślinnych, szczególnie w Europie oraz Ameryce Północnej. Zastosowanie znajdują głównie w poprawianiu funkcji pamięciowych, w niewydolności krążenia mózgowego oraz różnego rodzaju demencjach, w tym w chorobie Alzheimera [Costa i wsp., 2004]. Na podstawie ich stosowania dowiedziono, iż preparaty na bazie tego surowca mogą hamować agregację płytek krwi, wchodzić w reakcje, m.in. z warfaryną, tiklopidiną, dipirydamolem, aspiryną i paracetamolem. Związkami o największym znaczeniu pod względem terapeutycznym są: terpenoidy (ginkgolidy, bilobalid), flawonoidy, pochodne kwercetyny i kemferolu oraz biflawonoidy (bilobetyna, amnetoflawon, ginkgetyna).

Liczne badania przedkliniczne, jak i kliniczne odnośnie stosowania ekstraktu z *G. biloba* wykazują wielokierunkowe jego działanie terapeutyczne. Wynika to z obecności związków biologicznie czynnych, które posiadają liczne punkty uchwytu działania głównie

na ośrodkowy układ nerwowy i mogą wyznaczać kierunek potencjalnych interakcji z lekami syntetycznymi poprzez możliwość modulacji enzymów cytochromu P450. W modelu *in vitro* wykazano, że związki czynne zawarte w ekstrakcie, w szczególności flawonoidy mogą być potencjalnymi inhibitorami dla ludzkich izoenzymów CYP450 (Tabela 33) [von Moltke i wsp., 2004; Gaudineau i wsp., 2004; Lautraite i wsp., 2002]. Podobny efekt uzyskano w badaniu na mikrosomach wątrobowych szczura, gdzie wykazano, że ekstrakt może hamować kompetycyjnie aktywność CYP1A1 oraz CYP1A2, przy czym brak takiego efektu nie obserwowano w przypadku ginkgolidów A, B, C, J oraz bilobalidu [Kuo i wsp., 2004a]. Wykazano również, że kemferol oraz izoramnetyna posiadały większą aktywność hamowania CYP1A niż kwercetyna, przy czym efekt ten był zależny od ich stężenia [Kuo i wsp., 2004a].

Tabela 33. Związki biologicznie aktywne wyizolowane z liści *Ginkgo biloba* jako inhibitory ludzkich izoenzymów CYP450 w warunkach *in vitro* [von Moltke i wsp., 2004]

	CYP1A2	CYP2C9	CYP2C19	CYP2D6	CYP3A
Aglkony flawonowe					
Kwercetyna	X	X	-	-	X
Kemferol	X	-	-	-	X
Apigenina	X	-	-	-	X
Myricetyna	-	-	-	X	X
Biflawonoidy					
Amentoflawon		X	X	X	X
Bilobetyna	Brak wykazanej aktywności				
Ginkgetyna	Brak wykazanej aktywności				

W przypadku niektórych prac eksperymentalnych z udziałem zwierząt laboratoryjnych zaobserwowano wzrost poziomu mRNA cytochromu P450 po zastosowaniu *G. biloba* oraz znaczne podwyższenie ilości białka CYP2B1 i CYP2B2 [Tada i wsp., 2008]. Wykazano również w szczurzych hodowlach komórkowych wzrost poziomu ekspresji CYP2B1 i CYP3A2, przy czym efekt ten był uzależniony od stosowanej dawki miłorzębu [Tada i wsp., 2008]. Jednakże należy podkreślić, iż istnieje niewiele doniesień literaturowych odnośnie wpływu związków biologicznie aktywnych *G. biloba* na aktywność izoenzymów CYP, a uzyskane wyniki w modelu *in vitro* nie zawsze znajdują potwierdzenie w badaniach klinicznych. W związku z tym, aktywność farmakologiczna związków biologicznie czynnych

stanowi strategię badawczą przy ocenie interakcji pomiędzy ekstraktami z *G. biloba* a lekami syntetycznymi stosowanymi w wybranych jednostkach chorobowych zarówno w badaniach przedklinicznych, jak i klinicznych.

Dla oszacowania potencjalnego wpływu miłorzębu dwuklapowego na aktywność enzymów CYP2D2 i CYP3A1, odpowiedzialnych głównie za biotransformację leków, podjęto niniejszej pracy doktorskiej analizę poziomu ekspresji powyższych izoform w modelu zwierzęcym. Na podstawie uzyskanych wyników wykazano, że u szczurów otrzymujących przez okres 3 dni ekstrakt *G. biloba* w dawce 200 mg/kg p.o. zanotowano nieznaczne obniżenie poziomu ekspresji genu CYP2D2 w komórkach wątroby o około 18% ($p > 0,05$), natomiast przedłużenie okresu podawania preparatu z miłorzębu spowodowało istotny statystycznie spadek poziomu transkryptu badanego genu tylko o wartość 10% względem grupy kontrolnej (Tabela 34). W przypadku CYP3A1 zaobserwowano po 3 dniach nieznaczny wzrost ilości cDNA tego genu o wartość 26% ($p < 0,05$), przy czym wyniki analiz tkanki wątrobowej zwierząt po 10 dniach stosowania preparatu z miłorzębu wskazywały na brak zmian w poziomie transkryptu CYP3A1 ze względu, iż wartość ta różniła się tylko o 10% w porównaniu do grupy kontrolnej.

Tabela 34. Wpływ ekstraktu *G. biloba* (200 mg/kg, p.o.) na poziom ekspresji badanych genów w zależności od czasu podawania, (n = 10)

GEN	CZAS PODAWANIA	ŚREDNIA ± SEM (grupa badana)	P*
CYP2D2	3 dni	81,89 ± 2,82	0,93
	10 dni	90,51 ± 2,23	0,002
CYP3A1	3 dni	126,19 ± 7,92	< 0,001
	10 dni	110,14 ± 7,54	0,685
PXR	3 dni	106,96 ± 5,11	0,014
	10 dni	97,41 ± 3,29	0,177
CAR	3 dni	100,98 ± 4,04	0,008
	10 dni	88,37 ± 11,36	0,045

*Wartość $p < 0,05$ przyjęto za statystycznie istotną (jednoczynnikowa ANOVA). Grupa kontrolna karmiona standardową dietą została określona jako 100%.

W modelu *in vitro* i *in vivo* przeprowadzonym przez zespół *Ohnishi i wsp.* [2003] przedstawiono wpływ ekstraktu z liści *G. biloba* (GBE) na aktywność szczurzych enzymów CYP3A zarówno w wątrobie, jak również w ścianie jelita cienkiego. Po podaniu pojedynczej dawki GBE 20 mg/kg oraz diltiazemu w dawce 30 mg/kg zaobserwowano obniżenie aktywności CYP3A w mikrosomach wątroby i jelicie cienkim, a tym samym hamowanie metabolizmu diltiazemu, co w efekcie prowadziło do wzrostu biodostępności tego leku.

Ponadto wykazano, iż hamowanie pod wpływem GBE zanikało po 24 godzinach, ponieważ niespecyficzna i odwracalna inhibicja CYP3A związana była z regeneracją CYP3A w każdej tkance. Wyniki pochodzące z badań literaturowych wskazują również na istotny fakt, iż metabolizm diltiazemu u szczura jest 60-krotnie większy niż u człowieka [Yeung i wsp., 1990], a biodostępność tego leku wynosi 2%. W porównaniu do człowieka wartość ta mieści się w granicach 30-44% [Hermann i Morselli, 1985], mimo iż drogi metaboliczne tego preparatu leczniczego są podobne [Yeung i wsp., 1990]. Należy podkreślić, iż biotransformacja powyższego preparatu syntetycznego do N-demetylodiltiazemu zachodzi u szczura przy udziale izoform CYP3A1 oraz CYP3A2, natomiast u człowieka odpowiedzialna jest tylko izoforma CYP3A4 [Trieu i Murray, 2000].

W badanie klinicznym przeprowadzonym przez zespół Gurley i wsp. [2005a] na zdrowych ochotnikach z różnymi fenotypami pod względem funkcjonowania enzymów wątrobowych CYP1A2, CYP2D6, CYP2E1 i CYP3A4 zaobserwowano, że długoterminowe stosowanie ekstraktu *G. biloba* w dawce 60mg 4x dziennie przez 28 dni łącznie z kofeiną (substrat CYP1A2), debryzochiną (substrat CYP2D6), midazolamem (substrat CYP3A4) oraz z chlorzoksazonem (substrat CYP2E1) nie powodowało znaczących zmian w metabolizmie leków, ze względu na brak wpływu na aktywność tych izoenzymów [Gurley i wsp., 2005a]. Podobne wyniki badań odnośnie aktywności CYP450 u 12 zdrowych ochotników z szybkim fenotypem metabolizmu CYP2D6 uzyskał zespół Markowitz i wsp. [2003b]. W doświadczeniu tym również nie wykazano znaczących statystycznie zmian w parametrach farmakokinetycznych dekstrometofanu (CYP2D6) oraz alprazolamu (CYP3A4) stosowanych przez okres 14 dni wraz ze standaryzowanym ekstraktem *G. biloba* w dawce 120 mg/2xdziennie. Zaobserwowano jednakże nieznaczne zmniejszenie wartości parametru AUC dla alprazolamu, przy czym biologiczny okres półtrwania nie uległ istotnym zmianom, dlatego wynik ten zinterpretowano jako brak indukcji wątrobowego enzymu CYP3A4 pod wpływem stosowanego ekstraktu.

W innym badaniu klinicznym przeprowadzonym przez Yasui-Furukori i wsp. [2004] na 14 ochotnikach z chorobą Alzheimera w wieku od 65 do 80 lat podjęto próbę określenia działania stosowanego w dawce 90 mg/dzień przez 30 dni ekstraktu z liści *G. biloba* na parametry farmakokinetyczne donepezylu. Na podstawie aktywności acetylocholinoesterazy (AChE) w erytrocytach wykazano brak znaczących zmian w metabolizmie donepezylu, katalizowanego przez izoformę CYP2D6 i CYP3A4. W związku z tym uzyskane wyniki

świadczyły o braku niepożądanych interakcji pomiędzy donepezilem i ekstraktem z *G. biloba* podczas stosowania terapii kojarzonej w leczeniu choroby Alzheimera.

Gaudineau i wsp. w modelu *in vitro* [2004] zaobserwowali natomiast hamowanie aktywności ludzkich enzymów CYP1A2, CYP2C9, CYP2E1, CYP3A4 pod wpływem ekstraktu z miłorzębu dwuklapowego, przy czym wykazano, że największą redukcję w aktywności tych izoform wywierała frakcja flawonoidowa. Podobne rezultaty do powyższego eksperymentu wykazał zespół *von Moltke i wsp.* [2004], który zaobserwował także hamowanie ludzkich cytochromów pod wpływem związków aktywnych zawartych w ekstrakcie *G. biloba* (Tabela 33). Podobną zależność odnośnie udziału flawonoidów w modulowaniu aktywności enzymów CYP450 w modelu *in vitro* potwierdziły wyniki uzyskane z wcześniejszego badania przeprowadzonego przez *Huynh i wsp.* [2002]. Wybrane rezultaty doświadczeń dotyczących wpływu ekstraktu *G. biloba* na działanie enzymów CYP450 uczestniczących w metabolizmie leków stosowanych klinicznie zaprezentowano w Tabeli 35.

Tabela 35 Wpływ ekstraktu *G. biloba* na aktywność enzymów CYP w badaniach klinicznych

LEK SYNTETYCZNY	EKSTRAKT	EFEKT	PIŚMIENICTWO
Donepezil-1xdzień 5 mg/20 tygodni	90 mg/dzień przez 30 dni	Brak wpływu na CYP2D6 i CYP3A4	Yasui-Furukori i wsp., 2004
Kofeina -100 mg Midazolam -8 mg Debryzochina-5 mg Chlorzoksazon-500 mg „koktajl”	60mg 4dziennie przez 28 dni	Brak wpływu na CYP2D6; CYP3A4; CYP1A2; CYP2E1	Gurley i wsp, 2005a
Dekstrometorfan-30 mg Alprazolam-2 mg	120 mg/ 2x dziennie	Brak indukcji CYP2D6 i CYP3A4	Markowitz i wsp., 2003b

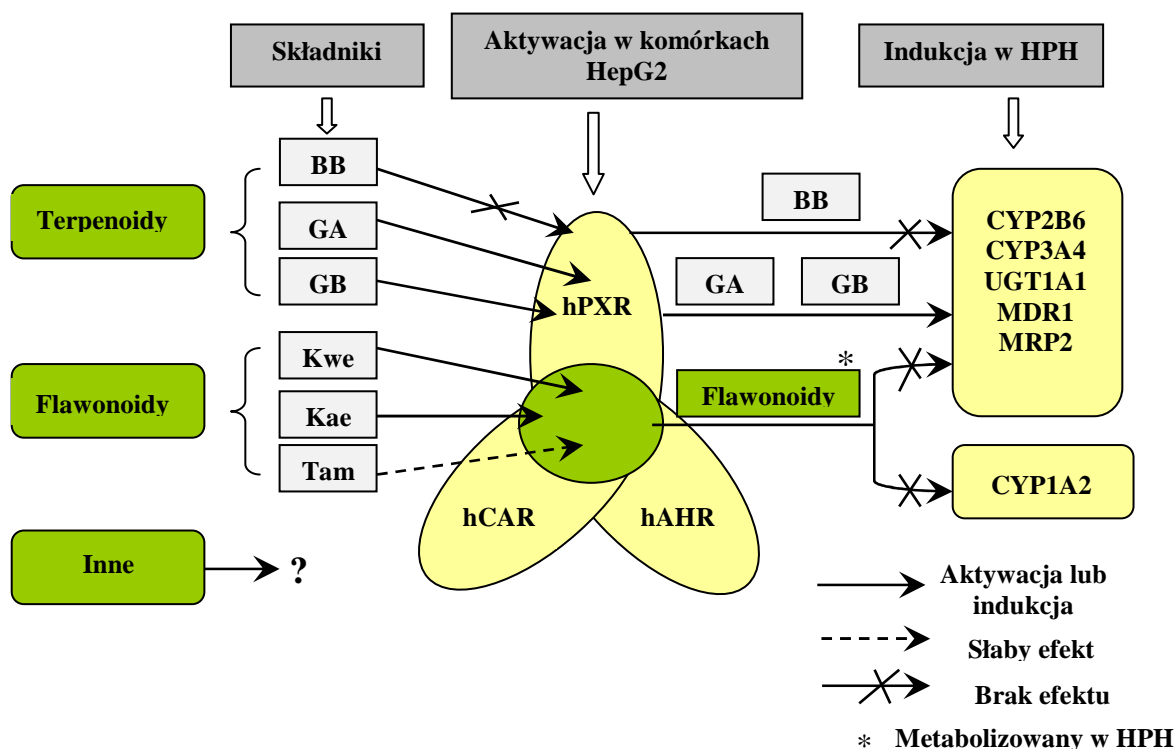
Wiele badań na szczurach w modelu *in vivo* jak i *in vitro* sugerują, że ekstrakt z miłorzębu posiada zdolność indukcji metabolizmu leków. Fakt ten potwierdzają badania *Shinozuka i wsp.* [2002], którzy wykazali u szczurów, że stosowanie przez 4 tygodnie diety wzbogaconej o *G. biloba* powodowało znaczną indukcję poziomu mRNA CYP2B1/2, CYP3A1/2 w wątrobie, natomiast nie wywoływało zmian w ilości transkryptu CYP1A1/2, CYP2E1, CYP2C11 i CYP4A1. Efekt indukcji u szczurów zaobserwował również zespół

badawczy Umegaki i wsp. [2002] wykazując wzrost stężenia i aktywności różnych enzymów CYP w zależności od stosowanej dawki i czasu trwania eksperymentu.

Doniesienia literaturowe sugerują również, iż w badaniach *in vitro* związki aktywne zawarte w *G. biloba* hamują aktywność enzymów CYP3A, podczas gdy w modelu *in vivo* na zwierzętach modelowych wnioskuje się, że miłorząb stanowi induktor CYP3A2, CYP2B1/2 i CYP3A1. Jednakże istnieją także dane z wielu doświadczeń potwierdzające fakt, iż preparaty na bazie *G. biloba* nie wywierają wpływu na aktywność ludzkich enzymów CYP450, m.in. CYP3A4, CYP1A2, CYP2E1, CYP2D6 i CYP2C9. W związku z tym powyższe prezentowane wyniki prac nie pozwalają w sposób jednoznaczny dostarczyć informacji dla przyszłych badań prowadzonych z udziałem ludzi nad potencjalnymi interakcjami farmakokinetycznymi pomiędzy preparatami *G. biloba* a lekami syntetycznymi, będącymi substratami dla CYP3A4 i CYP2D6 w zależności od stężenia związków zawartych w ekstraktach GBE i czasu ich stosowania.

W niniejszej pracy analizowano wpływ *G. biloba* na poziom ekspresji PXR i CAR w celu wykazania zależności pomiędzy aktywnością CYP3A4 a badanymi receptorami w aspekcie regulacji tej izoformy na podłożu molekularnym. Na podstawie uzyskanych wyników doświadczenia nie zanotowano po 3 i 10 dniach stosowaniu miłorzębu dwuklapowego (200 mg/kg p.o.) zmian w poziomie mRNA receptora pregnanu X (Tabela 34). Podobny rezultat badań wykazano w przypadku konstytutywnego receptora androstanu, gdzie zaobserwowano także brak znaczących różnic w poziomie transkryptu CAR względem próby niepoddanej procedurze eksperymentalnej. W porównaniu do uzyskanych wyników w pracy doktorskiej w doświadczeniu *Yeung i wsp.* [2008] zanotowano wzrost poziomu ekspresji mysiego PXR (mPXR) i ludzkiego PXR (hPXR) w transfekowanych komórkach HepG2 po zastosowaniu ekstraktu z *G. biloba* (200 µg/ml) odpowiednio o wartość 3,2- i 9,5-krotną. Różnica w poziomie ekspresji wynikała z aktywacji gatunkowo specyficznej, ponieważ potwierdzono w eksperymentach, że ryfampina indukuje ludzki PXR a nie mysiego, podczas gdy PCN aktywuje mysiego PXR a nie ludzkiego. Powyższe stwierdzenie wynikało ze stopnia homologii sekwencji osiągającej wartość 77% w domenie wiążącej ligand [Moore i wsp., 2002]. Należy podkreślić, iż w doświadczeniu *Yueng i wsp.* [2008] wykazali także wzrost logarytmiczny aktywności hPXR i CYP3A4 po stosowaniu miłorzębu w zakresie od 200 do 800 µg/ml, natomiast przy stężeniu 5 i 10 µM nie zanotowali zmian w poziomie ekspresji PXR. Podobny rezultat uzyskał zespół *Chang i wsp.* [2006], który w pierwotnej hodowli szczurzych hepatocytów zaobserwował wzrost

ekspresji PXR i CYP3A4 po zastosowaniu ekstraktu *G. biloba*. W innym badaniu przeprowadzonym przez Satsu i wsp. [2008] wykazano indukcję aktywności ludzkiego PXR przy stężeniu 10, 50, 100 μM ginkolidu A i ginkolidu B, przy czym trudno było stwierdzić aktywację PXR w przypadku stosowania ekstraktu *G. biloba* lub bilobalidu. W modelu *in vitro* przeprowadzonym przez zespół Li i wsp. [2009] zaobserwowano w komórkach HepG2, że ginkolid A (GA) i ginkolid B (GB) z ekstraktu *G. biloba* (EGb 761) są selektywnymi aktywatorami PXR a nie CAR (Rycina 44). Wykazano również, że kwercetyna i kaempferol indukują PXR, CAR i AHR, podczas gdy bilobalid (BB) nie wywierał działania na badane receptory. Autorzy tego doświadczenia zaobserwowali również w pierwotnej hodowli ludzkich hepatocytów (HPH) indukcję CYP2B6, CYP3A4, UGT1A1, MDR1 i MRP2 po zastosowaniu EGb 761, ginkolidu A i B, natomiast brak wpływu na powyższe geny po podaniu z ekstraktu bilobalidu i flawonoidów (kwercetyny, kaempferolu i tamaryksetyny).



Rycina 44. Schemat prezentujący aktywację NR i indukcję enzymów metabolizujących leki (DME) przez EGb 761. Rycina przedstawia główne bioaktywne terpenoidy i flawonoidy EGb 761 w aktywacji receptorów ksenobiotyków PXR, CAR i AhR w linii komórkowej oraz indukcję DME i transporterów w pierwotnej hodowli ludzkich hepatocytów (HPH). Podkreślono, że flawonoidy są metabolicznie niestabilne w HPH [Li i wsp., 2008].

Ponadto, autorzy badania w oparciu o uzyskane wyniki wykazali, że flawonoidy indukują ekspresję UGT1A1 i CYP1A2 w komórkach HepG2 ale nie w HPH, natomiast kwercetyna (Kwe) i kaempferol (Kae) wywoływały nieoczekiwaną silną aktywację hCAR w komórkach HepG2, wskazując na ich potencjalną antagonistyczną rolę względem tego receptora [Li i wsp., 2009]. W związku z tym, iż hCAR był stale aktywowany w komórkach nieśmiertelnych a mechanizm podkreślający aktywację CAR nie został dotychczas w pełni poznany, dalsze eksperymenty są wymagane w tym zakresie, aby wyjaśnić obserwowaną w doświadczeniu aktywację hCAR.

5.2.5. Interakcje *Panax ginseng* z lekami syntetycznymi

Żeń-szeń (*P. ginseng*) jest najbardziej popularną rośliną leczniczą w Azji, poprawiająca funkcje fizjologiczne w sytuacjach stresowych. Korzeń żeń-szenia (*Radix Ginseng*) stosowany jest jako środek tonizujący, wzmacniający w stanach osłabienia, rekonwalescencji, zmniejszonej wydajności i osłabienia koncentracji [Komisji E, 1991]. Jednocześnie działa jako silny antyoksydant, chroniąc organizm przed działaniem wolnych rodników, które przyspieszają proces starzenia. Wykazuje aktywność przeciwnowotworową poprzez działanie antyproliferacyjne względem różnego rodzaju komórek nowotworowych. Uczestniczy także w normalizacji gospodarki lipidowej obniżając stężenie frakcji cholesterolu LDL i triglicerydów, a podwyższając stężenie frakcji HDL. Aktywność farmakologiczna *P. ginseng* związana jest głównie z obecnością triterpenowych saponin zwanych ginsenozydami, związków acetylenowych oraz peptydoglikanów, które mogą mieć wpływ także na układ sercowo-naczyniowy [Sun, 2004]. Wykazano, że preparaty na bazie *P. ginseng* mogą wchodzić w potencjalne interakcje z lekami przeciwcukrzycowymi oraz z insuliną powodując wzmocnienie ich efektu hipoglikemicznego, jak również z lekami przeciwzakrzepowymi, m.in. warfaryną zwiększając ryzyko krwawień [Sun, 2004].

Istotny jest fakt, że przeprowadzone badania farmakologiczne pod względem właściwości związków biologicznie czynnych korzeni *P. ginseng* wnioskują także o wyrażnej ich aktywności immunomodulującej [Song i wsp., 2004; Lim i wsp., 2004] oraz o istotnym wpływie na ośrodkowy układ nerwowy w poprawianiu funkcji kognitywnych [Reay i wsp., 2005]. W związku z tym, iż przetwory na bazie korzenia z *P. ginseng* odgrywają znaczącą rolę we wspomaganiu farmakoterapii chorób OUN, należy zwracać szczególną uwagę na bezpieczeństwo ich zażywania podczas terapii łączonej pod względem potencjalnych

interakcji lekowych ze względu, iż mogą oddziaływać m.in. z inhibitorami monoaminooksydaz (fenelzin), prowadząc do wystąpienia działań niepożądanych. W oparciu o przeprowadzone badania można wnioskować, iż preparaty z żeń-szenia zmieniają parametry farmakokinetyczne niektórych leków, ze względu na możliwość modulacji aktywności enzymów CYP450. Powyższe stwierdzenie odnośnie zmian aktywności izoform cytochromu P450 pod wpływem przetworów *P. ginseng* można poprzeć wynikami uzyskanymi zarówno z eksperymentów prowadzonych warunkach *in vivo* jak i *in vitro*.

W badaniu prezentowanym przez zespół *Chang i wsp.* [2002] zaobserwowano hamowanie aktywności enzymów CYP1A1/2 i CYP1B1 w zależności od zawartości poszczególnych ginsenozydów po zastosowaniu wyciągu z żeń-szenia [*Chang i wsp.*, 2002]. W innym doświadczeniu w modelu *in vitro* wykazano natomiast indukcję CYP3A4 zarówno po zastosowaniu wyciągu *P. ginseng* jak i *G. max*, a brak wpływu na aktywność tego enzymu w warunkach *in vivo* [*Anderson i wsp.*, 2003]. Jednakże należy podkreślić, iż dotychczas niewiele przeprowadzono badań odnośnie wpływu przetworów *P. ginseng* na izoenzymy cytochromu P450, a tym samym na metabolizm leków będących substratami dla poszczególnych izoform CYP450. Więcej badań w tym zakresie dokonano nad wyizolowanymi związkami biologicznie aktywnymi z korzeni *P. ginseng*. Z tego względu konieczność jest przeprowadzenia dalszych badań w zakresie interakcji pomiędzy stosowanymi lekami, w celu zminimalizowania niekorzystnych oddziaływań, jak również zwiększenia skuteczności stosowanej farmakoterapii.

W niniejszej pracy doktorskiej analizowano również wpływ ekstraktu *P. ginseng* (30 mg/kg) na aktywność enzymów uczestniczących głównie w metabolizmie leków stosowanych klinicznie. W oparciu o uzyskane wyniki po 3 i 10 dniach podawania tego ekstraktu wykazano spadek poziomu ekspresji CYP2D2 odpowiednio o 36% ($p < 0,05$) i 20% ($p < 0,05$) względem grupy kontrolnej karmionej standardową dietą (Tabela 36). W przypadku CYP3A1 zaobserwowano także istotne statystycznie obniżenie poziomu mRNA dla tego genu odpowiednio o blisko 50% i 30%.

Tabela 36. Wpływ ekstraktu *P. ginseng* (30 mg/kg, p.o.) na poziom ekspresji badanych genów w zależności od czasu podawania, (n = 10)

GEN	CZAS PODAWANIA	ŚREDNIA ± SEM (grupa badana)	P*
CYP2D2	3 dni	63,69 ± 2,82	< 0,001
	10 dni	80,12 ± 4,9	< 0,001
CYP3A1	3 dni	51,55 ± 4,25	< 0,001
	10 dni	70,29 ± 6,47	< 0,001
PXR	3 dni	119,25 ± 5,37	0,25
	10 dni	132,5 ± 8,29	0,027
CAR	3 dni	123,29 ± 7,92	0,929
	10 dni	188,29 ± 10,67	< 0,001

*Wartość $p < 0,05$ przyjęto za statystycznie istotną (jednoczynnikowa ANOVA). Grupa kontrolna karmiona standardową dietą została określona jako 100%.

Podobny rezultat badań do niniejszego doświadczenia wykazał w modelu *in vitro* Song i wsp. [2004], którzy analizowali u myszy wpływ ginsanu wyizolowanego z żeń-szenia na poziom całkowitej frakcji enzymów wątrobowych CYP450. Zaobserwowali, że stosowanie iniekcyjne tego związku w dawce 100 mg/kg powodowało zarówno po pierwszym, jak i po drugim dniu obniżenie poziomu całkowitej frakcji izoenzymów mikrosomalnych wątroby cytochromu P450. Wyniki analiz tego eksperymentu wykazały u myszy rodzaju męskiego silniejszą aktywność ginsanu na obniżenie poziomu enzymów CYP450 niż u myszy rodzaju żeńskiego. W innym eksperymencie przeprowadzonym przez zespół Kim i wsp. [1997] na szczurzych mikrosomach wątroby badano wpływ saponin czerwonego żeń-szenia na aktywność enzymów CYP450. W oparciu o uzyskane wyniki analiz wykazano hamowanie aktywności izoenzymów w sposób zależny od dawki. W badaniu *in vitro* przeprowadzonym przez zespół Henderson i wsp. [1999] prezentowano natomiast wpływ oczyszczonych ginsenozydów: Rb1, Rb2, Rc, Rd, Re, Rf i Rg1 na aktywność katalityczną ludzkich rekombinowanych izoenzymów wątrobowych CYP, takich jak: CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 oraz CYP3A4. Ginsenozydy inkubowano z powyższymi enzymami oraz ze specyficznymi substratami. W tym celu jako kontrole pozytywne względem uzyskanych wyników badań wykorzystano następujące leki syntetyczne, jak: furafylina (CYP1A2), sulfafenazol (CYP2C9), trancylpromina (CYP2C19), chinidyna (CYP2D6), oraz ketokonazol (CYP3A4), hamujące aktywność prezentowanych enzymów. Na podstawie analizy fluorometrycznej wykazano, że tylko ginsenozyd Rd powodował nieznaczne hamowanie aktywności rekombinowanych enzymów, przy czym ginsenozyd Rb2 wykazywał bardzo słaby efekt hamujący względem aktywności CYP3A4 oraz CYP2D6. Ponadto zaobserwowano, że ginsenozyd Rc powodował wzrost aktywności CYP2C9 a ginsenozyd Rf

wywoływał taki sam efekt względem CYP3A4. W związku z tym, w oparciu o uzyskane wyniki postulowano, że ginsenozydy nie wywierają działania hamującego na aktywność katalityczną powyższych rekombinowanych enzymów. W pracy przeglądowej *Lu i wsp.* [2005] analizowano również potencjalny wpływ ginsenozydów wyizolowanych z ekstraktu *P. ginseng* na aktywność ludzkich izoform CYP450, gdzie szczególną uwagę zwrócono na Rb1, Rb2, Rc i Rd, które hamują aktywność CYP3A4 (Tabela 37).

Tabela 37. Wpływ ginsenozydów na aktywność izoenzymów CYP450 [*Lu i wsp.*, 2005]

GINSENOZYDY	CYP1A1	CYP1A2	CYP2E1	CYP2C9	CYP2C19	CYP3A4
Rb1	0	0	0	-		-
Rb2	0	0		-		-
Rc	0	0		-		-
Rd	0	0		-		-
Re		+	0		0	+
Rf	0	0	0		0	
Rg1	0	0				

+ indukcja, - inhibicja, 0 - brak wpływu

W badaniu klinicznym prezentowanym przez zespół *Gurley i wsp.* [2005a] wśród zdrowych ochotników z odmiennymi fenotypami pod względem enzymów wątrobowych CYP1A2, CYP2D6, CYP2E1 oraz CYP3A4 analizowano wpływ standaryzowanego na zawartość 5% ginsenozydów ekstraktu *P. ginseng*. Zaobserwowano, że podawanie tego ekstraktu w dawce 500 mg 3x dziennie przez 28 dni łącznie z 5 mg debryzochiny stosowanej przed podaniem ekstraktu oraz w 27 dniu terapii wywołało hamowanie aktywności izoformy CYP2D6 bez większego znaczenia klinicznego. W przypadku podawanie ekstraktu *P. ginseng* wraz z midazolamem w dawce 8 mg nie wykazano istotnego wpływu na aktywność izoenzymu CYP3A4. Podobny rezultat zaobserwowano w przypadku stosowania kofeiny w dawce 100 mg, gdzie wykazano statystycznie nieistotny wpływ ekstraktu na aktywność CYP1A2. Ponadto, brak znaczącego wpływu *P. ginseng* na CYP2E1 zaobserwowano również po podaniu chlorzoksazonu (500 mg), leku syntetycznego będącego substratem dla tej izoformy.

W innym doświadczeniu przeprowadzonym przez zespół *Anderson i wsp.* [2003] wykazano, że stosowanie żeń-szenia standaryzowanego na 5% ginsenozydów w dawce 100 mg 2x dziennie przez 14 dni nie wpłynęło na stosunek 6- β -hydrokoryzolu do koryzolu, sugerując na brak zmian w aktywności CYP3A4.

W pracy doktorskiej analizowano również wpływ standaryzowanego ekstraktu *P. ginseng* (30 mg/kg p.o.) na ekspresję receptorów jądrowych biorących udział w regulacji CYP3A1. W komórkach wątroby zwierząt po 3 dniach stosowania ekstraktu wykazano nieznaczne podwyższenie ilości cDNA dla PXR o wartość 19%, natomiast po wydłużeniu doświadczenia do 10 dni zaobserwowano znamiennej statystycznie wzrost poziomu ekspresji receptora o 33% ($p < 0,05$) w stosunku do grupy kontrolnej (Tabela 36). W przypadku CAR zanotowano nieznaczne podwyższenie ilości cDNA analizowanego receptora o wartość 23% ($p > 0,05$) po 3 dniach podawania, natomiast wydłużenie czasu eksperymentu do 10 dni wywołało wzrost ilości transkryptu tego receptora o 88% ($p < 0,05$) względem grupy niepoddanej procedurze doświadczalnej.

Dotychczas jednak nie analizowano wpływu ekstraktu *P. ginseng* na aktywność CAR, mimo to istnieją sugestie, że związki farmakologicznie aktywne zawarte w preparatach *P. ginseng* mogą stanowić potencjalne ligandy dla aktywności tego receptora. Podobne stwierdzenie odnośnie możliwej modulacji PXR poprzez związki farmakologicznie aktywne zawarte w ekstrakcie żeń-szenia wysunął *Krug* [2009]. W doświadczeniu analizując wpływ preparatu *P. ginseng* na transkrypcję CYP3A4 zależną od PXR wykazał wzrost aktywności lucyferazy w zależności od stosowanej dawki, co świadczyło o potencjalnej aktywacji receptora pregnanu X, przy czym efekt ten był porównywalny do rezultatu działania St. John's wort. Ponadto wysunięto postulat odnośnie indukcji lucyferazy poprzez stosowanie substancji chemicznych, np. ryfampicyny w obecności PXR. Zaobserwowano, iż związki te mogą oddziaływać z CYP3A4 poprzez inne mechanizmy hamujące, takie jak: neutralizacja enzymu, kompetycja wewnątrzsubstratowa bądź allosteryczna regulacja czynnika PXR [<http://www.science.uwaterloo.ca/WWSEF/09Awards/09KrugReport.pdf>].

Obecnie wykazano, iż znanych jest 40% substancji chemioterapeutycznych pochodzących z roślin, które mogą skutecznie wiązać się z PXR i być pomocne w przewidzeniu interakcji typu lek-lek [*Mu i Stephenson*, 2005]. W związku z powyższym, istnieje jednak konieczność przeprowadzania dalszych badań w celu zminimalizowania ryzyka potencjalnych interakcji na podłożu molekularnym pomiędzy preparatami na bazie *P. ginseng* a lekami syntetycznymi.

5.2.6. Interakcje *Allium sativum* z lekami syntetycznymi

Czosnek (*Allium sativum*) jest jednym z najstarszych środków leczniczych stosowanym w medycynie w leczeniu wielu schorzeń, głównie układu odpornościowego i oddechowego. Zwiększa właściwości obronne organizmu wzmacniając i regulując jego reakcje komórkowe i humoralne układu immunologicznego, przez co może być wykorzystywany do zwalczania zakażeń bakteryjnych i wirusowych [Hu i wsp., 2005]. Jednocześnie działa jako silny przeciwutleniacz chroniąc organizm przed działaniem wolnych rodników, które między innymi przyspieszają proces starzenia. Wykazuje działanie antyproliferacyjne względem różnego rodzaju komórek nowotworowych, ponieważ hamuje powstawanie silnych związków kancerogennych, m.in. nitrozamin. Jego aktywność farmakologiczna związana jest głównie z obecnością związków aktywnych bogatych w siarkę (allicyna i alliina), a także flawonoidów (kwercytyna i rutyna), terpenów, saponin i polisacharydów [Blecharz-Klin i wsp., 2005]. Istotne jest również stwierdzenie, iż czosnek wykazuje działanie hipotensyjne, które wydaje się być powiązane z zawartością wspomnianych powyżej związków siarkowych i zdolnością obniżania poziomu lipidów [Spigelski i Jones, 2001].

Istnieją doniesienia, iż preparaty czosnku zmieniają także parametry farmakokinetyczne niektórych leków, m.in. paracetamolu powodując wzrost toksyczności leku, warfaryny obniżając jej stężenie we krwi oraz chlorpropamidu powodującego hipoglikemię podczas łącznego ich stosowania [Izzo i Ernst, 2001]. W warunkach *in vitro* zaobserwowano, że preparaty *A. sativum* w połączeniu z warfaryną mogą wpływać na funkcje płytek krwi i powodować wzrost ryzyka krwawień [Awang i Fugh-Berman, 2002] poprzez tzw. efekt addytywny [Sunter, 1991], co przekłada się na wydłużenie czasu protrombinowego [Vaes, 2000]. Powyższy fakt można tłumaczyć tym, iż badania przeprowadzone na ludzkich płytkach krwi wykazały, że tiosiarczany zawarte w świeżym czosnku mogą wchodzić w interakcje z kwasem acetylosalicylowym lub innymi lekami antykoagulacyjnymi i przeciwplatekowymi [Ang-Lee i wsp., 2001]. W związku z tym stosowanie preparatów z czosnku hamujących agregację płytek krwi, wiąże się ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia krwawień, np. pooperacyjnych oraz krwiałków nadtwardówkowych [Rose i wsp., 1990]. Jednocześnie wykazano, że allicyna jako aktywny składnik *A. sativum* hamuje agregację w większym stopniu niż aspiryna [Briggs i wsp., 2000]. Zaobserwowano również, iż stosowanie łączne z czosnkiem inhibitorów konwertazy angiotensyny (np. lizinoprilu)

- leków o wysokim profilu bezpieczeństwa, może potęgować hipotensję i wywoływać omdlenia [McCoubrie, 1996]. Ponadto czosnek posiada także działanie hipoglikemiczne i może powodować interakcje z dipirydamolem, lekami hipoglikemicznymi (chlorpropamid) oraz insuliną, [Awang i Fugh-Berman, 2002].

Istotny jest również fakt, iż przyjmowanie preparatów na bazie czosnku poleca się szczególnie osobom zakażonym HIV w terapii wspomaganiej, w celu zwalczania zakażeń oportunistycznych w obrębie układu oddechowego. Wykazano, że u zdrowych ochotników przyjmujących wyciąg z czosnku następuje nieznaczne zmniejszenie AUC dla inhibitora proteazy HIV-1 - ritonawiru [Gallicano i wsp., 2003]. W przypadku dwóch osób zakażonych wirusem HIV zaobserwowano działanie toksyczne związane z zaburzeniami funkcji układu pokarmowego podczas równoczesnego stosowania ritonawiru i preparatów z czosnku [Laroche i wsp., 1998]. Niekorzystne objawy ustępowały po zaprzestaniu stosowania czosnku lub leku przeciwwirusowego bądź po zastosowaniu niższej dawki ritonawiru. Obserwowane działania niepożądane mogły wynikać ze zwiększonego stężenia ritonawiru w wyniku hamowania metabolizmu tego leku przy udziale CYP3A poprzez aktywne składniki czosnku lub hamowania transportu z udziałem glikoproteiny P. W związku z powyższym wyniki pochodzące z badań klinicznych wykorzystujących wyciągi *A. sativum* wnoszą, iż interakcje leków syntetycznych z preparatami czosnku mogą mieć istotne znaczenie kliniczne i powinny być brane pod uwagę w zalecanej farmakoterapii.

Wysunięte stwierdzenie odnośnie potencjalnych oddziaływań pomiędzy preparatami roślinnymi a lekami syntetycznymi próbowano częściowo wyjaśnić w niniejszej pracy doktorskiej poprzez analizę wpływu ekstraktu *A. sativum* (250 mg/kg p.o.) na modulację aktywności enzymów CYP2D2 i CYP3A1. W oparciu o uzyskane wyniki nie zaobserwowano zmian w poziomie mRNA genu CYP2D2 w komórkach wątroby badanych zwierząt zarówno po 3 i 10 dniach stosowania (Tabela 38). W przypadku CYP3A1 wykazano redukcję poziomu ekspresji badanego genu o 30% po 3 dniach podawania, natomiast przedłużenie okresu eksperymentu wywołało istotny statystycznie spadek poziomu transkrypcji CYP3A1 o 42% względem grupy kontrolnej.

Tabela 38. Wpływ ekstraktu *A. sativum* (250 mg/kg, p.o.) na poziom ekspresji badanych genów w zależności od czasu podawania, (n = 10)

GEN	CZAS PODAWANIA	ŚREDNIA ± SEM (grupa badana)	P*
CYP2D2	3 dni	94,27 ± 3,29	0,022
	10 dni	103,38 ± 4,9	0,51
CYP3A1	3 dni	70,14 ± 4,93	0,064
	10 dni	58,34 ± 6,29	< 0,001
PXR	3 dni	127,43 ± 3,51	0,795
	10 dni	59,83 ± 5,49	< 0,001
CAR	3 dni	116,75 ± 7,62	0,582
	10 dni	119,69 ± 9,89	0,692

*Wartość $p < 0,05$ przyjęto za statystycznie istotną (jednoczynnikowa ANOVA). Grupa kontrolna karmiona standardową dietą została określona jako 100%.

Na podstawie powyższych uzyskanych wyników przytoczono niniejszej pracy zróżnicowane rezultaty badań innych autorów nad wpływem *A. sativum* na aktywność różnych izoform CYP450. W badaniu klinicznym na zdrowych ochotnikach stosujących sakwinawir oraz kapsułki zawierające czosnek zaobserwowano zmniejszenie AUC o wartość 51% i obniżenie C_{max} o 54% [Hu i wsp., 2005; Piscitelli i wsp., 2001; Piscitelli i wsp. 2002] dla leku przeciwwirusowego będącego substratem CYP3A4 [Fitzsimmons i Collins, 1997]. Otrzymany wynik tego eksperymentu świadczył o podwyższonym poziomie ekspresji CYP3A4 w jelicie, a w efekcie wnioskował o obniżonej biodostępności stosowanych leków będących substratami tej izoformy. Ponadto możliwość indukcji P-gp przez czosnek nie została dotychczas w pełni poznana, przy czym wykazano pewną zależność, iż długoterminowe jego stosowanie może prowadzić do powstania i akumulacji metabolitów sakwinawiru, które indukują metabolizm leku i modulują aktywność P-gp [Gisolf i wsp., 2000]. W innym badaniu przeprowadzonym na zdrowych ochotnikach przez zespół Markowitz i wsp. [2003c] odnośnie wpływu wyciągu czosnku na metabolizm dekstrometorfanu (leku metabolizowanego przez CYP2D6) oraz alprazolamu (leku metabolizowanego przez CYP3A4) wykazano brak znaczących zmian w aktywności enzymów CYP2D6 i CYP3A4, mimo iż istnieją sugestie o możliwości indukcji CYP3A4 tym preparatem. Zaobserwowano także nieznaczny wzrost stosunku dekstrometorfanu do jego metabolitów w porównaniu z grupą kontrolną [Markowitz i wsp., 2003c], jednakże wynik ten nie miał istotnego znaczenia dla aktywności CYP2D6. W innych eksperymentach wykazano natomiast, że czosnek może indukować CYP3A4 i prowadzić do obniżenia poziomu leków w osoczu [Hu i wsp., 2005; Piscitelli i wsp., 2001; Piscitelli i wsp., 2002].

Podobny rezultat przedstawiony w pracy doktorskiej uzyskano w badaniu *in vitro* przeprowadzonym przez zespół *Foster i wsp.* [2001], który wykazał, że zarówno świeże jak i dojrzałe ekstrakty czosnku hamują aktywność CYP3A4 w ludzkich mikrosomach wątroby. Wykorzystując w tym celu metodę fluorymetryczną określono potencjalny wpływ preparatów czosnku na zmianę aktywności różnych enzymów, takich jak: CYP2C9*1, 2C9*2, 2C19, 2D6, 3A4 i 3A7. Na podstawie uzyskanych wyników wykazano, że świeży ekstrakt jak i olejek pozyskany z czosnku oraz sproszkowany i dojrzały czosnek hamują działanie powyższych izoenzymów, za wyjątkiem CYP2D6, którego aktywność nie uległa zmianie. W doświadczeniu tym zaobserwowano również, iż CYP2C9*2 podlegał stymulacji poprzez stosowany świeży ekstrakt [*Foster i wsp.*, 2001]. W oparciu o uzyskane wyniki wnioskowano, że różne związki siarkowe zawarte w *A. sativum* odpowiedzialne są za działanie modulujące CYP450. Postulowano, że zarówno siarczek dialliilu (DAS) jak i produkty jego przemiany sulfotlenek dialliilu (DASO) oraz sulfon dialliilu (DASO₂) są konkurencyjnymi inhibitorami CYP2E1, przy czym DASO₂ jest uznawany jako samobójczy inhibitor, który tworzy kompleks prowadzący do autokatalitycznej destrukcji [*Jin i Baillie*, 1997]. Natomiast w pracy *Greenblatt i wsp.* [2006] wykazano, że aktywne składniki ekstraktu czosnku S-metylo-L-cysteina i S-alliilo-L-cysteina w stężeniu 100 µmol/L powodują potencjalne hamowanie *in vitro* aktywności CYP3A o 20-40% w porównaniu do kontroli (Tabela 39).

Tabela 39. Wpływ związków aktywnych ekstraktu *A. sativum* na aktywność ludzkich izoform cytochromu P450 w modelu *in vitro* [*Greenblatt i wsp.*, 2006]

ZWIĄZKI CZOSNKU	EFEKT HAMOWANIA A IZOFORMY CYP450					
	CYP3A	CYP2C9	CYP2C29	CYP2D6	CYP1A2	CYP2B6
Alliina	-	-	-	-	-	-
Cykloalliina	-	-	-	-	-	-
S-metylo-L-cysteina	+	-	-	-	-	-
SAC	+	-	-	-	-	-
N-acetylo-SAC	-	-	-	-	-	-
S-alliilomerkapto-L-cysteina	-	-	-	-	-	-
Gamma-glutamyl-SAC	-	-	-	-	-	-

Wszystkie związki badano przy stężeniu 100 µmol/L. SAC, S-alliilo-L-cysteina.

Istnieją doniesienia, iż działanie aktywnych związków czosnku na różne izoformy CYP *in vivo* zależy od gatunku. W badaniach *in vivo* na myszach wykazano, że stosowanie czosnku powodowało wzrost poziomu CYP2E1 i 1A2, mimo iż nie zaobserwowano zmian w całkowitej zawartości enzymów mikrosomalnych wątroby cytochromu P450 [Kishimoto i wsp., 1999]. Jednakże wiele badań z udziałem zwierząt eksperymentalnych (szczur) wykazało, że stosowanie związków aktywnych czosnku, np. DAD przyczyniło się do obniżenia ilości transkryptu CYP2E1 i poziomu białka lub powodowało wzrost, jak również brak istotnych zmian w aktywności CYP1A, CYP2B, i CYP3A [Dalvi, 1992; Haber i wsp., 1994; 1995]. Podobny rezultat badań odnośnie hamowania aktywności CYP2E1 oraz spadek poziomu jego białka pod wpływem stosowania DAD, DADS oraz siarczku metyloalliilowego uzyskał Reicks i Crankshaw [1996]. Efekt ten został potwierdzony w badaniach z udziałem ludzi w przypadku doustnego stosowania DAS oraz olejku pozyskanego z czosnku, gdzie wykazano znaczny spadek aktywności CYP2E1 stosując chlorzoksazon jako substrat tej izoformy [Loizou i Cocker, 2001]. Podkreślono również fakt, iż krótko- i długoterminowe przyjmowanie aktywnych związków czosnku m.in. DAS, DAD, siarczku dipropylu i trisiarczku dialliilu prowadziło do obniżonej ekspresji CYP2E1, przy czym krótkoterminowe stosowanie nie wywierało wpływu na aktywność CYP1A i CYP2B [Dalvi, 1992; Haber i wsp., 1994; 1995]. W przypadku długoterminowego stosowania (np. 6-7 tygodni) zaobserwowano zwiększenie ekspresji mRNA CYP1A i CYP2B1 oraz ich poziomu białka, z wyjątkiem stosowania disiarczku dipropylu, który znacznie powodował wzrost aktywności CYP2E1 [Guyonnet i wsp., 2000]. W przypadku CYP3A, jego ekspresja na poziomie białka i mRNA była wzmocniona przez DAS, DAD oraz trisiarczek dialliilu (DADS), mimo iż jego aktywność nie uległa zmianie [Wu i wsp., 2002]. W dodatku wykazano u szczurów, że aktywne związki czosnku mogą modulować aktywność antyoksydacyjną enzymów wątrobowych. Stwierdzenie to zostało potwierdzone przez zespół Shenn i wsp. [1999a,b], który zaobserwował w przeprowadzonym eksperymencie, że DAD i olejek pozyskany z czosnku hamują aktywność peroksydazy glutationowej, podczas gdy DAD i DAS wzmacniają aktywność reduktazy glutationowej. Ponadto zauważono u szczurów, że dieta wzbogacona o olejek pozyskany z czosnku powodowała wzrost aktywności izoenzymu CYP2B1 zależny od dawki [Chen i wsp., 2001a]. W innych przeprowadzonych badaniach wykazano natomiast, że czosnek może osłabiać działanie hepatotoksyczne paracetamolu u myszy poprzez hamowanie aktywności CYP2E1 [Wang i wsp., 1996].

Przedstawione wyniki badań wskazują, że hamowanie różnych enzymów CYP450 przez związki organiczno siarkowe czosnku wynikają z ich struktury. Zwiększona liczba siarki w cząsteczce prowadzi do nasilonego działania hamującego CYP2E1 i indukcji CYP1A oraz CYP2B [Wu i wsp., 2002]. Związki zawierające grupy metylowe mają niewielki lub brak wpływu na izoenzymy CYP [Siess i wsp., 1997], przy czym związki z dwiema grupami propylowymi lub allilowymi prowadzą do odpowiedzi plejotropowej ze strony enzymów metabolizujących leki, czyli inhibicji lub indukcji. Siarczek dipropylu, disiarczek dipropylu i DAD indukują aktywność CYP1A oraz CYP2B, natomiast hamują CYP2E1 i CYP3A4. Takim modyfikacjom odnośnie aktywności enzymów towarzyszy wzrost poziomu białka CYP2B1 i CYP2B2 oraz spadek jego poziomu w przypadku CYP2E1 [Siess i wsp., 1997]. Badania *in vivo* i *in vitro* z udziałem modelu zwierzęcego oraz badania kliniczne wskazują, że różne związki aktywne czosnku mogą być substratami, inhibitorami lub induktorami różnych enzymów CYP. Modulacja aktywności i ekspresji enzymów CYP zależy od typu i chemicznej struktury związków czosnku, stosowanej dawki, modelu zwierzęcego i tkanki oraz pochodzenia czosnku. Dlatego interakcje związków aktywnych czosnku z enzymami CYP mogą mieć istotne znaczenie dla interakcji preparat roślinny - lek syntetyczny i dostarczać wyjaśnień na temat chemoprewencyjnego działania składników czosnku.

W przedstawionej pracy doktorskiej analizowano również wpływ *A. sativum* (250 mg/kg p.o.) na poziom ekspresji receptorów jądrowych PXR i CAR w celu podjęcia próby wyjaśnienia molekularnego podłoża interakcji preparat roślinny - lek syntetyczny. W pracy tej wykazano w komórkach wątroby nieznaczne podwyższenie poziomu ekspresji PXR o 27% po 3 dniach stosowania, natomiast wydłużenie czasu doświadczenia do 10 dni spowodowało istotny statystycznie spadek ilości transkryptu badanego receptora o 40% względem grupy kontrolnej (Tabela 38). W przypadku konstytutywnego receptora androstanu zaobserwowano niewielki wzrost stężenia cDNA w komórkach wątroby odpowiednio o 17% ($p > 0,05$) i 20% ($p > 0,05$). Z przeglądu literaturowego wynika, iż dotychczas przeprowadzono kilka badań odnośnie wpływu *A. sativum* i jej aktywnych składników na indukcję receptorów jądrowych CAR i PXR. W modelu *in vitro* przeprowadzonym na ludzkich hepatocytach wykazano, że czosnek może indukować CYP3A4, przy czym mechanizm tego działania nie został do tej pory scharakteryzowany [Raucy, 2003]. Postulowano również, że mechanizm indukcji wyżej wspomnianego enzymu może być związany z aktywacją receptora pregnanu X poprzez mechanizmy pośrednie lub może wynikać z działania innych czynników niż PXR [Raucy, 2003]. Ponadto w badaniu

z wykorzystaniem modelu zwierzęcego sugerowano, iż czosnek oraz siarczki alliiilu mogą potencjalnie indukować enzymy mikrosomalne wątroby poprzez CAR [Fisher i wsp., 2007], a tym samym zmieniać metabolizm leków. Podobną sugestię w swojej pracy wysunął Zahng i Noordine [2006], w której analizowano u szczurów wpływ DADS i DAS na poziom ekspresji enzymów CYP2B1/2 i CYP3A. W oparciu o uzyskane wyniki z doświadczenia i dane z przeglądu literaturowego postulowano, że DAS poprzez mechanizm pośredni może aktywować konstytutywny receptor androstanu i stymulować indukcję CYP2B [Lardy i wsp., 2006; Kawamoto i wsp., 1999; Xia i Kemper, 2005], ponieważ bezpośrednie wiązanie DAS z CAR wydaje się być nieprawdopodobne i z tego względu wskazane są dodatkowe badania, aby określić w jaki sposób DAS lub jego metabolity mogą aktywować CAR. Dotychczas jednak nie analizowano wpływu czosnku i jego substancji biologicznie czynnych na poziom ekspresji CAR w regulacji transkrypcji CYP3A4. W związku z tym wymagane są badania z tego zakresu, w celu wyjaśnienia molekularnego mechanizmu interakcji pomiędzy preparatami na bazie *A. sativum* a lekami syntetycznymi, metabolizowanymi głównie poprzez izoformę CYP3A4, co pozwoli na zminimalizowanie wystąpienia działań niepożądanych.

5.2.7. Interakcje *Glycine max* z lekami syntetycznymi

Soja jest bogatym źródłem fitoestrogenów ze względu na obecność genisteiny, jak i daidzeiny, które imitują działanie żeńskich hormonów płciowych. Izoflawony te wykazują właściwości estrogenne, co ma istotne znaczenie w terapii zaburzeń związanych z okresem menopauzy oraz w profilaktyce osteoporozy [Potter i wsp., 1998]. Związki te odgrywają także znaczącą rolę w schorzeniach układu nerwowego oraz w dolegliwościach związanych ze strony układu krążenia. W przeprowadzonych badaniach zarówno na rezusach jak i zdrowych ochotnikach, którym podawano izoflawony sojowe, wykazano działanie obniżające poziom frakcji LDL, natomiast wzrost stężenia frakcji HDL, powiązane z hamowaniem rozwoju arteriosklerozy. W eksperymentach na zwierzętach zaobserwowano, iż izoflawony sojowe posiadają działanie neuroprotekcyjne oraz wywierają istotny wpływ na poprawę krążenia mózgowego.

Z doniesień literaturowych postuluje się, że soja może wywierać hamujący efekt na wzrost komórek raka piersi, jak również nasilać działanie tamoksyfenu - leku stosowanego w leczeniu tego nowotworu. Natomiast inne wyniki z badań przeprowadzonych przez naukowców z USA wnioskuje, że związek zawarty w soi - genisteina, która imituje działanie

estrogenów może przyspieszać wzrost komórek raka piersi. Z tego względu sugeruje się unikanie przyjmowania preparatów sojowych łącznie z hormonalną terapią zastępczą (HZT), jak również podczas zażywania tamoksyfenu i innych leków stosowanych w leczeniu raka piersi.

Istotne znaczenie w przewidywaniu interakcji pomiędzy preparatami sojowymi a lekami syntetycznymi ma ocena potencjalnej inhibicji bądź indukcji CYP w warunkach *in vivo* wywołana podaniem tego typu produktów funkcjonujących na rynku żywieniowym w połączeniu z klasyczną farmakoterapią. Postuluje się, że soja jak również izolowane z niej daidzeina i genisteina mogą hamować aktywność różnych izoform cytochromu P450 oraz glikoproteiny P odpowiedzialnej za jelitowo-mózgowy transport leków. Izoflawony sojowe opisywane są jako inhibitory CYP3A4, przy czym zwrócono uwagę, iż genisteina wykazuje właściwości inhibicji wobec CYP3A7, czego natomiast nie zaobserwowano w przypadku CYP3A5. Ponadto, produkty tej kategorii hamują metabolizm zależny od CYP3A4 w różnym stopniu, przy czym oddziałują głównie poprzez znaczne hamowanie CYP2C9, CYP2C19 i CYP2D6 [Foster i wsp., 2003].

Dotychczas istnieje niewiele doniesień na temat potencjalnych interakcji preparatów sojowych z lekami syntetycznymi, dlatego w tym celu podejmowane są badania mające wyjaśnić tego typu interakcje na podłożu molekularnym, co pozwoli na zwiększenie skuteczności i bezpieczeństwa przyjmowanych leków syntetycznych jednocześnie z preparatami sojowymi. W przedstawionej pracy doktorskiej w modelu *in vivo* analizowano działanie standaryzowanego ekstraktu sojowego (100 mg/kg p.o.) na aktywność izoenzymów CYP2D2 i CYP3A1 oraz czynników transkrypcyjnych PXR i CAR biorących udział w regulacji transkrypcji genu CYP3A1. Na podstawie uzyskanych wyników wykazano brak istotnych zmian w ilości transkryptu cDNA CYP2D2 zarówno po 3 jak i 10 dniach stosowania ekstraktu, mimo iż poziom ekspresji tego genu uległ nieznacznej redukcji odpowiednio o 14% i 11% (Tabela 40). W przypadku CYP3A1 zaobserwowano znamiennej statystycznie redukcję stężenia cDNA o 35% w stosunku do grupy kontrolnej, przy czym efekt ten utrzymywał się po wydłużeniu doświadczenia, a spadek ilości transkryptu tego genu wyniósł odpowiednio 36% ($p < 0,05$).

Tabela 40. Wpływ ekstraktu *G. max* (100 mg/kg, p.o.) na poziom ekspresji badanych genów w zależności od czasu podawania, (n = 10)

GEN	CZAS PODAWANIA	ŚREDNIA ± SEM (grupa badana)	P*
CYP2D2	3 dni	85,79 ± 3,74	0,502
	10 dni	89,07 ± 3,27	0,002
CYP3A1	3 dni	65,11 ± 5,64	0,021
	10 dni	64,09 ± 7,72	< 0,001
PXR	3 dni	104,56 ± 5,36	0,009
	10 dni	107,83 ± 5,68	0,962
CAR	3 dni	90,94 ± 12,16	0,005
	10 dni	175,09 ± 18,28	0,837

*Wartość $p < 0,05$ przyjęto za statystycznie istotną (jednoczynnikowa ANOVA). Grupa kontrolna karmiona standardową dietą została określona jako 100%.

Podobny rezultat badań odnośnie CYP3A1 analizowanego w niniejszej pracy uzyskał zespół *Laurenzana i wsp.* [2002]. W doświadczeniu tym na szczurach rodzaju męskiego wykazano, że stosowanie genisteiny w dawce 200mg/kg wywołało znaczący spadek poziomu ekspresji CYP3A i CYP2C. W innym eksperymencie zaobserwowano, że zarówno genisteina jak i eguol hamowały CYP1A i CYP2E1 w ludzkich oraz mysich mikrosomach [*Helsby*, 1998]. W badaniu *in vitro* przeprowadzonym przez zespół *Anderson i wsp.* [2003] zastosowano odpowiednio leki syntetyczne będące substratami określonych enzymów CYP w celu oszacowania wpływu ekstraktu sojowego na ich metabolizm. W oparciu o uzyskane wyniki wykazali, że hydrolizowany ekstrakt sojowy w ludzkich mikrosomach wątrobowych hamował aktywność CYP1A2 (fenacetyna), CYP2A6 (kumaryna), CYP2D6 (dekstrometorfan), CYP2C9 (warfaryna) oraz CYP3A4 (testosteron), przy czym niehydrolizowany ekstrakt sojowy powodował słaby efekt inhibicji CYP1A2, CYP2A6 i CYP2D6 oraz wykazywał tendencje w aktywacji CYP3A4. Podobny rezultat badań w modelu *in vitro* uzyskał zespół badawczy *Foster i wsp.* [2003], który również analizował wpływ soi oraz związków aktywnych w niej zawartych na aktywność katalityczną enzymów CYP450. Na podstawie uzyskanych wyników wykazano hamowanie CYP3A4, CYP2C9, CYP2C19 i CYP2D6 po zastosowaniu różnych preparatów sojowych, jak również zaobserwowano efekt inhibicji CYP3A4 oraz CYP3A7 po podaniu samej genisteiny. Ponadto wykazano również, że stosowanie ekstraktu sojowego zawierającego 50 mg izoflawonów przez 14 dni u zdrowych ochotników nie wpłynęło istotnie na stosunek metabolitu do leku (6-β-OH-kortyzol/kortyzol), sugerując na brak wpływu na aktywność CYP3A4 [*Anderson i wsp.*, 2003]. W innym badaniu prowadzonym w modelu *in vitro* obserwowano subterapeutyczne wartości INR w przypadku łącznego stosowania mleka sojowego

i warfaryny, co mogło sugerować o potencjalnej indukcji enzymu niż jego inhibicji [Cambria-Kiely, 2002].

W doświadczeniu prezentowanym przez zespół *Ronis i wsp.* [2004] wykazano natomiast u małych szczurów bezpośrednio po urodzeniu wzrost poziomu ekspresji CYP3A1 i CYP3A2 w wątrobie po podaniu izolatu białka sojowego (65mg izoflawonów/kg na dzień). Uzyskany wynik trudno jednak było wyjaśnić ze względu, iż molekularny mechanizm podkreślający wpływ powyższego izolatu na ekspresję CYP3A nie został dotychczas poznany [Ronis i wsp., 2004]. Ponadto indukcję CYP3A4 uzyskano także w modelu *in vitro* w komórkach hepatoma po zastosowaniu odpowiednio ekstraktu izoflawonowego, genisteiny i daidzeiny [Li i Shay, 2004]. W innym badaniu wykazano natomiast, że genisteina stanowi substrat dla podrodziny CYP3A [Jager i wsp., 1998; Roberts-Kirchoff i wsp., 1999] i może indukować swój własny metabolizm [Ruckpaul i Rein, 1990]. W modelu *in vivo* przeprowadzonym przez zespół *Kishida i wsp.* [2004] badano wpływ fermentowanego ekstraktu sojowego zawierającego głównie 155mg/g genisteiny i 127mg/g daidzeiny na ekspresję szczurzych izoform, takich jak: CYP1A1/2, CYP2B1/2, CYP2C11, CYP2E1, CYP3A1/2 oraz CYP4A1. Na podstawie uzyskanych wyników wykazano, że dieta sojowa (0-300 mg izoflawonów/kg) powodowała brak indukcyjnego wpływu na poziom transkrypcji analizowanych enzymów CYP450. Podobne wyniki analiz otrzymał zespół badawczy *Helsby i wsp.* [1997], który wykazał brak u myszy wpływu genisteiny i ekwolu (40mg/kg, i.p.) na aktywność i zawartość białka CYP1A1/2, CYP3A1 i CYP2E1. W późniejszym eksperymencie natomiast zaobserwowano, że izoflawony sojowe oraz jego metabolity obniżały aktywność i poziom białka CYP1A2, przy czym spadek ten nie był wystarczający, żeby wyjaśnić właściwości chemoprewencyjne izoflawonów sojowych [Helsby i wsp., 1998]. Ponadto wykazano, że genisteina i daidzeina stosowane w dawce 200mg/kg redukowały u myszy stosunek 16alfa-OH estronu do 2-OH estronu, nie powodując wzrostu zawartości CYP w mikrosomach wątroby. Wybrane rezultaty doświadczeń dotyczących wpływu ekstraktu *G. max* i aktywnych substancji na aktywność enzymów CYP450 zaprezentowano w Tabeli 41.

Tabela 41. Wpływ *G. max* i jej aktywnych substancji na aktywność enzymów CYP450

EKSPERYMENT	EFEKT	MODEL	PIŚMIENNICTWO
Fermentowany ekstrakt sojowy zawierający 155mg/g genisteiny i 127 mg/g daidzeiny (dawka: 200mg/kg i 300mg/kg, 4 tyg.)	Hamowanie CYP3A2	<i>In vivo</i>	Kishida i wsp., 2004
Fermentowany ekstrakt sojowy zawierający 155mg/g genisteiny i 127 mg/g daidzeiny (dawka: 200mg/kg i 300mg/kg, 4 tyg.)	Brak wpływu na CYP1A1/2, CYP2B1/2, CYP2C11, CYP2E1, CYP3A1 i CYP4A1	<i>In vivo</i>	Kishida i wsp., 2004
1250 ppm genisteiny	Indukcja CYP3A i CYP2C u samców	<i>In vivo</i>	Laurenzana i wsp., 2002
Genisteina i ekwol (40 mg/kg, 4 dni)	Brak wpływu na CYP1A1/2, CYP2E1 i CYP3A1	<i>In vivo</i>	Helsby i wsp., 1997
Genisteina i ekwol	Hamowanie CYP1A i CYP2E1	<i>In vitro</i>	Helsby i wsp., 1998
Hydrolizowany ekstrakt sojowy	Hamowanie CYP1A2, CYP2A6, CYP2D6, CYP2C9 i CYP3A4	<i>In vitro</i>	Anderson i wsp., 2003
Niehydrolizowany ekstrakt sojowy	Nieznaczne hamowanie CYP1A2, CYP2A6 CYP2D6; nieznaczna indukcja CYP3A4	<i>In vitro</i>	Anderson i wsp., 2003
Ekstrakt sojowy zawierający 50 mg izoflawonów (2 x dziennie, 14 dni)	Brak wpływu na CYP3A4	<i>In vivo</i>	Anderson i wsp., 2003
Izolat białka sojowego (65 mg izoflawonów/kg na dzień)	Indukcja CYP3A1 i CYP3A2	<i>In vivo</i>	Ronis i wsp., 2004

W prezentowanej pracy wykazano również, że stosowanie ekstraktu sojowego przez 3 i 10 dni, nie wywołuje zmian w poziomie ekspresji PXR względem próby niepoddanej procedurze eksperymentalnej (Tabela 40). Podobny rezultat uzyskano dla konstytutywnego receptora androstanu, przy czym wydłużenie czasu podawania ekstraktu wywołało znamienne statystycznie wzrost poziomu ekspresji CAR o 75%, co może świadczyć w odniesieniu do poziomu ekspresji CYP3A1 o możliwości regulacji tej izoformy w oparciu o antagonizm kompetytywny.

Z przeglądu literaturowego wynika, iż dotychczas nie analizowano wpływu ekstraktu sojowego na aktywność konstytutywnego receptora androstanu, jednakże postuluje się, że związki aktywnie farmakologicznie zawarte w preparatach sojowych mogą modulować aktywność CAR. Na podstawie uzyskanych wyników pracy doktorskiej można sugerować, iż ekstrakt sojowy standaryzowany na zawartość genisteiny może uczestniczyć w regulacji CYP3A1 poprzez tzw. mechanizm antagonizmu odwracalnego lub jeszcze inny szlak regulacji, który dotychczas nie został jeszcze poznany. W związku z tym, wymagane są dalsze badania z tego zakresu w celu wyjaśnienia potencjalnej aktywacji tego receptora poprzez związki biologicznie aktywne zawarte w preparatach sojowych. W przypadku PXR istnieje kilka doniesień odnośnie wpływu izoflawonów sojowych na poziom ekspresji analizowanego czynnika transkrypcyjnego, uczestniczącego głównie w regulacji CYP3A4. W badaniu przeprowadzonym przez *Li i wsp.* [2009] analizowano wpływ genisteiny, daidzeiny i ekwolu na aktywność ludzkiego i mysiego PXR w modelu *in vitro* z wykorzystaniem pierwotnej hodowli hepatocytów i komórek opartych na przejściowej transfekcji oraz w modelu *in vivo* u myszy. W analizie przejściowej transfekcji wykazano, że genisteina i daidzeina aktywują dziki PXR u myszy, ale nie formę zmutowaną. W przypadku ludzkiego PXR zanotowano natomiast, że ekwol stanowi silny aktywator tego receptora niż genisteina i daidzeina. Ponadto wykazano, że metabolit daidzeiny – ekwol w hepatocytach ludzkich powodował podwyższenie ilości transkryptu CYP3A4 oraz wzrost ekspresji immunoreaktywnego białka. Uzyskane wyniki powyższego badania wskazały więc na różnicę w aktywacji PXR poprzez izoflawony sojowe i ekwol wynikającą ze specyficzności gatunkowej. W innym doświadczeniu na komórkach HepG2 prezentowanym przez zespół *Liu i wsp.* [2006] badano wpływ pięciu wyselekcjonowanych związków fitochemicznych na działanie PXR. Na podstawie wyników wykazano, że izoflawony sojowe, luteina i kurkumina stymulowały transkrypcję CYP3A4 poprzez receptor pregnanu X w zależności od stosowanej dawki, natomiast izoramnetyna i rutyna nie miały wpływu na aktywność tego receptora. W oparciu o prezentowane wyniki badań można wnioskować o potencjalnym mechanizmie regulacji CYP3A4 poprzez izoflawony sojowe na aktywność PXR, mimo iż w niniejszej pracy nie wykazano istotnych zmian w poziomie jego ekspresji. Jednakże istotny jest fakt, iż postuluje się o możliwej pośredniej regulacji PXR poprzez receptor glukokortykoidowy lub inny endogeny mechanizm regulacji jego aktywności, np. poprzez udział HNF4 α . W związku z czym wymagane są dalsze badania w tym kierunku, w celu dokładniejszego

określenia wpływu związków aktywnych zawartych w preparatach sojowych na regulację transkrypcji CYP3A4.

5.2.8. Interakcje *Camellia sinensis* z lekami syntetycznymi

Zielona herbata (*Camellia sinensis*) jest najstarszym i najpopularniejszym napojem świata, przy czym w Europie znana jest głównie z walorów leczniczo – profilaktycznych. *C. sinensis* i jej ekstrakty są bogatym źródłem flawonoidów, powszechnie zwanych katechinami, wśród których wyróżnia się głównie epikatechinę (EC), epigallokatechinę (EGC) oraz galusan epigallokatechiny (EGCG), charakteryzujące się znaczną aktywnością antyoksydacyjną, znajdując zastosowanie m.in. w profilaktyce schorzeń układu krążenia [Lu i wsp., 2003, Huang i wsp., 1999]. W większości testów przeprowadzonych na synaptosomach wykazano różnice w aktywności antyoksydacyjnej tych związków. Stwierdzono, że epikatechina i epigallokatechina działają słabiej w porównaniu do ich galusanów. W badaniach *in vitro* zaobserwowano również, iż galusan epikatechiny i epigallokatechiny hamuje utlenianie LDL, natomiast frakcja polifenolowa z zielonej herbaty stosowana u zdrowych ochotników znacznie opóźniała procesy oksydacji w organizmie. Ma to szczególne znaczenie w profilaktyce arteriosklerozy naczyń wieńcowych i mózgowych, ponieważ dochodzi do obniżenia poziomu frakcji LDL na korzyść frakcji HDL [Miura i wsp., 2001]. Ponadto, epigallokatechinie przypisuje się także skuteczność przeciwkrzepliwą, ponieważ hamuje predyspozycje do koagulacji płytek krwi, jak również chroni przed zawałem i udarem mózgu. Wiele badań potwierdza, że długoterminowe spożywanie katechin może pozytywnie wpływać na polepszanie profilu lipidowego i mieć korzystny wpływ na hamowanie otyłości indukowanej dietą wysokotłuszczową [Murase i wsp., 2000].

W badaniach *in vitro* oraz na zwierzętach wykazano, że katechiny zielonej herbaty posiadają właściwości chemoprewencyjne. Działanie takie udowodniono dla EGCG na różnych modelowych liniach komórek poprzez wywoływanie procesu apoptozy w komórkach nowotworowych bądź hamowanie czynnika NF- κ B, odpowiadającego za transdukcję sygnału w tych komórkach. Inny molekularny mechanizm działania chemoprewencyjnego opiera się na hamowaniu białka aktywującego AP-1, którego produkcja zwiększa się w komórkach transformowanych, prowadząc do rozwoju nowotworu. W badaniach z udziałem zwierząt modelowych zaobserwowano również, że zielona herbata posiada aktywność antyproliferacyjną w komórkach hepatoma i może zapobiegać hepatotoksyczności stanowiąc

jako czynnik chemoprewencyjny w hepatokarcynogenezie [Hasegawa i wsp., 1995; Qin i wsp., 2000].

Prowadzone badania przedkliniczne sugerują, że zielona herbata, szczególnie zawarte w niej katechiny oraz związki polifenolowe mogą modulować aktywność enzymów CYP450, co zaobserwowano w przypadku długoterminowej jej konsumpcji, która powodowała wzrost aktywności enzymów CYP1A1 i CYP1A2 [Sohn i wsp., 1994]. W związku z powyższym istnieją sugestie, iż związki aktywne zawarte w zielonej herbacie mogą uczestniczyć w klinicznie znaczących interakcjach z lekami syntetycznymi na etapie ich biotransformacji poprzez wpływ na poziom ekspresji enzymów CYP, jednak pozostają one kwestią dyskusyjną ze względu na nieliczne doniesienia literaturowe. Na podstawie uzyskanych wyników w niniejszej pracy doktorskiej, w której analizowano wpływ zielonej herbaty na poziom ekspresji CYP2D2 i CYP3A1 wykazano, że stosowanie *C. sinensis* w dawce 250 mg/kg p.o. nie wywołuje zmian w poziomie mRNA CYP2D2 w komórkach wątroby badanych zwierząt zarówno po 3 jak i 10 dniach jej podawania (Tabela 42). W przypadku CYP3A1 obserwowano jedynie po 10 dniach stosowania ekstraktu istotny statystycznie spadek poziomu transkrypcji CYP3A1 o 38% względem grupy kontrolnej.

Tabela 42. Wpływ ekstraktu *C. sinensis* (300 mg/kg, p.o.) na poziom ekspresji badanych genów w zależności od czasu podawania, (n = 10)

GEN	CZAS PODAWANIA	ŚREDNIA ± SEM (grupa badana)	P*
CYP2D2	3 dni	95,27 ± 3,99	0,01
	10 dni	111,87 ± 4,91	0,412
CYP3A1	3 dni	86,59 ± 6,05	0,567
	10 dni	62,16 ± 5,52	< 0,001
PXR	3 dni	119,33 ± 5,36	0,487
	10 dni	90,55 ± 3,78	0,034
CAR	3 dni	117,43 ± 7,98	0,639
	10 dni	176,94 ± 11,24	< 0,001

*Wartość $p < 0,05$ przyjęto za statystycznie istotną (jednoczynnikowa ANOVA). Grupa kontrolna karmiona standardową dietą została określona jako 100%.

W badaniu *in vivo* przeprowadzonym przez Nishikawa i wsp. [2004] wykazano, że stosowanie ekstraktu z zielonej herbaty w sposób chroniczny (400mg/kg, 7 dni) powoduje indukcję szczurzego CYP3A w wątrobie, a redukcję o 70% aktywności CYP3A w jelicie. Brak zmian w aktywności CYP3A *in vivo* obserwowano w przypadku stosowania pojedynczej dawki powyższego ekstraktu. W innym badaniu *in vitro* prezentowanym przez

Nishikawa i wsp. [2004] wykazano, że ekstrakt z zielonej herbaty (dawka 400mg/10ml/kg) hamuje działanie 1'-hydroksylazy bufarolu stanowiącej marker aktywności CYP2D6 oraz wykazuje efekt inhibicji wobec CYP3A4 w oparciu o analizę aktywności 6 β -testosteronu. Podobny wynik hamowania aktywności enzymatycznej uzyskano dla izoformy CYP3A4 analizowanej w ludzkich mikrosomach wątrobowych pod wpływem stosowania katechin pochodzących z zielonej herbaty [*Mirkov i wsp.*, 2007]. Powyższy efekt zaprezentowano także w pracy *Foti i Wahlstrom* [2008], gdzie na podstawie dostępnych danych literaturowych zwrócono uwagę, iż w warunkach *in vitro* w wyniku stosowaniu preparatów ziołowych, w tym również zielonej herbaty ma miejsce inhibicja, m.in. CYP1A2, CYP2C9, CYP2D6 oraz CYP3A4. W pracy *Muto i wsp.* [2001] sugerowano fakt, iż katechiny zielonej herbaty EGCG i ECG mogą być odpowiedzialne w modelu *in vitro* za redukcję aktywności enzymów cytochromu P450.

W badaniu klinicznym przeprowadzonym na zdrowych ochotnikach wykazano, że bezkofeinowy ekstrakt zielonej herbaty (844 mg katechin /dziennie lub 4 kapsułki dziennie, każda zawierała 211 ± 25 mg katechin i < 1 mg kofeiny) podawany przez 14 dni nie zmieniał aktywności CYP2D6 w oparciu o demetylację deksrometofanu i nie wywierał istotnego wpływu na CYP3A4 uczestniczącego w hydroksylacji alprazolamu [*Donovan i wsp.*, 2004b]. Brak wpływu ekstraktu na działanie powyższych enzymów CYP450 CYP2D6 i CYP3A4 zaobserwowano również w pracy *Frye'a i wsp.* [1997]. W oparciu o uzyskane wyniki postulowano, że stosowanie bezkofeinowego ekstraktu pozwala na przyjmowanie wyższych dawek katechin pochodzących z zielonej herbaty bez obawy wystąpienia działań niepożądanych niż w przypadku obecności kofeiny. W badaniu klinicznym przeprowadzonym przez *Chow i wsp.* [2006] zaobserwowano, że stosowanie katechiny zielonej herbaty EGCG w dziennej dawce 800mg przez 4 tygodnie wykazało brak wpływu na efekt fenotypowy CYP1A2, CYP2D6 i CYP2C9, przy czym zaobserwowano wzrost o 20% w AUC buspironu, sugerując nieznaczną inhibicję CYP3A4. Autorzy tego badania postulowali, że stosowanie katechin z zielonej herbaty nie powodowało klinicznie znaczących interakcji z lekami syntetycznymi będącymi ich substratami. Należy podkreślić, że w badaniach przedklinicznych z udziałem zwierząt modelowych (szczur) wykazano również indukcję CYP1A1/2 [*Bu-Abbas i wsp.*, 1994; *Sohn i wsp.*, 1994], jednakże efekt ten przypisywano kofeinie obecnej w zielonej herbacie, która stanowiła potencjalny induktor CYP1A2 [*Ayalogu i wsp.*, 1995; *Goasduff i wsp.*, 1996].

W Tabeli 43 zaprezentowano wybrane rezultaty doświadczeń dotyczących wpływu ekstraktu *C. sinensis* i jej aktywnych substancji na działanie enzymów CYP450 uczestniczących w metabolizmie leków stosowanych klinicznie.

Tabela 43. Wpływ *C. sinensis* i jej aktywnych substancji na aktywność enzymów CYP450

IZOFORMY	EFEKT	DAWKA	CZAS STOSOWANIA	MODEL	PIŚMIENICTWO
CYP2C9 CYP2D6 CYP3A4	Hamowanie	500 mg	10 min inkubacji	<i>In vitro</i>	Nishikawa i wsp., 2004
CYP3A	Brak wpływu	400 mg/kg	1 dzień	<i>In vivo</i>	Nishikawa i wsp., 2004
CYP3A	Indukcja	400 mg/kg	7 dni	<i>In vivo</i>	Nishikawa i wsp., 2004
CYP3A4	Hamowanie	1µM, 10µM, 100µM katechin	50 min inkubacji	<i>In vitro</i>	Mirkov i wsp., 2007
CYP2D6 CYP3A4	Brak wpływu	844 mg katechin	14 dni	Badanie kliniczne	Donovan i wsp., 2004b
CYP1A2 CYP2D6 CYP2C9	Brak wpływu	800 mg EGCG	4 tyg.	Badanie kliniczne	Chow i wsp., 2006
CYP3A4	Nieznaczne hamowanie	800 mg EGCG	4 tyg.	Badanie kliniczne	Chow i wsp., 2006
CYP2B1 CYP2E1	Brak wpływu	2%	7 tyg.	<i>In vivo</i>	Sohn i wsp., 1994
CYP1A1/2	Indukcja	2%	7 tyg.	<i>In vivo</i>	Sohn i wsp., 1994
CYP2D CYP3A	Brak wpływu	0,1%	4 tyg.	<i>In vivo</i>	Maliakal i Wanwimolruk, 2001
CYP1A2	Indukcja	2%	4 tyg.	<i>In vivo</i>	Maliakal i wsp., 2001
CYP1A1	Indukcja	2,5%	4 tyg.	<i>In vivo</i>	Niwattisaiwong i wsp., 2004
CYP1A2	Brak wpływu	2,5%	4 tyg.	<i>In vivo</i>	Niwattisaiwong i wsp., 2004

W niniejszej pracy analizowano także techniką rt-PCR poziom ekspresji PXR i CAR pod wpływem stosowanej diety wzbogaconej o ekstrakt z *C. sinensis* (300 mg/kg p.o.), w celu podjęcia próby określenia ich działania w regulacji transkrypcji CYP3A4. Na podstawie uzyskanych wyników badań wykazano nieznaczny wzrost ilości cDNA w komórkach wątroby dla PXR o wartość około 20% po 3 dniach ($p > 0,05$), natomiast po 10 dniach eksperymentu nie zanotowano znaczących zmian w poziomie transkryptu receptora, bowiem różnica względem grupy kontrolnej osiągnęła w przybliżeniu 10% ($p < 0,05$). W przypadku CAR po 3 dniach w komórkach wątroby zaobserwowano nieznaczne podwyższenie ilości mRNA dla tego receptora o wartość 17% ($p > 0,05$). Konsekwencją przedłużenia okresu podawania zielonej herbaty zanotowano natomiast znamiennej statystycznie wzrost poziomu transkryptu CAR o 77% względem próby niepoddanej procedurze eksperymentalnej (Tabela 42). Dotychczas jednak jest brak doniesień odnośnie wpływu ekstraktu z *C. sinensis* na aktywność receptorów jądrowych CAR i PXR uczestniczących w regulacji CYP3A4, mimo iż istnieją sugestie, że związki farmakologicznie aktywne zawarte w preparatach roślinnych mogą stanowić potencjalne ligandy dla aktywności PXR i CAR.

5.3. Znaczenie molekularne podłoża interakcji preparatów roślinnych z lekami syntetycznymi

Poznanie molekularnego podłoża interakcji preparatów roślinnych z lekami syntetycznymi ma istotne znaczenie dla współczesnej farmakoterapii, w celu zminimalizowania ryzyka wystąpienia działań niepożądanych, w szczególności podczas stosowania terapii wielolekowej. Zrozumienie właściwości farmakokinetycznych stosowanych leków syntetycznych i preparatów pochodzenia roślinnego w leczeniu wielu chorób zwłaszcza w okresie starczym, stwarza realną szansę na eliminację interakcji pomiędzy związkami farmakologicznie aktywnymi, co pozwoli zwiększyć bezpieczeństwo zarówno farmakoterapii jak i fitoterapii. Z dostępnych danych bibliograficznych wynika, że coraz więcej wiadomo jest na temat interakcji leku roślinnego z lekiem syntetycznym, mimo to wiedza ta jest jeszcze stosunkowo niewielka. Wskazuje to na potrzebę dalszych badań w tym zakresie, ponieważ informacje o przypadkach tych interakcji nie zawsze przekładają się na faktyczny stan wiedzy i niekiedy pozbawione są szczegółowej analizy czynników, m.in. składu preparatu ziołowego, czasu stosowania, dawkowania, które mogą istotnie wpływać na profil interakcji lekowych [Williamson, 2005; Hu i wsp., 2005]. W tym celu

proceeds intensive preclinical and clinical studies aimed at determining the effect of plant extracts on the expression of CYP450 enzymes responsible for drug biotransformation in the liver. The best studied extract in terms of the relationship between the plant extract and the synthetic drug is St. John's wort (*H. perforatum*), which interacts with various synthetic drugs, especially with antidepressants. In view of this, there is a need for further clinical studies allowing for the determination of the effect of plant extracts and synthetic drugs belonging to different therapeutic groups on each other in terms of possible interactions, which may affect the pharmacological effect of the administered drugs. The above statement also applies to preparations from *G. biloba* interacting with acetylcholinesterase inhibitors and preparations based on *V. officinalis* interacting with synthetic sedatives and tranquilizers.

In view of this, one of the aspects of safe pharmacotherapy and its effectiveness is the knowledge of the molecular mechanism of interaction between synthetic drugs and plant preparations. The most difficult to verify are studies on the biotransformation of xenobiotics in the I phase of their metabolism, which proceeds with the participation of CYP450 enzymes, whose expression can be modulated by pharmacologically active substances contained in commonly used plant raw materials, such as: *H. perforatum*, *V. officinalis*, *E. purpurea*, *A. sativum*, *C. sinensis*, *P. ginseng*, *G. biloba* and *G. max*. In view of the above suggestion, in the present doctoral thesis the influence of both synthetic reference substances and standardized plant extracts on the expression of CYP2D2 and CYP3A1 enzymes was determined in order to determine the potential effect of the studied plant preparations on the metabolism of drugs administered clinically, which are their substrates. The results obtained in the presented work indicated the effect of the studied substances on the activity of CYP2D2 and CYP3A1 enzymes and the studied plant extracts in the regulation of the expression of the studied genes. The analysis of the effect of the standardized extract of *E. purpurea* in a dose of 50mg/kg p.o. showed a significant decrease in the amount of CYP3A1 transcript after 10 days of administration of the preparation. A similar effect for this gene was obtained in the case of administration of *H. perforatum* (300mg/kg p.o.) and *C. sinensis* (300mg/kg p.o.). In addition, a decrease in the level of CYP3A1 transcription was observed both after 3 and 10 days after administration of *G. max* (100mg/kg p.o.), *A. sativum* (250 mg/kg p.o.) and *P. ginseng* (30 mg/kg p.o.). Administration of the extract of *G. biloba* in a dose of 200 mg/kg for 3 days

powodowało nieznaczne zwiększenie ilości mRNA CYP3A1, przy czym zmiana ta wnioskowała o braku istotnego wpływu na metabolizm leków będących substratami tej izoformy, ponieważ wydłużenie okresu stosowania tego ekstraktu nie wywoływało istotnych statystycznie zmian w poziomie ekspresji tego genu. W związku z powyższymi wynikami uzyskanymi w niniejszej pracy sugeruje się, że modulacja ilości transkryptu izoformy CYP3A1 może zostać uznana za przejaw zmian aktywności badanego enzymu, co jest ściśle związane z jego udziałem w metabolizmie stosowanych klinicznie leków. Redukcja ilości mRNA CYP3A4 w ludzkich komórkach wątroby może wiązać się z obniżoną efektywnością biotransformacji leków poprzez wydłużenie ich biologicznego czasu półtrwania, zmniejszeniem klirensu, co niesie ryzyko wystąpienia działań niepożądanych. Zwiększenie aktywności tego enzymu wiąże się z obniżeniem stężenia przyjmowanych leków, skróceniem biologicznego czasu półtrwania a więc ze zmniejszeniem efektywności terapeutycznej stosowanych leków.

W przypadku CYP2D2, spadek ilości transkryptu tej izoformy zaobserwowano po 3 jak i 10 dniach podawaniu *P. ginseng* (30 mg/kg p.o.), wnioskując o zmniejszonym klirensie leków stosowanych łącznie z żeń-szeniem a będące substratami tego enzymu. Pozostałe preparaty roślinne nie wykazywały natomiast istotnych zmian w poziomie ekspresji CYP2D2, co sugerowało, iż przyjmowanie ich wraz z lekami syntetycznymi będącymi substratami tej izoformy w terapii kojarzonej nie powoduje zmian w parametrach farmakokinetycznych stosowanych leków syntetycznych. Jednakże rezultaty uzyskane w pracy wymagają potwierdzenia w dalszych badaniach mających na celu określenia wpływu analizowanych ekstraktów na aktywność enzymów CYP2D2 i CYP3A1, jak również oszacowania potencjalnego działania aktywnych farmakologicznie związków zawartych w tych ekstraktach na ich aktywność na poziomie białka w zależności od dawki i czasu podawania z uwzględnieniem substratów będących markerami ich aktywności, przy jednoczesnej analizie czynników transkrypcyjnych biorących udział w regulacji tych izoform. Taka analiza pozwoli wówczas uzyskać istotne informacje, które będą pomocne w wyjaśnianiu molekularnego podłoża powstawania interakcji preparat roślinny - lek syntetyczny.

Z przeglądu literaturowego wynika, iż rezultaty różnych prac badawczych wykazują wpływ różnych czynników na aktywność analizowanych izoform, m.in. skład preparatu, rodzaj ekstraktu, jak również zależność efektu od dawki i czasu. Jednak istotne w tej kwestii

jest pełne sprecyzowanie i potwierdzenie uzyskanych wyników, aby w pełni przewidzieć potencjalne interakcje w zależności od składu, dawki i czasu podawania preparatów.

W prezentowanej pracy analizowano także wpływ standaryzowanych ekstraktów na poziom ekspresji PXR i CAR, uczestniczące w regulacji CYP3A1. W oparciu o uzyskane wyniki wykazano znaczny wzrost poziomu ekspresji konstytutywnego receptora androstanu po 10 dniach zastosowania *H. perforatum*, *G. max*, *V. officinalis*, *P. ginseng* oraz *C. sinensis*. Podawanie ekstraktu *E. purpurea* wywołało natomiast nieznaczne, statystycznie podwyższenie ilości transkryptu analizowanego receptora zarówno po 3 jak i 10 dniach względem grupy kontrolnej. W przypadku stosowania ekstraktu *A. sativum* zaobserwowano niewielki wzrost stężenia cDNA dla CAR w komórkach wątroby podczas trwania całego eksperymentu. W związku z tym na podstawie uzyskanych wyników postuluje się pewną zależność pomiędzy spadkiem poziomu ekspresji CYP3A1 a wzrostem ilości transkryptu dla konstytutywnego receptora androstanu. Jedynie w przypadku czosnku zaobserwowano brak powiązania pomiędzy obniżeniem poziomu mRNA CYP3A1 a nieznacznym wzrostem ilości cDNA w komórkach wątroby, co sugerowało, że związki aktywne zawarte w tym ekstrakcie mogą wiązać się z receptorem jako odwracalny agonista bądź antagonist. Ponadto, wyniki analiz tkanki wątrobowej zwierząt wykazały brak znaczących różnic w poziomie transkryptu CAR pod wpływem preparatu *G. biloba*, mimo iż po wydłużeniu eksperymentu zaobserwowano niewielki spadek poziomu ekspresji badanego receptora o wartość 12% ($p < 0,05$). Podobny efekt w przypadku stosowania powyższego preparatu uzyskano dla CYP3A1, gdzie również nie wykazano istotnych zmian w poziomie ekspresji. Wnioskowano wówczas o braku wpływu powyższego ekstraktu *G. biloba* na poziom transkrypcji CYP3A1 i CAR, sugerując iż preparat o takim samym składzie chemicznym i czasie podawania może być bezpieczny w przypadku jego łącznego stosowania z lekami syntetycznymi. Na podstawie analizy wyników pracy w oparciu o wykorzystane substancje wzorcowe wykazano również, że deksametazon będący silnym induktorem CYP3A1 powodował spadek poziomu ekspresji CAR, natomiast ketokonazol stanowiący inhibitor powyższej izoformy powodował wzrost ilości transkryptu konstytutywnego receptora androstanu. W oparciu o przeprowadzone wyniki analiz wykazano odwrotną zależność pomiędzy poziomem ekspresji CYP3A1 a CAR względem stosowanych substancji modelowych, jak również w odniesieniu do stosowanych ekstraktów. Na tej podstawie można wnioskować w niniejszej pracyo funkcjonowaniu odwracalnego antagonizmu kompetycyjnego w ramach mechanizmu regulacji aktywności CYP3A1 poprzez konstytutywny receptor androstanu.

W przypadku analizy PXR w odniesieniu do substancji wzorcowych wykazano, że deksametazon jako silny induktor aktywności CYP3A1 powodował jedynie po 4 dniach stosowania znamienne statystycznie obniżenie poziomu mRNA dla PXR o 20%, natomiast ketokonazol będący inhibitorem tej izoformy nie wywołał zmian w poziomie ekspresji receptora pregnanu X. Podobny rezultat badań zanotowano względem ekstraktów: *E. purpurea*, *G. max* oraz *G. biloba*, gdzie wykazano brak istotnych zmian w ilości transkryptu dla PXR. W przypadku stosowania *H. perforatum*, *V. officinalis*, *P. ginseng*, *A. sativum* oraz *C. sinensis* zanotowano po 3 dniach nieznaczny wzrost poziomu mRNA dla tego receptora, natomiast wydłużenie czasu eksperymentu wywołało podwyższenie ilości transkryptu jedynie pod wpływem podawania ekstraktu z żeń-szenia. Należy podkreślić także, iż stosowanie przez 10 dni czosnku powodowało spadek poziomu ekspresji dla badanego receptora pregnanu X, przy czym podobny rezultat uzyskano dla izoenzymu CYP3A1, co sugeruje o potencjalnym wpływie związków biologicznie czynnych zawartych w tym ekstrakcie na receptor pregnanu X w pełnieniu funkcji odwracalnych agonistów. Ponadto, na podstawie uzyskanych wyników odnośnie regulacji transkrypcji CYP3A1, nie wykazano zależności pomiędzy poziomem ekspresji CYP3A1 a PXR, w związku z tym można wnioskować o pośrednim mechanizmie regulacji PXR poprzez receptor glukokortykoidowy lub też poprzez inny endogeny mechanizm regulacji, np. poprzez wpływ HNF4 α , który również może potencjalnie regulować aktywność PXR.

W związku z powyższym, wymagane są dalsze badania w tym kierunku w celu pełniejszego scharakteryzowania wpływu tych ekstraktów a w szczególności ich związków aktywnych na poziom ekspresji analizowanych powyżej receptorów jądrowych, jak również innych czynników transkrypcyjnych zaangażowanych w proces regulacji badanych izoform CYP450. Analiza taka pozwoli wówczas na lepsze poznanie molekularnego mechanizmu powstawania potencjalnych interakcji pomiędzy preparatami roślinnymi a lekami syntetycznymi, a tym samym pozwoli wyeliminować lub zminimalizować ryzyko wystąpienia działań niepożądanych w wyniku stosowania terapii skojarzonej. Ma to istotne znaczenie kliniczne zarówno dla bezpieczeństwa stosowanej terapii, jak również w zwiększeniu efektywności terapeutycznej stosowanych leków.

6. WNIOSKI

- W badaniu wykazano wpływ powszechnie stosowanych substancji roślinnych na aktywność enzymów CYP3A1 i CYP2D2 uczestniczących w I fazie biotransformacji leków. Uzyskane wyniki wskazują na redukcję ilości mRNA CYP3A1 (po podaniu *E. purpurea*, *H. perforatum*, *C. sinensis*, *V. officinalis*, *G. max*, *A. sativum* i *P. ginseng*) oraz CYP2D2 (po podaniu *P. ginseng*) w modelu *in vivo* sugerując, iż izoforma CYP3A1 jest bardziej wrażliwa niż CYP2D2 na stymulację substancjami naturalnymi. Wyniki badania sugerują, że podobny efekt może dotyczyć homologicznych ludzkich izoform CYP3A4 i CYP2D6, co może być przyczyną zmian parametrów farmakokinetycznych leków będących substratami tych izoform, zwiększając ryzyko wystąpienia działań niepożądanych związanych z obniżoną efektywnością biotransformacji.
- Odwrotna zależność pomiędzy ilością transkryptu CYP3A1 a poziomem ekspresji czynnika transkrypcyjnego CAR wykazuje, że proces regulacji transkrypcji CYP3A1 poprzez konstytutywny receptor androstanu przebiega na zasadzie odwracalnego antagonizmu kompetycyjnego.
- Brak korelacji pomiędzy poziomem ekspresji czynnika transkrypcyjnego PXR a CYP3A1 sugeruje, iż na poziomie molekularnym modulacja ekspresji tej izoformy przy udziale PXR ma miejsce na drodze pośredniej poprzez receptor glukokortykoidowy lub poprzez inny endogeny mechanizm regulacji.

7. STRESZCZENIE

Enzymy z nadrodziny cytochromu P450 (CYP450) są hemoproteinami, które odgrywają ważną rolę w biotransformacji leków stosowanych klinicznie oraz innych ksenobiotyków. Wykazują aktywność monooksygenaz o niskiej specyficzności substratowej, posiadając zdolność do metabolizowania zróżnicowanych strukturalnie substancji egzogennych. Enzymy CYP450 biorą również udział w metabolizmie i biosyntezie endogennych związków, takich jak witaminy, hormony steroidowe, kwasy żółciowe i cholesterol. Podrodziny CYP2C, CYP2D i CYP3A są odpowiedzialne głównie za biotransformację leków, natomiast podrodziny CYP1A, CYP2A i CYP2E katalizują metaboliczną aktywację wielu substancji o charakterze protoksyn oraz prokancerogenów do ich końcowych, reaktywnych metabolitów, które mogą inicjować chemiczną karcenogenezę. CYP3A4 jest najbardziej aktywną izoformą cytochromu P450 biorącą udział w biotransformacji ponad 50% leków stosowanych klinicznie. Enzym ten ulega silnej ekspresji w wątrobie oraz jelicie cienkim, gdzie mają miejsce głównie procesy detoksykacji leków. Indukcja ekspresji CYP3A4 podlega regulacji poprzez receptory jądrowe, takie jak receptor pregnanu X (PXR), konstytutywny receptor androstanu (CAR) oraz pośrednio poprzez receptor glukokortykoidowy (GR). Isoforma CYP2D6 jest odpowiedzialna za biotransformację ponad 25% leków obecnych na rynku farmaceutycznym. Podobnie do CYP3A4, izoforma ta ulega ekspresji w wątrobie, ale w mniejszym stopniu stanowiąc w przybliżeniu 4% całkowitej frakcji białka mikrosomalnego CYP450. Sugeruje się, iż hepatocytowy czynnik jądrowy 4 α (HNF4 α) kontroluje konstytutywny poziom ekspresji genu CYP2D6, jednakże dane odnośnie regulacji transkrypcji tego genu przez powyższy receptor są nieliczne a mechanizm działania HNF4 α słabo poznany.

Szereg badań donosi, iż zarówno inhibicja jak i indukcja enzymów CYP450 może prowadzić do różnic osobniczych w ich aktywności metabolicznej, co może mieć potencjalny wpływ na toksyczność i skuteczność stosowanych leków. Zmiany aktywności cytochromu P450 mogą mieć istotne znaczenie kliniczne, szczególnie w przypadku leków o wąskim współczynniku terapeutycznym. Podwyższony poziom aktywności enzymów CYP450 może powodować spadek stężenia leku w osoczu do poziomu subterapeutycznego i zniesienia efektu farmakologicznego, natomiast spadek ich aktywności może prowadzić do wzrostu

poziomu leku w osoczu, co przekłada się na ryzyko jego działań niepożądanych i możliwość przedawkowania. Wiele preparatów roślinnych, które są często stosowane w prewencji chorób cywilizacyjnych jak również w wspomaganiu terapii lekiem syntetycznym, mogą modulować aktywność enzymów CYP450 i powodować interakcje.

Celem niniejszej pracy było określenie potencjalnego wpływu standaryzowanych ekstraktów roślinnych na poziom ekspresji genów CYP3A1 i CYP2D2 związanych z biotransformacją leków w oparciu o model zwierzęcy. Eksperyment przeprowadzono na szczurach rasy Wistar, którym podano przez okres 3 i 10 dni wyciągi roślinne (*Hypericum perforatum*, *Valeriana officinalis*, *Echinacea purpurea*, *Allium sativum*, *Camellia sinensis*, *Panax ginseng*, *Gingko biloba*, *Glycine max*). Oprócz aktywności CYP3A1 i CYP2D2, oszacowano również profil ilości mRNA dla PXR i CAR, biorących udział w regulacji transkrypcji. Poziom ekspresji mRNA w tkance wątrobowej analizowano za pomocą techniki PCR w czasie rzeczywistym z użyciem barwnika fluorescencyjnego SYBR Green I.

W badaniu wykazano statystycznie istotny spadek poziomu ekspresji CYP3A1 po 10 dniach stosowania standaryzowanych ekstraktów z *E. purpurea* (43%, $p < 0,001$), *H. perforatum* (22%, $p = 0,009$) i *C. sinensis* (38%, $p < 0,001$) względem grupy kontrolnej. Zaobserwowano, że poziom ekspresji mRNA dla genu CYP3A1 uległ również redukcji zarówno po 3 jak i 10 dniach podawania ekstraktów *G. max* (35%, $p = 0,021$; 36%, $p < 0,001$), *A. sativum* (30%, $p = 0,064$; 42%, $p < 0,001$) oraz *P. ginseng* (58%, $p < 0,001$; 30%, $p < 0,001$). W przypadku CYP2D2, aktywność tego genu była hamowana istotnie statystycznie przez *P. ginseng* (36%, $p < 0,001$; 20%, $p < 0,001$). Wykazano również indukcję poziomu ekspresji czynnika CAR po zastosowaniu *H. perforatum* (73%, $p = 0,015$), *G. max* (75%, $p = 0,837$), *V. officinalis* (68%, $p = 0,023$), *P. ginseng* (88%, $p < 0,001$), *C. sinensis* (77%, $p < 0,001$) i *E. purpurea* (60%, $p = 0,033$). W przypadku PXR nie zaobserwowano natomiast znaczących zmian w poziomie ekspresji tego genu względem grupy kontrolnej.

Na podstawie uzyskanych wyników sugeruje się, iż standaryzowane ekstrakty roślinne mogą obniżać aktywność CYP3A1 i CYP2D2, a tym samym uczestniczyć w klinicznie znaczących interakcjach z lekami metabolizowanymi przez powyższe enzymy. W związku tym zmiany w aktywności enzymów CYP450 mogą być pomocne w określaniu ryzyka indukcji interakcji z lekami syntetycznymi. Ponadto, postuluje się, iż ekspresja CYP3A1 może podlegać regulacji poprzez kostytutywny receptor androstanu w oparciu o antagonizm kompetytywny, jak również pośrednio przez receptor pregnanu X.

Badanie to miało charakter skriningowy i wykazało, że aktywność enzymu CYP3A1 zmienia się pod wpływem substancji naturalnych sugerując, iż izoforma ta jest bardziej wrażliwa niż CYP2D2 na stymulację preparatami roślinnymi. Stąd, przeprowadzenie dalszych badań *in vivo* odnośnie potencjalnego wpływu ekstraktów roślinnych na aktywność CYP450 i ich czynników transkrypcyjnych może być pomocne dla przewidzenia wyników badań klinicznych i oceny bezpieczeństwa farmakoterapii.

8. SUMMARY

Evaluation of the effects of herbal medicines on the gene expression levels of CYP3A1 and CYP2D2 *in vivo*

The human cytochrome P450 (CYP450) enzymes comprise a superfamily of hemoproteins that play an important role in the oxidative metabolism of clinically used drugs and other xenobiotics. The principle function of CYP450 enzymes is the monooxygenation of a vast number of structurally diverse xenobiotic. They are also responsible for metabolic conversion of various endogenous compounds, such as steroid hormones, bile acids, vitamins, fatty acids and prostaglandins. The CYP2C, CYP2D and CYP3A subfamilies are mainly involved in the metabolism of drugs whereas the CYP1A, CYP2A and CYP2E subfamilies metabolize many protoxins and procarcinogens to their ultimate reactive metabolite which can initiate chemical carcinogenesis. The CYP3A4 isoform is the most active CYPs responsible for biotransformation of more than 50% of clinically used drugs. The CYP3A4 enzyme is highly expressed in the liver accounting for 30% of total hepatic CYP content as well as a small intestine that is the tissues most involved in drug metabolism. The induction of its expression is regulated by the nuclear receptors, such as pregnane X receptor (PXR), constitutive androstane receptor (CAR) but also indirectly by the glucocorticoid receptor (GR). The CYP2D6 isoform is involved in the biotransformation over 25% of therapeutic drugs on the market at present. Similar to CYP3A4, this enzyme is also expressed in the liver but at a low level accounting for approximately 4% of total CYP. It is suggested that a hepatic nuclear factor 4 α (HNF4 α) controls the constitutive level of CYP2D6 gene expression. However, the data regarding the regulation of CYP2D6 transcription by the above receptor are very limited and the mechanism of HNF4 α action is poorly understood.

Several studies have reported that inhibition and induction of these enzymes can result in interindividual differences in metabolic activity and can have the potential influence on the toxicity and efficacy of used drugs. Changes in cytochrome P450 activity may have the particular importance in the clinic, especially in case of synthetic drugs with a low

therapeutic index. Because elevated CYP450 activities may cause a decrease in drug plasma concentrations to subtherapeutic levels and total loss of the pharmacological effect whereas decrease of their activities may result in a rise in plasma drug levels leading to an undesirable pharmacological effect and the appearance of toxic symptoms of overdose. Many herbal medicines that are often used in prevention of civilization diseases as well as an additive co-medication during therapy with synthetic drugs, can modulate the activities of cytochrome P450 enzymes and cause interactions with conventional drugs.

The aim of this study was to determine the potential influence of standardized herbal extracts on the gene expression levels of CYP3A1 and CYP2D2 involved in drug biotransformation by using animal model. The experiment was carried out on male Wistar rats that were given 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. Moreover, it was also assess the profile of the mRNA abundance of CAR and PXR responsible for transcriptional regulation of CYP3A1 gene. The level of mRNA expression in the rat liver tissues was analyzed by real-time quantitative PCR method using a SYBR Green I dye.

The results of the study demonstrated statistically significant decrease of CYP3A1 expression level after application of standardized extracts of *E. purpurea* (43%, $p < 0,001$), *H. perforatum* (22%, $p = 0,009$) and *C. sinensis* (38%, $p < 0,001$) once daily for 10 consecutive days. The level of mRNA expression of CYP3A1 was also reduced both after 3 and 10 days of extracts treatment, such as *G. max* (35%, $p = 0,021$; 36%, $p < 0,001$), *A. sativum* (30%, $p = 0,064$; 42%, $p < 0,001$) and *P. ginseng* (58%, $p < 0,001$; 30%, $p < 0,001$). In case of CYP2D2, the activity of this gene was inhibited significant statistically by extract of *P. ginseng* (36%, $p < 0,001$; 20%, $p < 0,001$). Moreover, it was also shown induction of the CAR expression level after treatment of *H. perforatum* (73%, $p = 0,015$), *G. max* (75%, $p = 0,837$), *V. officinalis* (68%, $p = 0,023$), *P. ginseng* (88%, $p < 0,001$), *C. sinensis* (77%, $p < 0,001$) i *E. purpurea* (60%, $p = 0,033$). In case of PXR, there was not observed significant differences of expression level for this gene compared with the control group.

Based on these findings, it is suggested that standardized herbal extracts can decrease the activities of CYP3A1 as well as a CYP2D2 and may participate in clinically significant interactions with drugs metabolized by these enzymes. Hence, the changes of CYP450 enzyme activity could be helpful in determining the risk of induction of interactions with

synthetic drugs. Moreover, it is postulate that CYP3A1 expression can be regulated by constitutive androstane receptor based on competitive antagonism but also indirectly by pregnane X receptor.

The study has been used in the capacity of screening and shown that the activity of CYP3A4 enzyme changes under the influence of natural substances. It is suggested that this isoform is more sensitive than CYP2D2 and may be subject to stimulation by herbal medicines. Hence, further *in vivo* studies about the potential influence of herbal extracts on CYP450 activity and their transcription factors might be helpful for the prediction of the result of future clinical studies and the safety evaluation of pharmacotherapy.

9. LITERATURA

Abdel-Razzak Z, Loyer P, Fautrel A, Gautier J-C, Corcos L, Turlin B, Beaune P, Guillouzo A. Cytokines down-regulate expression of major cytochrome P-450 enzymes in adult human hepatocytes in primary culture. *Mol Pharmacol*. 1993; 44: 707-715.

Aiba T, Yoshinaga M, Ishida K, Takehara Y, Hashimoto Y. Intestinal expression and metabolic activity of the CYP3A subfamily in female rats. *Biol Pharm Bull*. 2005; 28: 311-315.

Aklillu E, Person I, Bertilsson L, Johansson I, Rodrigues F, Ingelman-Sundberg M. Frequent distribution of ultrarapid metabolizers of debrisoquine in an Ethiopian population carrying duplicated and multiduplicated functional cyp2d6 alleles. *J Pharmacol Exp Ther*. 1996; 278: 441-446.

Alexandrov K, Rojas M, Rolando C. DNA damage by benzo(a)pirene in human cells is increased by cigarette smoke and decreased by a filter containing rosemary extract, which lowers free radicals. *Cancer Res*. 2006; 66: 11938-11945.

Ameer B, Weintraub RA. Drug interactions with grapefruit juice. *Clin Pharmacokinet*. 1997; 23: 103-121.

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

Ang-Lee MK, Moss J, Yuan CS. Herbal medicines and perioperative care. *JAMA*. 2001; 286: 208-16.

Anglicheau D, Flamant M, Schlageter MH, Martinez F, Cassinat B, Beaune P, Legendre C, Thervet E. Pharmacokinetic interaction between corticosteroids and tacrolimus after renal transplantation. *Nephrol Dial transplant*. 2003; 18: 2409-2414.

Araya Z, Wikvall K. 6 α -hydroxylation of taurochenodeoxycholic acid and lithocholic acid by CYP3A4 in human liver microsomes. *Biochim Biophys Acta*. 1999; 1438: 47-54.

Arlotto MP, Sonderfan AJ, Klaassen CD, Pakinson A. Studies on the pregnenolone-16-carbonitrile-inducible form of rat liver microsomal cytochrome P-450 and UDP-glucuronosyltransferase. *Biochem Pharmacol*. 1987; 36: 3859-3866.

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: 331-7.

Asimus S, Elsherbiny D, Hai TN, Jansson B, Huong NV, Petzold MG, Simonsson US, Ashton M. Artemisinin antimalarials moderately affect cytochrome P450 enzyme activity in healthy subjects. *Fundam Clin Pharmacol*. 2007; 21: 307-316.

Awang DVC, Fugh-Berman A. Herbal interactions with cardiovascular drugs. *Cardiovasc Nurs*. 2002; 16: 64-70.

Ayalogu E, Snelling J, Lewis D, Talwar S, Clifford M, Ioannides C. Induction of hepatic CYP1A2 by the oral administration of caffeine to rats: lack of association with the Ah locus. *Biochim Biophys Acta*. 1995; 1272: 89-94.

- Bachmann KA, Lewis JD, Fuller MA, Bonfiglio MF. The Drug Interactions Handbook – The New Standard for Drug and Herbal Interactions. 2nd edition, Lexi-Comp, Inc, Hudson, Ohio 2004.
- Badyal DK, Dadhick AP. Cytochrome P450 and drug interactions. Indian J Pharmacol. 2001; 33: 248-259.
- Baes M, Gulick T, Choi H-S, Martinoli MG, Simha D, Moore DD. A new orphan member of the nuclear hormone receptor superfamily that interacts with a subset of retinoic acid response elements. Mol Cell Biol. 1994; 14: 1544-1551.
- Baldwin SJ, Bloomer JC, Smith GJ, Ayrton AD, Clarke SE, Chenery RJ. Ketoconazole and sulfaphenazole as the respective selective inhibitors of P4503A and 2C9. Xenobiotica. 1995; 25: 261-270.
- Baley DG, Malcolm J, Arnold O, Spence JD. Grapefruit juice-drug interactions. Br J Clin Pharmacol. 1998; 46: 101-110.
- Barwick JL, Quattrochi LC, Mills AS, Potenza C, Tukey RH, Guzelian PS. Trans-species gene transfer for analysis of glucocorticoid-inducible transcriptional activation of transiently expressed human CYP3A4 and rabbit CYP3A6 in primary cultures of adult rat and rabbit hepatocytes. Mol Pharmacol. 1996; 50: 10-16.
- Bauer R. Echinacea drugs –effects and active ingredients. Z Arztl Fortbild. 1996; 90: 111-115.
- Bernard S, Neville KA, Nguyen AT, Flockhart DA. Interethnic differences in genetic polymorphisms of CYP2D6 in the U.S. population: clinical implications. The Oncologist. 2006; 11: 126-135.
- Bernhard R. Cytochromes P450 as versatile biocatalysts. J Biotechnol. 2007; 124: 128-145.
- Bertilsson G, Heidrich J, Svensson K, Äsman M, Jendeberg L, Sydow-Bäckman M, Ohlsson R, Postlind H, Blomquist P, Berkenstam A. Identification of a human nuclear receptor defines a new signaling pathway for CYP3A induction. Proc Natl Acad Sci USA. 1998; 95: 12208-12213.
- Bertz RT, Granneman GR. Use of in vitro and in vivo data to estimate the likelihood of metabolic pharmacokinetic interactions. Clin Pharmacokinet. 1997; 32: 210-258.
- Beverage JN, Sissung TM, Sion AM, Danesi R, Figg WD. CYP2D6 polymorphism and the impact on tamoxifen therapy. J Pharm Sci. 2007; 96: 2224-2231.
- Bladt S, Wagner H. MAO- Hemmung durch Fraktionen und Inhaltsstoffe von Hypericum Extrakt. Nervenheilkunde. 1993; 12: 349-52.
- Blake MJ, Gaedigk A, Pearce RE, Bomgaars LR, Christensen ML, Stowe C, James LP, Wilson JT, Kearns GL, Leeder JS. Ontogeny of dextromethorphan O-N-demethylation in the first year of life. Clin Pharmacol Ther. 2007; 81: 510-516.
- Blecharz-Klin K, Piechal A, Pyrzanowska J, Widy-Tyszkiewicz E. Interakcje leków roślinnych stosowanych w chorobach układu oddechowego. Herba Polonica. 2005; 51, 3: 89-107
- Blumberg B, Sabbagh W, Juguilon H, Bolado J, van Meter CM, Ong ES, Evans RM. SXR, novel steroid and xenobiotic-sensing nuclear receptor. Genes Dev. 1998; 12: 3195-3205.

- Bon S, Hartmann K, Kubn M. Johanniskraut: Ein Enzyminduktor? Schweitzer Apothekerzeitung. 1999; 16: 535.
- Bourrié M, Meunier V, Berger Y, Fabre G. Cytochrome P450 isoform inhibitors as a tool for the investigation of metabolic reactions catalyzed by human liver microsomes. *J Pharmacol Exp Ther*. 1996; 277: 321-332.
- Breidenbach Y, Hoffmann MW, Becher T, Schlitt H, Klempnauer J. Drug interaction of St. John's wort with cyclosporin. *Lancet*. 2000; 355: 1912.
- Briggs WH, Xiao H, Parkin KL, Shen C, Goldman IL. Differential inhibition of human platelet aggregation by selected *Allium thiosulfonates*. *J Agric Food Chem*. 2000; 48: 5731-5735.
- Brosen K. Recent development in hepatic drug oxidation. Implications for clinical pharmacokinetics. *Clin Pharmacokinet*. 1990; 18: 220-239.
- Brown CM, Reisfeld B, Mayeno AN. Cytochrome P450 A structure – based summary of biotransformations using representative substrates. *Drug Metab Rev*. 2008; 40: 1-100.
- 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*. 1994; 15: 2575-2579.
- Budzinski JW, Foster BC, Vandenhoeck S, Arnason JT. An in vitro evaluation of human cytochrome P450 3A4 inhibition by selected commercial herbal extracts and tinctures. *Phytomed*. 2000; 7: 273-82.
- Burk O, Wojnowski L. Cytochrome P450 3A and their regulation. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2004; 369: 105-124.
- Burstein AH, Horton RL, Dunn T, Alfaro RM, Piscitelli SC, Theodore W. Lack of effect of St John's Wort on carbamazepine pharmacokinetics in healthy volunteers. *Clin Pharmacol Ther*. 2000; 68: 605-612.
- Butterweck V, Bockers T, Korte B, Wittkowski W. Long-term effects of St. John's wort and hypericin on monoamine levels in rat hypothalamus and hippocampus. *Brain Res*. 2002a; 930: 21-29.
- Butterweck V, Nahrstedt A, Evans J, Hufeisen S, Rauser L, Savage J, Popadak B, Ernsberger P, Roth BL. In vitro receptor screening of pure constituents of St. John's wort reveals novel interactions with a number of GPCRs. *Psychopharmacology*. 2002b; 162(2): 193-202.
- Bylund J, Zhang C, Harder DR. Identification of a novel cytochrome P450, CYP4X1, with unique localization specific to the brain. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002; 296: 677-684.
- Cairns W, Smith CA, McLaren AW, Wolf CR. Characterization of the human cytochrome P4502D6 promoter. A potential role for antagonistic interactions with multiple genes. *Pharmacogenetics*. 1996; 9: 697-706.
- Cambria-Kiely JA. Effect of soy milk on warfarin efficacy. *Ann Pharmacother*. 2002; 36:1893-1896.
- Cantoni L, Rozio M, Mangolini A, Hauri L, Caccia S. Hyperforin contributes to the hepatic CYP3A-inducing effect of *Hypericum perforatum* extract in the mouse. *Toxicol Sci*. 2003; 75: 25-30.

- Caracao Y. Genetic determinants of drug responsiveness and drug interactions. *Ther Drug Monit.* 1998; 20: 517-524.
- Chang TK, 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.* 2006; 34: 234-242.
- Chang TKH, Yu L, Maurel P, Waxman DJ. Enhanced cyclophosphamide and ifosfamide activation in primary human hepatocyte cultures: response to cytochrome P-450 inducers and autoinduction by oxazaphosphorines. *Cancer Res.* 1997; 57: 1946-1954.
- Chawla A, Repa JJ, Evans RM, Mangelsdorf DJ. Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. *Science.* 2001; 294: 1866-1870.
- Chicca A, Adinolfi B, Martinotti E, Fogli S, Breschi MC, Pellati F, Benvenuti S, Nieri P. Cytotoxic effects of Echinacea root hexanic extracts on human cancer cell lines. *J Ethnopharmacol.* 2007; 110: 148-153.
- Choi MH, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Characterization of testosterone 11 beta-hydroxylation catalyzed by human liver microsomal cytochromes P450. *Drug Metab Dispos.* 2005; 33: 714-718.
- Chow HHS, Hakim IA, Vining DR, Crowell JA, Cordova CA, Chew WM, Xu MJ, Hsu ChH, Ranger-Moore J, Alberts DS. Effects of repeated green tea catechin administration on human cytochrome P450 activity. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006; 15: 2473-2476.
- Chow T, Hiroi T, Imaoka S, Chiba K, Funae Y. Isoform-selective metabolism of mianserin by cytochrome P450 2D. *Drug Metab Dispos.* 1999; 27: 1200-1204.
- Chung I, Bresnick E. Regulation of the constitutive expression of the human CYP1A2 gene: cis elements and their interactions with proteins. *Mol Pharmacol.* 1995; 47: 677-685.
- Clark DWJ. Genetically determined variability in acetylation and oxidation: therapeutics implications. *Drugs.* 1985; 29: 342-375.
- Cook CS, Zhang L, Osis J, Schoenhard GL, Karim A. Mechanism of compound – and species – specific food effects of structurally related antiarrhythmic drugs, disopyramide and bidisomide. *Pharm Res.* 1998; 15: 429-433.
- Costa LG, Steardo L, Cuomo V. Structural effects and neurofunctional sequelae of developmental exposure to psychoterapeutic drugs: experimental and clinical aspects. *Pharmacological Rev.* 2004; 56: 103-147.
- Crespi CL, Penman BW, Gelboin HV, Gonzalez FJ. A tobacco smoke derived nitrosamine, 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butone (NNK), is activated by polymorphic human cytochrome P4502D6 (CYP2D6). *Carcinogenesis.* 1991; 12: 1197-1201.

- Currier NL, Miller SC. Echinacea purpurea and melatonin augment natural-killer cells in leukemic mice and prolong life span. *J Altern Complement Med.* 2001; 7: 241-251.
- Currier NL, Miller SC. Natural killer cells aging mice treated with extracts from Echinacea purpurea are quantitatively and functionally rejuvenated. *Exp Gerontol.* 2000; 35: 627-639.
- Dailly E, Tribut O, Tattevin P, Arvieux C, Perre P, Raffi F, Jolliet P. Influence of tenofovir, nevirapine and efavirenz on ritonavir-boosted atazanavir pharmacokinetics in HIV-infected patients. *Eur J Clin Pharmacol.* 2006; 62: 523-526.
- Dalen P, Dahl ML, Andersson K, Bertilsson L. Inhibition of debrisoquine hydroxylation with quidine in subjects with three or more functional CYP2D6 genes. *J Clin Pharmacol.* 1999; 49: 180-184.
- Dalvi RR. Alterations in hepatic phase I and phase II biotransformation enzymes by garlic oil in rats. *Toxicol Lett.* 1992; 60: 299-305.
- Darwish M, Kirby M, Robertson P, Hellriegel ET. Interaction profile of armodafinil with medications metabolized by cytochrome P450 enzymes 1A2, 3A4 and 2C19 in healthy subjects. *Clin Pharmacokinet.* 2008; 47: 61-74.
- de Wildt SN, Kearns GL, Leeder JL, van der Anker JN. Cytochrome P450 3A. *Clin Pharmacokinet.* 1999; 37: 485-505.
- Degtyarenko KN, Archakov AI. Molecular evolution of P450 superfamily and P450-containing monooxygenase systems. *FEBS Lett.* 1993; 332: 1-8.
- Denison MS, Whitlock JPJ. Xenobiotic-inducible transcription of cytochrome P450 genes. *J Biol Chem.* 1995; 270: 18175-18178.
- Desai PB, Nallani SC, Sane RS, Moore LB, Goodwin BJ, Buckley DJ, Buckley AR. Induction of cytochrome P450 3A4 in primary human hepatocytes and activation of the human pregame X receptor by tamoxifen and 4-hydroxytamoxifen. *Drug Metab Dispos.* 2002; 30: 608-12.
- 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.
- Dingemans J, van Giersbergen PL. Clinical pharmacology of bosentan, a dual endothelin receptor antagonist. *Clin Pharmacokinet.* 2004; 43: 1089-1115.
- 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: 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: 906-908.
- Dostalek M, Pistovcakova J, Jurica J, Tomandl J, Linhart I, Sulcova A, Hadasova E. Effect of St John's wort (*Hypericum perforatum*) on cytochrome P450 activity in perfused rat liver. *Life Sci.* 2005; 78: 239-244.

- Dresser GK, Schwarz UI, Wilkinson GR, Kim RB. Coordinate induction of both cytochrome P4503A and MDR1 by St John's wort in healthy subjects. *Clin Pharmacol Ther.* 2003; 73: 41-50.
- Duke J. *CRC Handbook of medicinal herbs.* Boca Raton, FL: CRC Press, 1985; 503-504.
- Duret C, Daujat-Chavanieu M, Pascussi JM, Pichard-Garcia L, Balaguer P, Fabre JM, Vilarem MJ, Maurel P, Gerbal-Chaloin S. Ketoconazole and miconazole are antagonists of the human glucocorticoid receptor: Consequences on the expression and function of the constitutive androstane receptor and the pregnane X receptor. *Mol Pharmacol.* 2006; 70: 329-339.
- Durr D, Stieger B, Kullak-Ublick GA, Rentsch KM, Steinert HC, Meier PJ, Fattinger K. St John's Wort induces intestinal P-glycoprotein/MDR1 and intestinal and hepatic CYP3A4. *Clin Pharmacol Ther.* 2000; 68: 598-604.
- Dussalt I, Lin M, Hollister K, Wang EH, Synold TW, Forman BM. Peptide mimetic HIV protease inhibitors are ligands for the orphan receptor SXR. *J Biol Chem.* 2001;276: 33309-33312.
- Edwards DJ, Bellevue FH, Woster PM. Identification of 6',7'-dihydroxybergamottin, a cytochrome P-450 inhibitor, in grapefruit juice. *Drug Metab Dispos.* 1996; 24: 1287-1290.
- Eichelbaum M. Defective oxidation of drugs. Pharmacokinetics implications. *Clin Pharmacokinet.* 1982; 7: 1-22.
- Eich-Höchli D, Oppliger R, Golay KP, Baumann P, Eap CB. Methadone maintenance treatment and St. John's Wort - a case report. *Pharmacopsychiatry.* 2003; 36: 35-37.
- Ekins S, Erickson JA. A pharmacophore for human pregnane X receptor ligands. *Drug Metab Dispos.* 2002; 30: 96-99.
- Ekins S, Ring BJ, Grace J. Present and future in vitro approaches for drug metabolism. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2000; 44: 313-324.
- Eliasson E, Mkrtchian S, Halpert J, Ingelman-Sundberg M. Substrate-regulated, cAMP-dependent phosphorylation, denaturation, and degradation of glucocorticoid-inducible rat liver cytochrome P450 3A1. *J Biol Chem.* 1994; 269(28): 18378-18383.
- 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.
- Evans WE, Relling MV. Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science.* 1999; 286: 487-491.
- Felix CA, Walker AH, Lange BJ, Williams TM, Winick NJ, Cheung NV, Lovett BD, Nowell PC, Blair IA, Rebbeck TR.. Association of CYP3A4 genotype with treatment-related leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95: 13176-13181.
- Fellay J, Marzolini C, Decosterd L, Golay KP, Baumann P, Buclin T, Telenti A, Eap CD. Variations of CYP3A activity induced by antiretroviral treatment in HIV-1 infected patients. *Eur J Clin Pharmacol.* 2005; 60: 865-873.

- Fisher CD, Augustine LM, Maher JM, Nelson DM, Slitt AL, Klaassen CD, Lehman – McKeeman LD, Cherrington NJ. Induction of Drug-Metabolizing Enzymes by Garlic and Allyl Sulfide Compounds via Activation of Constitutive Androstane Receptor and Nuclear Factor E2-Related Factor 2. *Drug Metab Dispos.* 2007; 35: 995-1000.
- Fisher S, Beuers U, Spengler U, Zwiebel FM, Koebe HG. Hepatic levels of bile acids in end –stage chronic cholestatic liver disease. *Clin Chim Acta.* 1996; 251: 173-86.
- Fitzsimmons ME, Collins JM. Selective biotransformation of the human immunodeficiency virus protease inhibitor saquinavir by human small-intestinal cytochrome P450 3A4: potential contribution to high first-pass metabolism. *Drug Metab Dispos.* 1997; 25: 256-266.
- Flockhart DA, Tanus-Santos JE. Implications of cytochrome P450 interaction when prescribing medication for hypertension. *Arch Intern Med.* 2002; 162: 405.
- Forman BM, Tzamei I, Choi HS, Chen J, Simha D, Seol W, Evans RE, Moore DD. Androstane metabolites bind to and deactivate the nuclear receptor CAR- β . *Nature.* 1998. 395: 612-615.
- Foster BC, Foster MS, Vandenhoeck S, Kranis A, Budzinski JW, Arnason JT, Gallicano KD, Choudri S. An in vitro evaluation of human cytochrome P450 3A4 and P-glycoprotein inhibition by garlic. *J Pharm Pharm Sci.* 2001; 4: 176-184.
- Foster BC, Vandenhoeck S, Hana J, Krantis A, Akhtar MH, Bryan M, Budzinski JW, Ramputh A, Arnason JT. *In vitro* inhibition of human cytochrome P450-mediated metabolism of marker substrates by natural products. *Phytomedicine.* 2003; 10: 334-342.
- Foti RS, Wahlstrom JL. The role of dietary supplements in cytochrome P450-mediated drug interactions. *BLACPMA.* 2008; 7: 66-84.
- Frank D, Jachde U, Fuhr U. Evaluation of probe drugs and pharmacokinetic metrics for CYP2D6 phenotyping. *Eur J Clin Pharmacol.* 2007; 63: 321-333.
- Freedman LP. Anatomy of the steroid receptor zinc finger region. *Endocrine Rev.* 1992; 13: 129-145.
- Freeman C, Spelman K. A critical evaluation of drug interactions with *Echinacea* spp. *Mol. Nutr. Food Res.* 2008; 52: 789-798.
- Frye RF, Matzke GR, Adedoyin A, Porter JA, Branch RA. Validation of the five-drug “Pittsburgh cocktail” approach for assessment of selective regulation of drug-metabolizing enzymes. *Clin Pharmacol Ther.* 1997; 62: 365-376.
- 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.
- Gallicano K, Foster B, Choudhri S. Effect of short-term administration of garlic supplements on single-dose ritonavir pharmacokinetics in healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol.* 2003; 55: 199-202.

- Gan XH, Zhang L, Heber D, Bonavida B. Mechanism of activation of human peripheral blood NK cells at the single cell level by Echinacea water soluble extracts: Recruitment of lymphocyte-target conjugates and killer cells and activation of programming for lysis. *Int. Immunopharmacol.* 2003; 3: 811-824.
- 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, 318:1072-1078.
- Gawrońska – Szklarz B. Inhibitory reduktazy (HMG-CoA) – biochemiczne mechanizmy działania. *Przewodnik Lekarza*, 2000; 7: 42-49.
- Ged C, Rouillon JM, Pichard L, Combalbert J, Bressot N, Bories P, Michel H, Beaune P, Maurel P. The increase in urinary excretion of 6 β -hydroxycortisol as a marker of human hepatic cytochrome P450III A induction. *Br J Clin Pharmacol.* 1989; 28: 373-387.
- Gerber NC, Sligar SG. Catalytic mechanism of cytochrome P450: evidence for distal charge relay. *J Am Chem Soc.* 1992; 114: 8742-8743.
- Gilani AH, Khan AU, Subhan F, Khan M. Antispasmodic and bronchodilator activities of St John's wort are putatively mediated through dual inhibition of calcium influx and phosphodiesterase. *Fundam Clin Pharmacol.* 2005; 19: 695-705.
- Gisolf EH, van Heeswijk RP, Hoetelmans RW, Danner SA. Decreased exposure to saquinavir in HIV-1-infected patients after long-term antiretroviral therapy including ritonavir and saquinavir. *AIDS.* 2000; 14: 801-805.
- Glass CK, Rosenfeld MG. The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev.* 2000; 14: 121-141.
- Główczyńska R, Opolski G. Beta adrenolityki. *Terapia.* 2005, 9: 30.
- Goasduff T, Dreano Y, Guillois B, Mendez J, Berthou F. Induction of liver and kidney CYP1A1/1A2 by caffeine in rat. *Biochem Pharmacol.* 1996; 52: 1915-9.
- 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.
- Goodwin B, Hodgson E, Liddle C. The orphan human pregnane X receptor mediates the transcriptional activation of CYP3A4 by rifampicin through a distal enhancer modulate. *Mol Pharmacol.* 1999; 56: 1329-1339.
- Goodwin B, Moore LB, Stoltz CM, McKee DD, Kliewer SA. Regulation of the human CYP2B6 gene by the nuclear pregnane X receptor. *Mol Pharmacol.* 2001; 60: 427-31.
- Gorlewska K, Mazerska Z, Sowiński, Konopa J. Products of metabolic activation of the antitumor drug Ledakrin (Nitracrine) in vitro. *Chem Res Toxicol.* 2001; 14: 1-10.
- Gorski JC, Huang SM, Pinto A, Hamman MA, Hilligoss JK, Zaheer NA, Desai M, Miller M, Hall SD. The effect of echinacea (Echinacea purpura root) on cytochrome P 450 activity in vivo. *Clin Pharmacol Ther.* 2004; 75: 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 Molke LL. In vitro interactions of water-soluble garlic components with human cytochromes P450. *J Nutr.* 2006; 136: 806S-809S.
- Guengerich FP, Vaz ADN, Raner GN, Pernecky SJ, Coon J. Evidence for a role of a perferryl-oxygen complex, FeO^{3+} , in the N-oxygenation of amines by cytochrome P450 enzymes. *Mol Pharmacol.* 1997a; 51: 147-51.
- Guengerich FP. Comparisons on catalytic selectivity of cytochrome P450 subfamily enzymes from different species. *Chem Biol Interact.* 1997b; 106: 161-82.
- Guengerich FP. Cytochrome p450 and chemical toxicology. *Chem Res Toxicol.* 2008; 21: 70-83.
- Guengerich FP. Cytochrome P-450 3A4: regulation and role in drug metabolism. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1999; 39: 1-17.
- Guengerich FP. Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. *Chem Res Toxicol.* 2000a; 14: 611-50.
- Guengerich FP. Metabolism of chemical carcinogens. *Carcinogenesis.* 2000b; 21: 345-351.
- Guengerich FP. Human cytochrome P450 enzymes, W: Ortiz de Montellano PR (red) *Cytochrome P450: Structure mechanism and biochemistry*, ed by, Kluwer Academic Publishers, New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow. 2005; 377-530.
- 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: 276-287.
- Gurley BJ, Gardner SF, Hubbard MA, Williams DK, Gentry WB, Carrier J, Khan IH, 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: 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.
- Guyonnet D, Belloir C, Suschetet M, Siess MH, Le Bon AM. Liver subcellular fractions from rats treated by organosulfur compounds from Allium modulate mutagen activation. *Mut Res.* 2000; 466: 17-26.
- Haber D, Siess MH, Canivenc-Lavier MC, Le Bon AM, Suschetet M. Differential effects of dietary diallyl sulfide and diallyl disulfide on rat intestinal and hepatic drug-metabolizing enzymes. *J Toxicol Environ Health.* 1995; 44: 423-434.

- Haber D, Siess MH, De Waziers I, Beaune P, Suschetet M. Modification of hepatic drug-metabolizing enzymes in rat fed naturally occurring allyl sulphides. *Xenobiotica*. 1994; 24: 169-182.
- Hakkola J, Raunio H, Purkunen R, Saarikoski S, Vahakangas K, Pelkonen O, Edwards RJ, Boobis AR, Pasanen M. Cytochrome P450 3A expression in the human fetal liver: evidence that CYP3A5 is expressed in only a limited number of fetal livers. *Biol Neonate*. 2001; 80: 193-201.
- Halpert JR. Multiplicity of steroid-inducible cytochrome P-450 in rat liver microsomes. *Arch Biochem Biophys*. 1998; 263: 59-68.
- Hara H, Adachi T. Contribution of hepatocyte nuclear factor-4 to down-regulation of CYP2D6 gene expression by nitric oxide. *Mol Pharmacol*. 2002; 61: 194-200.
- 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.
- Hebert MF, Park JM, Chen YL, Akhtar S, Larson AM. Effects of St. John's wort (*Hypericum perforatum*) on tacrolimus pharmacokinetics in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol*. 2004; 44: 89-94.
- Hecht SS. Biochemistry, biology, and carcinogenicity of tobacco-specific *N*-nitrosamines. *Chem Res Toxicol*. 1998; 11: 559-603.
- Hellum BH, Nilsen OG. The in vitro inhibitory potential of trade herbal products on human CYP2D6-mediated metabolism and the influence of ethanol. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. 2007; 101: 350-358.
- 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: 209-214.
- Hennessy M, Kelleher D, Spiers JP, Barry M, Kavanagh P, Back D, Mulcahy F, Feely J. St John's Wort increases expression of P-glycoprotein: implications for drug interactions. *Br J Clin Pharmacol*. 2002; 53: 75-82
- Hermann P, Morselli PL. Pharmacokinetics of diltiazem and other calcium entry blockers. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)*. 1985; 57: 10-20.
- Hewitt NJ. Primary hepatocytes: current understanding of the regulation of metabolic enzymes transporter proteins and pharmaceutical practice for the use of hepatocytes in metabolism, enzymes induction, transporter clearance, and hepatotoxicity studies. *Drug Metab Rev*. 2007; 39: 159-234.

- Hines RN, McCarver DG. The ontogeny of human drug-metabolizing enzymes: phase I oxidative enzymes. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002; 300: 355-60.
- Hiroi T, Chow T, Imaoka S, Funae Y. Catalytic specificity of CYP2D isoforms in rat and human. *Drug Metab Dispos.* 2002; 30: 970-976.
- Hiroi T, Imaoka S, Chow T, Funae Y. Tissue distributions of CYP2D1, 2D2, 2D3 and 2D4 mRNA in rats detected by RT-PCR. *Biochim Biophys Acta.* 1998; 1380: 305-312.
- Honkakoski P, Negishi M. Regulatory DNA elements of phenobarbital-responsive cytochrome P450 CYP2B genes. *J Biochem Toxicol.* 1998; 12: 3-9.
- Honkakoski P, Negishi M. Regulation of cytochrome P450 (CYP) genes by nuclear receptors. *Biochem J.* 2000; 347: 321-337.
- Honkakoski P, Zelko I, Sueyoshi T, Negishi M. The nuclear orphan receptor CAR-retinoid X receptor heterodimer activates the phenobarbital-responsive enhancer module of the CYP2B gene. *Mol Cell Biol.* 1998; 18: 5652-5658.
- Hryciak EG, Bandiera SM. Cytochrome P450 Enzymes. In: Gad SC (ed) *Preclinical development handbook. ADME and biopharmaceutical properties.* Wiley, New York. 2008.
- 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.* 2001; 61: 2163-2175.
- 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.
- Huang Y, Chan NW, Lau CW, Yao XQ, Chan FL, Chen ZY. Involvement of endothelium/nitric oxide in vasorelaxation induced by purified green tea (-)epicatechin. *Biochim Biophys Acta.* 1999; 1427: 322-328.
- Huynh HT, Teel RW. Effects of plant-derived phenols on rat liver cytochrome P450 2B1 activity. *Anticancer Res.* 2002; 22(3): 1699-1703.
- Ikenaga Y, Fukuda T, Fukuda K, Nishida Y, Naohara M, Maune H, Azuma J. The frequency of candidate alleles for CYP2D6 genotyping in the Japanese population with an additional respect to the -1584C to G substitution. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2005; 20, 113-116.
- Imaoka S, Yamada T, Hiroi T, Hayashi K, Sakaki T, Yabusaki Y, Funae Y. Multiple forms of human P450 expressed in *Saccharomyces cerevisiae*, systematic characterization and comparison with those of the rat. *Biochem Pharmacol.* 1996; 51: 1041-1050.
- Ingelman-Sundberg M. Pharmacogenetics: an opportunity for safer and more efficient pharmacotherapy. *J Int Med.* 2001; 250: 186-200.
- Ingelman-Sundberg M. The human genome project and novel aspects of cytochrome P450 research. *Toxicol Appl Pharmacol Ther.* 2005a; 207: 52-56.
- Ingelman-Sundberg M. Genetic polymorphism of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity. *The Pharmacogenomics Journal.* 2005b; 5: 6-13

- Ingelman-Sundberg M, Daly AK, Nerbert DW. 2007a, Home Page of the Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Committee, <http://www.cypalleles.ki.se/> accessed 28 October 2008.
- Ingelman-Sundberg M, Oscarson M, McLellan RA. Polymorphic human cytochrome P450 enzymes; an opportunity for individualized drug treatment. *Trends Pharmacol Sci.* 1999; 20: 342-349.
- Ingelman-Sundberg M, Sim SC, Gomez A, Rodriguez-Antona C. Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: pharmacogenetic, pharmacoeepigenetic and clinical aspects. *Pharmacol Ther.* 2007b; 116: 496-526.
- Isin EM, Guengerich FP. Complex reactions catalyzed by cytochrome P450 enzymes. *Biochim Biophys Acta.* 2007; 1770: 314-329.
- Izzo AA, Ernst E. Interactions between herbal medicines and prescribed drugs: a systematic review. *Drugs.* 2001; 61: 2163-2175.
- Jager W, Sartori M, Herzog W, Thalhammer T. Genistein metabolism in liver microsomes of Wistar and mutant TR(-) rats. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol.* 1998; 100: 105-116.
- Jakovljevic V, Popovic M, Mimica-Dukic N, Sabo A, Gvozdenovic L. Pharmacodynamic study of *Hypericum perforatum* L. *Phytomedicine.* 2000; 7: 449-53.
- Jiang X, Williams KW, Liauw WS, Ammit AJ, Roufogalis BD, Duke CC, Day RO, McLachlan AJ. Effect of St John's wort and ginseng on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of warfarin in healthy subjects. *Br J Clin Pharmacol.* 2004; 57: 592-599.
- Jin JX, Baillie TA. Metabolism of the chemoprotective agent diallyl sulfide to glutathione conjugates in rats. *Chem Res Toxicol.* 1997; 10: 318-327.
- Johansson I, Lundqvist E, Bertilsson L, Dahl ML, Sjöqvist F, Ingelman-Sundberg M. Inherited amplification of an active gene in the cytochrome P450 CYP2D locus as a cause of ultrarapid metabolism of debrisoquine. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993; 90: 11825-11829.
- Johne A, Schmider J, Brockmoller J, Stadelmann AM, Stormer E, Bauer S, Scholler G, Langheinrich M, Roots I. Decreased plasma levels of amitriptyline and its metabolites on comedication with an extract from St. John's wort (*Hypericum perforatum*). *J Clin Psychopharmacol.* 2002; 22: 46-54.
- Johnson EF. Structural diversity of human xenobiotic-metabolizing cytochrome P450 monooxygenases. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 338: 331-36.
- Jones SA, Moore LB, Shenk JL, Wisely GB et al. The pregnane X receptor: a promiscuous xenobiotic receptor that has diverged during evolution. *Mol Endocrinol.* 2000; 14: 27-39.
- Kageyama M, Namiki H, Fukushima H, Ito Y, Shibata N, Takada K. In vivo effect of cyclosporin A and ketoconazole on the pharmacokinetics of representative substrates for P-Glycoprotein and cytochrome P450 (CYP) 3A in rats. *Biol Pharm Bull.* 2005; 28: 316-322.
- Kast HR, Goodwin B, Tarr PT, Jones SA. Regulation of multidrug resistance-associated protein 2 (ABCC2) by the nuclear receptors pregnane X receptor, farnesoid X-activated receptor, and constitutive androstane receptor. *J Biol Chem.* 2002; 277: 2908-2915.

- Kawamoto T, Sueyoshi T, Zelko I, Moore R, Washburn K, Negishi M. Phenobarbital-responsive nuclear translocation of the receptor CAR in induction of the CYP2B gene. *Mol Cell Biol.* 1999; 19: 6318-6322.
- Kawana K, Ikuta T, Kabayashi Y, Gotoh O, Takeda K, Kawajiri. Molecular mechanism of nuclear translocation of an orphan nuclear receptor, SXR. *Mol Pharmacol.* 2003; 63: 524-531.
- Kee V. Drug interactions literature, adverse drug reaction literature. ADR reporting. 15.04.2003. In: Dyderski S, Jabłeczka A. Działania niepożądane leków jako istotny problem farmakoterapii. *Nowiny Lekarskie.* 2004; 73: 50-53.
- Kim HJ, Chung 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: 415-418.
- Kishida T, Nagamoto M, Ohtsu Y, Watakabe M, Ohshima D, Nashiki K, Mozushige T, Izumit 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: 508-515.
- Kishimoto R, Ueda M, Yoshinaga H, Goda K, Park SS. Combined effects of ethanol and garlic on hepatic ethanol metabolism in mice. *J Nutr Sci Vitaminol.* 1999; 45: 275-286.
- Kitada M, Kamataki T. Cytochrome P450 in human fetal liver: significance and fetal-specific expression. *Drug Metab Rev.* 1994; 26: 305-323.
- Kliwer SA, Goodwin B, Willson TM. The nuclear pregnane X receptor: a key regulator of xenobiotic metabolism *Endocr Rev.* 2002; 23: 687-702.
- Kobayashi K, Sueyoshi T, Inoue K, Moore R, Negishi M. Cytoplasmic accumulation of the nuclear receptor CAR by a tetratricopeptide repeat protein in HepG2 cells. *Mol Pharmacol.* 2003; 64: 1069-1075.
- Kobayashi K, Urashima K, Shimada N, Chiba K. Substrate specificity for rat cytochrome P450 (CYP) isoforms: Screening with cDNA-expressed systems of the rat. *Biochem Pharmacol.* 2002; 63: 889-96
- Kobayashi S, Murray S, Watson D, Sesardic D, Davies DS, Boobis AR. The specificity of inhibition of debrisoquine 4-hydroxylase activity by quinidine and quinine in the rat is the inverse of that in man. *Biochem Pharmacol.* 1989; 38: 2795-99.
- Kocarek TA, Schuetz EG, Strom SC, Fisher RA, Guzelian PS. Comparative analysis of cytochrome P4503A induction in primary cultures of rat, rabbit, and human hepatocytes. *Drug Metab Dispos.* 1995; 23: 415-21.
- Kolars JC, Schmiedlin-Ren P, Schuetz JD, Fang C, Watkins PB. Identification of rifampicin-inducible P450IIA4 (CYP3A4) in human small bowel enterocytes. *J Clin Invest.* 1992; 90: 1871-1878.
- Komisja E. Monografia: Ginseng radix. Bundesanzeiger nr 11 z 17.01.1991. W: Rośliny Lecznice 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: 512-518.
- Kopij M, Rapak A. Rola receptorów jądrowych w procieśie śmierci komórek. *Postepy Hig Med Dośw.* 2008; 62: 571-581.
- Koyano S, Kurose K, Saito Y, Ozawa S, Hasegawa R, Komamura K, Ueno K, Kamakura S, Kitakaze M, Nakajima T, Matsumoto K, Akasawa A, Saito H, Sawada J. Functional characterization of four naturally occurring variants of human pregnane X receptor (PXR): one variant causes dramatic loss of both DNA binding activity and the transactivation of the CYP3A4 promoter/enhancer region. *Drug Metab Dispos.* 2004; 32: 149-54.
- Koytchev R, Alken RG, Vlahov V, Kirkov V, Kaneva R, Thyroff-Friesinger U, Rehak E. Influence of cytochrome P4502D6*4 allele on the pharmacokinetics of controlled-release metoprolol. *Eur J Clin Pharmacol.* 1998; 54: 469-474.
- Kroemer HK, Eichelbaum M. Molecular basis and clinical consequences of genetic cytochrome P-4502D6 polymorphism. *Life Sci.* 1995; 56: 2285-98.
- Krug B. Herbal products may alter drug metabolism. 25 April 2009; dane nieopublikowane; [<http://www.science.uwaterloo.ca/WWSEF/09Awards/09KrugReport.pdf>].
- Kuehl P, Zhang J, Lin Y, Lamba J, Assem M, Schuetz J, Watkins PB, Daly A, Wrighton SA, Hall SD, Maurel P, Relling M, Brimer C, Yasuda K, Venkataramanan R, Strom S, Thummel K, Boguski MS, Schuetz E. Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nat Genet.* 2001; 27: 383-91.
- 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.* 2004a; 82: 57-64.
- Kuypers DR, Claes K, Evenepoel P, Maes B, Coosemans W, Pirenne J, Vanrenterghem Y. Time-related clinical determinants of long-term tacrolimus pharmacokinetics in combination therapy with mycophenolic acid and corticosteroids: a prospective study in one hundred de novo renal transplant recipients. *Clin Pharmacokinet.* 2004; 43: 741-762.
- Lamb DC, Waterman MR, Kelly SL, Guengerich FP. Cytochromes P450 and drug discovery. *Curr Opin Biotechnol.* 2007; 18: 504-512.
- Lardy H, Thomas M, Noordine ML, Bruneau A, Cherbuy C, Vangelade P, Philippe C, Colomb V, Duee PH. Changes induced in colonocytes by extensive intestinal resection in rats. *Dig Dis Sci.* 2006; 51: 326-332.
- Laroche M, Choudhri S, Gallicano K, Foster B. Severe gastrointestinal toxicity with concomitant ingestion of ritonavir and garlic. In: Program and Abstracts of the Canadian Association for HIV Research Seventh Annual Canadian Conference on HIV/AIDS. 1998 Apr 30-May 3. Quebec City, Canada. 1998: Abstract 471P.
- Laurenzana EM, Weis CC, Bryant CW, Newbold R, Delclos KB. Effect of dietary administration of genistein, nonylphenol or ethinyl estradiol on hepatic testosterone metabolism, cytochrome P-450 enzymes, and estrogen receptor alpha expression. *Food Chem Toxicol.* 2002; 40: 53-63.

- Lautraite S, Musonda AC, Doehmer J, Edwards GO, Chipman JK. Flavonoids inhibit genetic toxicity produced by carcinogens in cells expressing CYP1A2 and CYP1A1. *Mutagenesis*. 2002; 17: 45-53.
- Lazarou J, Pomeranz BH, Corey PN. Incidence of adverse drug reactions in hospitalized patients: a meta-analysis of prospective studies. *JAMA*. 1998; 279: 1200-1205.
- Lefebvre T, Foster BC, Drouin CE, Krantis A, Livesey JF, Jordan SA. In vitro activity of commercial valerian root extracts against human cytochrome P450 3A4. *Pharm Pharm Sci*. 2004; 7: 265-273.
- Lehmann JM, McKee DD, Watson MA, Willson TM, Moore JT, Kliewer SA. The human orphan nuclear receptor PXR is activated by compounds that regulate CYP3A4 gene expression and cause drug interactions. *J Clin Invest*. 1998; 102: 1016-1023.
- Lersch C, Zeuner M, Bauer A, Siebenrock K, Hart R, Wagner F, Fink U, Dancygier H, Classen M. Stimulation of the immune response in outpatients with hepatocellular carcinomas by low doses of cyclophosphamide (LDCY), echinacea purpurea extracts (Echinacin) and thymostimulin. *Arch Geschwulstforsch*. 1990; 60: 379-783.
- 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 T, Chiang JY. Rifampicin induction of CYP3A4 requires pregnane X receptor cross talk with hepatocyte nuclear factor 4 α and coactivators, and suppression of small heterodimer partner gene expression. *Drug Metab Dispos*. 2006; 34: 756-764.
- Li Y, Ross-Viola JS, Shay NF, Moore DD, Ricketts ML. Human CYP3A4 and murine CYP3A11 are regulated by equol and genistein via the pregnane X receptor in a species-specific manner. *J Nutr*. 2009; 139: 898-904.
- Li Y, Shay NF. Isoflavone-drug interactions in HepG2 cells and human hepatocytes. *FASEB J*. 2004; 18: 851.
- Lim TS, Na K, Choi EM, Chung JY, Hwang JK. Immunomodulating activities of polysaccharides isolated from Panax ginseng. *J Med Food*. 2004; 7: 1-6.
- Liu DY, Yang M, Zhu HJ, Zheng YF and Zhu XQ. Human pregnane X receptor-mediated transcriptional regulation of cytochrome P450 3A4 by some phytochemicals. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2006; 35: 8-13.
- Liu SY, Gonzalez FJ. Role of the liver-enriched transcription factor HNF-1 α in expression of the CYP2E1 gene. *DNA Cell Biol*. 1995; 14: 285-293.
- Liu YT, Hao HP, Liu CX, Wang GJ, Xie HG. Drugs as CYP3A probes, inducers, and inhibitors. *Drug Metab Rev*. 2007; 39: 699-721.
- Loizou GD, Cocker J. The effects of alcohol and diallyl sulphide on CYP2E1 activity in humans: a phenotyping study using chlorzoxazone. *Human Exp Toxicol*. 2001; 20: 321-327.

Lown KS, Bailey DG, Fontana RJ, Janardan SK, Adair CH, Fortlage LA, Brown MB, Guo W, Watkins PB. Grapefruit juice increases felodipine oral availability in humans by decreasing intestine CYP3A4 protein expression. *J Clin Invest.* 1997; 99: 2545-2553.

Lu H, Meng X, Li C, Sang S, Patten C, Sheng S, Hong J, Bai N, Winnik B, Ho C-T, Yang CS. Glucuronides of tea catechins: enzymology of biosynthesis and biological activities. *Drug Metab Dispos.* 2003; 31: 452-461.

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.

Lund EG, Guileyardo JM, Russel DW. cDNA cloning of cholesterol 24-hydroxylase, a mediator of cholesterol homeostasis in the brain. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999; 96: 7238-7243.

Luo G, Guenther T, Gan LS, Humphreys WG. Cyp3A4 induction by xenobiotics: biochemistry, experimental methods and impact on drug discovery and development. *Curr Drug Metab.* 2004; 5: 483-505.

Madani S, Paine MF, Lewis L, Thummel KE, Shen DD. Comparison of CYP2D6 content and metoprolol oxidation between microsomes isolated from human livers and small intestines. *Pharm Res.* 1999; 16: 1199-1205.

Maglich JM, Parks DJ, Moore LB, Collins JL, Goodwin B, Billin AN, Stoltz CA, Kliewer SA, Lambert MH, Willson TM, Moore JT. Identification of a novel human constitutive androstane receptor (CAR) agonist and its use in the identification of CAR target genes. *J Biol Chem.* 2003; 278: 17277-17283.

Mai I, Bauer S, Perloff ES, Johne A, Uehleke B, Frank B, Budde K, Roots I. Hyperforin content determines the magnitude of the St John's wort-cyclosporine drug interaction. *Clin Pharmacol Ther.* 2004; 76: 330-340.

Mai I, Stormer E, Bauer S, Kruger H, Budde K, Roots I. Impact of St John's wort treatment on the pharmacokinetics of tacrolimus and mycophenolic acid in renal transplant patients. *Nephrol Dial Transplant.* 2003; 18: 819-822.

Maliakal PP, Coville PF, Wanwimolruk S. Tea consumption modulates hepatic drug metabolizing enzymes in Wistar rats. *J Pharm Pharmacol.* 2001; 53: 569-577.

Maliakal PP, Wanwimolruk S. Effect of herbal teas on hepatic drug metabolizing enzymes in rats. *J Pharm Pharmacol.* 2001; 53: 1323-1329.

Markowitz JS, DeVane CL, Boulton DW, Carson SW, Nahas Z, Risch SC. Effect of St. John's Wort (*Hypericum perforatum*) on cytochrome P450 2D6 and 3A4 activity in healthy volunteers. *Life Sci.* 2000; 66: 133-139.

Markowitz JS, Donovan JL, DeVane CL, Taylor RM, Ruan Y, Wang JS, Chavin KD. Effect of St. John's Wort on drug metabolism by induction of cytochrome P450 3A4 enzyme. *JAMA.* 2003a; 290: 1500-1504.

Markowitz JS, Donovan JL, DeVane CL, Sipkes L, Chavin KD. Multiple-dose administration of *Ginkgo biloba* did not affect cytochrome P450 2D6 or 3A4 activity in normal volunteers. *J Clin Psychopharmacol.* 2003b; 23: 576-581.

- 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.* 2003c; 74: 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.
- Mathijssen RHJ, Schaik RHN. Genotyping and fenotyping cytochrome P450: perspectives for cancer treatment. *Eur J Cancer.* 2006; 42: 141-148.
- Matsubara T, Kim HJ, Miyata M, Shimada M, Nagata K, Yamazoe Y. Isolation and characterization of a new major intestinal CYP3A form, CYP3A62, in the rat. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004; 309: 1282-1290.
- Matsumoto S, Hirama T, Matsubara T, Nagata K, Yamazoe Y. Involvement of CYP2J2 on the intestinal first-pass metabolism of antihistamine drug, astemizole. *Drug Metab Dispos.* 2002; 30: 1240-1245.
- Mazerska Z. Metabolism of chemical carcinogens, W: Baer-Dubowska W, Bartoszek A, Malejka-Giganti D (red.) *Carcinogenesis and Anticarcinogenic Food Components.* CRC Taylor & Francis Group, Boca Raton, London, New York, 2006; 37-68.
- McCoubrie M. Doctors as patients: lisinopril and garlic. *Br J Gen Pract.* 1996; 46: 107.
- McCune JS, Hawke RL, LeCluyse EL, Gillenwater HH, Hamilton G, Ritchie J, Lindley C. In vivo and in vitro induction of human cytochrome P4503A4 by dexamethasone. *Clin Pharmacol Ther.* 2000; 68: 356-66.
- Meijerman I, Beijnen JH, Schellens JHM. Herb-drug interactions in oncology: Focus on mechanisms of induction. *Oncologist.* 2006; 11: 742-752.
- Melchart D, Clemm C, Weber B, Draczynski T, Worku F, Linde K, Weidenhammer W, Wagner H, Saller R. Polysaccharides isolated from *Echinacea purpurea* herba cell cultures to counteract undesired effects of chemotherapy – a pilot study. *Phytother Res.* 2002; 16: 138-142.
- Melchart D, Linde K, Worku F, Sarkady L, Holzmann M, Jurcic K, Wagner H. Results of five randomized studies on the immunomodulatory activity of preparations of *Echinacea*. *J Altern Complement Med.* 1995; 1: 145-160.
- Mildvan D, Yarrish R, Marshak A, Hutman HW, McDonough M, Lamson M, Robinson P. Pharmacokinetic interaction between nevirapine and ethinyl estradiol/norethindrone when administered concurrently to HIV-infected women. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2002; 29: 471-477.
- Miller LG. Herbal medicinals: selected clinical considerations focusing on known or potential drug-herb interactions. *Arch Intern Med.* 1998; 158: 2200-2211.
- Mirkov S, Komorowski BJ, Ramirez J, Graber AY, Ratain MJ, Strom SC, Innocenti F. Effects of green tea compounds on irinotecan metabolism. *Drug Metab Dispos.* 2007; 35: 228-233.

- Miura Y, Chiba T, Tomita I, Koizumi H, Miura S, Umegaki K, Hara Y, Ikeda M, Tomita T. Tea catechins prevent the development of atherosclerosis in apoprotein E-deficient mice. *J Nutr.* 2001; 131: 27-32.
- Moore LB, Parks DJ, Jones SA, Bledsoe RK, Consler TG, Stimmel JB, Goodwin B, Liddle C, Blanchard SG, Wilson TM, Collins JL, Kliewer SA. Orphan nuclear receptors constitutive androstane receptor and pregnane X receptor share xenobiotic and steroid ligands. *J Biol Chem.* 2000a; 275: 15122-27.
- Moore LB, Goodwin B, Jones SA, Wisely GB, Serabjit-Singh CJ, Willson TM, Collins JL, Kliewer SA. St. John's wort induces hepatic drug metabolism through activation of the pregnane X receptor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000b; 97: 7500-7502.
- Moore LB, Maglich JM, McKee DD, Wisely GB, Willson TM, Kliewer SA, Lambert MH and Moore JT. Pregnane X receptor (PXR), constitutive androstane receptor (CAR), and benzoate X receptor (BXR) define three pharmacologically distinct classes of nuclear receptors. *Mol Endocrinol.* 2002; 16: 977-986.
- Moras D, Gronemeyer H. The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function. *Curr Opin Cell Biol.* 1998; 10: 384-391.
- Morel F, Beaune PH, Ratanasavanh D, Flinois JP, Yang CS, Guengerich FP, Guillouzo A. Expression of cytochrome P450 enzymes in cultured human hepatocytes. *Eur J Biochem.* 1990; 191: 437-444.
- Moreno SDN, Docampo R. Mechanism of toxicity of nitro compounds used in the chemotherapy of trichomoniasis. *Environmental Health Perspectives.* 1985; 64: 199-208.
- 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.
- Mouly S, Lown KS, Kornhauser D, Joseph JL, Fiske WD, Benedek IH, Watkins PB. Hepatic but not intestinal CYP3A4 display dose-dependent induction by efavirenz in humans. *Clin Pharmacol Ther.* 2002; 72: 1-9.
- Mouly SJ, Matheny C, Paine MF, Smith G, Lamba J, Lamba V, Pusek SN, Schuetz EG, Stewart PW, Watkins PB. Variation in oral clearance of saquinavir is predicted by CYP3A5*1 genotype but not by enterocyte content of cytochrome P450 3A5. *Clin. Pharmacol Ther.* 2005; 78: 605-618.
- Mrozkiewicz PM. Wyciąg z dziurawca zwyczajnego (*Hypericum perforatum*) – interakcje farmakologiczne. *Postępy Fitoterapii.* 2001; 7: 12-16.
- Müller WE, Singer A, Wonnemann M. Hyperforin--antidepressant activity by a novel mechanism of action. *Pharmacopsychiatry.* 2001; 34: 98-102.
- Mullins RJ, Heddle R. Adverse reactions associated with echinacea: the Australian experience. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2002; 88: 42-51.
- 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.

- Murase T, Nagasawa A, Suzuki J, Hase T, Tokimitsu I. Beneficial effects of tea catechins on diet-induced obesity: stimulation of lipid catabolism in the liver. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2002; 26: 1459-1464.
- Murataliev MB, Feyereisen R, Wlaker FA. Electron transfer by diflavin reductases. *Biochim Biophys Acta*. 2004; 1698: 1-26.
- Muto S, Fujita K, Yamazaki Y, Kamataki T. Inhibition by green tea catechins of metabolic activation of procarcinogens by human cytochrome P450. *Mutat Res*. 2001; 479: 197-206.
- Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Schafer-Korting M: *Farmakologia i toksykologia*. Wydawnictwo Medyczne Urban & Partner, Wrocław, 2004.
- Nebert D, Russel DW. Clinical importance of cytochrome P450. *Lancet*. 2002; 360: 1155-62.
- Negishi M. Nuclear receptor CAR as a Phenobarbital induction signal of CYP2B genes (abstract). 13th international Symposium on Microsomes and Drug Oxidations. 2000; 56.
- Nelson D. Cytochrome P450. 2008; Homepage. <http://drnelson.utmem.edu/CytochromeP450.html>.
- 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. *Pharmacokinetics*. 1996; 6: 1-42.
- Nelson DR. Location of all human P450s and their pseudogenes. <http://drnelson.utmem.edu/human.genecount.html>.
- Nishikawa M, Ariyoshi N, Kotani A, Ishii I, Nakamura H, Nakasa H, Ida M, Nakamura H, Kimura N, Kimura M, Hasegawa A, Kusu F, Ohmori S, Nakazawa K, Kitada M. Effects of continuous ingestion of green tea or grape seed extracts on the pharmacokinetics of midazolam. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2004; 19: 280-289.
- Nishimura M, Naito S, Yokoi T. Tissue-specific mRNA expression profiles of human nuclear receptor subfamilies. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2004; 19: 135-149.
- 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: 43-56.
- Nöldera M, Chatterje S. Effects of two different extracts of St. John's wort and some of their constituents of cytochrome P450 of activities in rat liver microsomes. *Pharmacopsychiatry*. 2001; 34: 108-110.
- 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.
- Ohnishi N, Kusuhara M, Yoshioka M, Kuroda K, Soga A, NishikawaF, Koishi T, Nakagawa M. Studies on interactions between functional food or dietary supplements and medicines. I. Effect of Ginkgo biloba leaf extract on the pharmacokinetics of diltiazem in rats. *Biol Pharm Bull*. 2003; 26: 1315-1320.

- Ohyama Y, Meaney S, Heverin M, Ekström L, Brafman A, Shafir M, Andersson U, Olin M, Eggertsen G, Diczfalussy U, Feinstein E, Björkhem I. Studies on the transcriptional regulation of cholesterol 24-hydroxylase (CYP46A1): Marked insensitivity toward different regulatory axes. *J Biol Chem*. 2006; 281: 3810-2380.
- Okita RT, Masters BS. The Cytochrome P450. *Biotransformations*. 1998; 23: 981-997.
- Omiecinski CJ, Remmel R, Hosagrahara VP. Concise review of cytochrome P450s and their role in toxicology. *Toxicol Sci*. 1999; 48: 151-156.
- Osanai M, Petkovich M. Expression of the retinoic acid-metabolizing enzyme CYP26A1 limits programmed cell death. *Mol Pharmacol*. 2005; 67: 1808-1817.
- Ourlin JC, Lasserre F, Pineau T, Fabre JM, Sa-Cunha A, Maurel P, Vilarem MJ, Pascussi JM. The small heterodimer partner interacts with the pregnane X receptor and represses its transcriptional activity. *Mol Endocrinol*. 2003; 17: 1693-1703.
- 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.
- Paine MF, Hart HL, Ludington SS, Haining RL, Rettie AE, Zeldin DC. The human intestinal cytochrome P450 "pie". *Drug Metab Dispos*. 2006; 34: 880-886.
- Pascussi JM, Drocourt L, Fabre JM, Maurel P, Vilarem MJ. Dexamethasone induces pregnane X receptor and retinoid X receptor- α expression in human hepatocytes: synergistic increase of CYP3A4 induction by pregnane X receptor activators. *Mol Pharmacol*. 2000a; 58: 361-372.
- Pascussi JM, Gerbal-Chaloin S, Pichard-Garcia L, Daujat M, Fabre J-M, 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*. 2000b; 274: 707-713.
- Pascussi JM, Gerbal-Chaloin S, Fabre JM, Maurel P, Vilarem MJ. Dexamethasone enhances constitutive androstane receptor expression in human hepatocytes: consequences on cytochrome P450 gene regulation. *Mol Pharmacology*. 2000c; 58: 1441-1450.
- Pascussi JM, Jounaidi Y, Drocourt L, Domergue J, Balabaud C, Maurel P, Vilarem MJ. Evidence for the presence of a functional pregnane X receptor response element in the CYP3A7 promoter gene. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999; 260: 377-381.
- Pelkonen O, Raunio H. Metabolic activation of toxins: Tissue-specific expression and metabolism in target organs. *Environ Health Perspect*. 1997; 105: 767-774.
- Pelkonen O, Mäenpää J, Taavitsainen P, Rautio A, Raunio H. Inhibition and induction of human cytochrome P450 (CYP) enzymes. *Xenobiotica*. 1998; 28: 1203-1253.
- Pelkonen O, Turpeinen M, Hakkola J, Honkakoski P, Hukkanen J, Raunio H. Inhibition and induction of human cytochrome P450 enzymes: current status. *Arch Toxicol*. 2008; 82: 667-715.
- Perrot N, Nalpas B, Yang CS, Beaune PH. Modulation of cytochrome P450 isozymes in human liver, by ethanol and drug intake. *Eur J Clin Invest*. 1989; 19: 549-555.

- Perucca A, Gutmann H, Beglinger C, Drewe J. Gene Expression of CYP3A4, ABC-transporters (MDR1 and MRP1-MRP5) and hPXR in three different human colon carcinoma cell lines. *J Pharm Pharmacol*. 2003; 55: 59-66.
- Pichard – Garcia L, Pascussi JM, Maurel P. Carotenoids activate PXR and are inducers of CYP2B6 and CYP3A4 in human hepatocytes in primary culture (abstract). 13th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations. 2000; 195
- Pichard L, Fabre I, Daujat M, Domergue J, Joyeux H, Maurel P. Effect of corticosteroids on the expression of cytochrome P450 and on cyclosporin A oxidase activity in primary cultures of human hepatocytes. *Mol Pharmacol*. 1992; 41: 1047-1055.
- Piscitelli SC, Burstein AH, Welden N, Gallicano K, Fallon J. Garlic supplements decrease saquinavir plasma concentrations. In: 8th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections; 2001 Feb 4-8; Chicago, USA. 2001: Abstract 743.
- Piscitelli SC, Burstein AH, Welden N, Gallicano K, Fallon J. The effect of garlic supplements on the pharmacokinetics of saquinavir. *Clin Infect Dis*. 2002; 34: 234-8.
- Plant N. The human cytochrome P450 sub-family: Transcriptional regulation, inter-individual variation and interaction networks. *Biochim Biophys Acta*. 2007; 1770: 478-488.
- Potter SM, Baum JA, Teng H, Stillman RJ, Shay NF, Erdman JW. Soy protein and isoflavones: their effects on blood lipids and bone density in postmenopausal women. *Am J Clin Nutr*. 1998; 68: 1375-1379.
- Priori SG, Barhanin J, Hauer RN, Haverkamp W, Jongsma HJ, Kleber AG, McKenna WJ, Roden DM, Rudy Y, Schwartz K, Schwartz PJ, Towbin JA, Wilde A. Genetic and molecular basis of cardiac arrhythmias: on clinical managements parts I and II. *Circulation*. 1999; 99: 518-528.
- Purnapatre K, Khattar S, Saini KS. Cytochrome P450 in the development of target based anticancer drugs. *Cancer Lett*. 2008; 259: 1-15.
- Raner G, Cornelious S, Moulick K, Wang Y, Mortenson A, Cech NB. Effect of herbal products and their constituents on human cytochrome P450E1 activity. *Food Chem Toxicol*. 2007; 45: 2359-65.
- Raucy JL. Regulation of CYP3A4 expression in human hepatocytes by pharmaceuticals and natural products. *Drug Metab Dispos*. 2003; 31: 533-39.
- Rauth AM, Melo T, Misra V. Bioreductive therapies: an overview of drugs and their mechanism of action. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1998; 42: 755-762.
- Reay JL, Kennedy DO, Scholey AB. Single doses of Panax ginseng (G115) reduce blood glucose levels and improve cognitive performance during sustained mental activity. *J Psychopharmacol*. 2005; 19: 357-365.
- Rebbeck TR, Jaffe JM, Walker AH, Wein AJ, Malkowicz SB. Modification of clinical presentation of prostate tumors by a novel genetic variant in CYP3A4. *J Natl Cancer Inst*. 1998; 90: 1225-1229.

- Reed JR, Halenberg PF. Examining the mechanism of stimulation of cytochrome P450 by cytochrome b5: the effect of cytochrome b5 on the interaction between cytochrome P450 2B4 and P450 reductase. *J Inorg Biochem.* 2003; 97: 265-275.
- Reicks MM, Crankshaw DL. Modulation of rat hepatic cytochrome P-450 activity by garlic organosulfur compounds. *Nutr Cancer.* 1996; 25: 241-248.
- Rendic S. Summary information on human CYP enzymes: Human P450 metabolism. *Drug Metab Rev.* 2002; 34: 83-448.
- Rendic S, DiCarlo FJ. Human cytochrome P450 enzymes: a status report summarizing their reactions, substrates, inducers, and inhibitors. *Drug Metab Rev.* 1997; 29: 413-580.
- Reschly EJ, Krasowski MD. Evolution and function of the NR1I nuclear hormone receptor subfamily (VDR, PXR, and CAR) with respect to metabolism of xenobiotics and endogenous compounds. *Curr Drug Metab.* 2006; 7: 349-365.
- Rettie AE, Rettenmeier AW, Howald WN, Bailie TA. Cytochrome P450 catalyzed formation δ^4 -VPA, a toxic metabolite of valproic acid. *Science.* 1987; 235: 890-893.
- Richelson E. Pharmacokinetic drug interactions of new antidepressants: a review of the effects on the metabolism of other drugs. *Mayo Clin Proc.* 1997; 72: 835-847.
- Roberts ES, Vaz ADN, Coon MJ. Catalysis by cytochrome P450 of an oxidative reaction in xenobiotic aldehyde metabolism: with olefin formation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991; 88: 8963-8966.
- Roberts-Kirchoff ES, Crowley JR, Hollenberg PF, Kim H. Metabolism of genistein by rat and human cytochrome P450s. *Chem Res Toxicol.* 1999; 12: 610-616.
- Robertson GR, Farrell GC, Liddle C. Sexually dimorphic expression of rat CYP3A9 and CYP3A18 genes is regulated by growth hormone. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998; 242: 57-60.
- Roesler J, Emmendorffer A, Steinmuller C, Luettig B, Wagner H, Lohmann-Matthes ML. Application of purified polysaccharides to test subjects mediates activation of the phagocyte system. *Int J Immunopharmacol.* 1991; 13: 931-941.
- Ronis MJ, Chen Y, Jo CH, Simpson P, Badger TM. Diets containing soy protein isolate increase hepatic CYP3A expression and inducibility in weanling male rats exposed during early development. *J Nutr.* 2004; 134: 3270-3276.
- Rose KD, Croissant PD, Parliament CF, Levin MB. Spontaneous spinal epidural hematoma with associated platelet dysfunction from excessive garlic ingestion: a case report. *Neurosurgery.* 1990; 26: 880-882.
- Rosenfeld JM, Vargas R, Jr, Xiew W, Evans RM. Genetic profiling defines the xenobiotic gene network controlled by the nuclear receptor pregnane X receptor. *Mol Endocrinol.* 2003; 17: 1268-1282.
- Ross PH, Ciosek BG, Kallweit P, Kauczinski D, Hanstein WG. Formation of ligand and metabolite complexes as a means for selective quantitation of cytochrome P450 isozymes. *Biochem Pharmacol.* 1993; 45, 2239-2250.

- Rostami-Hodjegan A, Lennard MS, Woods HF, Tucker GT. Meta-analysis of studies of the CYP2D6 polymorphism in relation to lung cancer and Parkinson's disease. *Pharmacogenetics*. 1998; 8: 227-238.
- Rostami-Hodjegan A, Tucker GT. Simulation and prediction of in vivo drug metabolism in human populations from in vitro data. *Nat Rev Drug Discov*. 2007; 6:140-148.
- Roth SY, Denu JM, Allis CD. Histone acetyltransferases. *Annu Rev Biochem*. 2001; 70: 81-120.
- Rowland P, Blaney FE, Smyth MG, Jones JJ. Crystal structure of human Cytochrome P450 2D6. *J Biol Chem*. 2006; 281: 7614-7622.
- Ruckpaul K, Rein H, eds. *Principles, Mechanisms and Biological Consequences of Induction*. Taylor and Francis, London UK. 1990; 33.
- Ruschitzka F, Meier PJ, Turina M, Luscher TF, Noll G. Acute heart transplant rejection due to Saint John's wort. *Lancet*. 2000; 355: 548-549.
- Russell DW. Oxysterol biosynthetic enzymes. *Biochim Biophys Acta*. 2000; 1529: 126-135.
- Saarikoski ST, Sata F, Husgafvel-Pursiainen K, Rautalahti M, Haukka J, Impivaara O, Järvisalo J, Vainio H, Hirvonen A. CYP2D6 ultrarapid metabolizer genotype as a potential modifier of smoking behavior. *Pharmacogenetics*. 2000; 10: 5-10.
- 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, Inouye K. Practical application of mammalian cytochrome P450. *J Biosci Bioeng*. 2000; 90: 583-590.
- Sakuma T, Kawasaki Y, Jarukamjorn K, Nemoto. Sex Differences of Drug – metabolizing enzyme: female predominant expression of human and mouse cytochrome P450 3A isoforms. *Journal of Health Science*. 2009; 55: 325-337.
- 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.
- Saradhi M, Kumar N, Reddy RC, Tyagi RK. Pregnane and xenobiotic receptor (PXR): a promiscuous xenosensor in human health and disease. *JER*. 2006; 10: 1-12.
- Sata F, Sapone A, Elizondo G, Stocker P, Miller VP, Zheng W, Raunio H, Crespi CL, Gonzalez FJ. CYP3A4 allelic variants with amino acid substitutions in exons 7 and 12: Evidence for allelic variant with altered catalytic activity. *Clin Pharmacol Ther*. 2000; 67: 48-56.
- Satsu H, Hiura Y, Mochizuki K, Hamada M, Shimizu M. Activation of pregnane X receptor and induction of MDR1 by dietary phytochemicals. *J Agric Food Chem*. 2008; 56: 5366-5373.
- Savas Ü, Griffin KJ, Johnson EF. Molecular mechanism of cytochrome P-450 induction by xenobiotics: an expanded role for nuclear hormone receptors. *Mol Pharmacol*. 1999; 56: 851-857.

Schuetz EG, Schuetz JD, Strom SC, Thompson MT, Fisher RA, Molowa DT, Li D, Guzelian PS. Regulation of human liver cytochrome P-450 in family 3A in primary and continuous culture of human hepatocytes. *Hepatology*. 1993; 18: 1254-1262.

Schuetz EG, Wrighton SA, Barwick JL, Guzelian PS. Induction of cytochrome P-450 by glucocorticoids in rat liver. I. Evidence that glucocorticoids and pregnenolone 16 α -carbonitrile regulate de novo synthesis of a common form of cytochrome P-450 in cultures of adult rat hepatocytes and in the liver in vivo. *J Biol Chem*. 1984; 259: 1999-2006.

Schuetz JD, Beach DL, Guzelian PS. Selective expression of cytochrome P450 CYP3A mRNAs in embryonic and adult human liver. *Pharmacogenetics*. 1994; 4: 11-20.

Schwabe JW, Rhodes D. Beyond zinc fingers: steroid hormone receptors have a novel structural motif for DNA recognition. *Trends Biochem Sci*. 1991; 16: 291-296.

Seliskar M, Rozman D. Mammalian cytochromes P450-importance of tissue specificity. *Biochim Biophys Acta*. 2007; 1770: 458-466.

Shadle CR, Lee Y, Majumdar AK, Petty KJ, Gargano C, Bradstreet TE, Evans JK, Blum RA. Evaluation of potential inductive of aprepitant on cytochrome P450 3A4 and 2C9 activity. *J Clin Pharmacol*. 2004; 44: 215-223.

Shan L, Vincent J, Brunzelle JS, Dussault I, Lin M, Ianculescu I, Sherman MA, Forman BM, Fernandez EJ. Structure of the murine constitutive androstane receptor complexed to androsteneol: a molecular basis for inverse agonism. *Mol Cell*. 2004; 16: 907-917.

Shenn LY, Chen HW, Kung YL, Liu CT, Lii CK. Effects of garlic oil and its organosulfur compounds on the activities of hepatic drug-metabolizing and antioxidant enzymes in rats fed high- and low-fat diets. *Nutr Cancer*. 1999a; 35: 160-166.

Shenn LY, Sheu SF, Tsai SJ, Meng RHC, Lii CK. Effect of garlic active principle, diallyl disulfide, on cell viability, lipid peroxidation, glutathione concentration and its related enzymes activities in primary rat hepatocytes. *Am J Chin Med*. 1999b; 27: 95-106.

Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, Inui Y, Guengerich FP. Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the 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.

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 nicardipine in rats. *Life Sci*. 2002; 70: 2783-2792.

Siess MH, Le Bon AM, Canivenc-Lavier MC, Suscheter M. Modification of hepatic drug metabolizing enzymes in rats treated with alkyl sulfides. *Cancer Lett*. 1997; 120: 195-201.

Smirlis D, Muangmoonchai R, Edwards M, Phillips IR, Shephard EA. Orphan receptor promiscuity in the induction of cytochrome p450 by xenobiotics. *J Biol Chem*. 2001; 276: 12822-12826.

Smith DA, Acland MJ, Jones BC. Properties of cytochrome P-450 and their substrates. Part 1: Active site characteristics. *Drug Discovery Today* 2. 1997; 10: 406-414.

- Sohn OS, Surace A, Fiala ES, Richie JP, 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: 119-127.
- Solas C, Poizot-Martin I, Drogoul MP, Ravaux I, Dhiver C, Lafeuillade A, Allegre T, Mokhtari M, Moreau J, Lepeu G, Petit N, Durand A, Lacarelle B. Therapeutic drug monitoring of lopinavir/ritonavir given alone or with a non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor. *Br J Clin Pharmacol*. 2004; 57: 436-440.
- 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: 531-538.
- Spatzenegger M, Jaeger W. Clinical importance of hepatic cytochrome P450 in drug metabolism. *Drug Metab Rev*. 1995; 27: 397-417.
- Spigelski D, Jones PJ. Efficacy of garlic supplementation in lowering serum cholesterol levels. *Nutr Rev*. 2001; 59: 236-241.
- Squires EJ, Sueyoshi T, Negishi M. Cytoplasmic localization of pregnane X receptor and ligand-dependent nuclear translocation in mouse liver. *J Biol Chem*. 2006; 279: 49307-49314.
- Staiger C, Schlicht F, Walter E, Gundert-Remy U, Hildebrandt R, de Vries J, Wang NS, Harenberg J, Weber E. Effect of single and multiple doses of sulphinpyrazone on antipyrine metabolism and urinary excretion of 6-beta-hydroxycortisol. *Eur J Clin Pharmacol*. 1983; 25: 797-801.
- Staudinger JL, Goodwin B, Jones SA, Hawkins-Brown D, MacKenzie KI, LaTour A, Liu Y, Klaassen CD, Brown KK, Reinhard J, Willson TM, Koller BH, Kliewer SA. The nuclear receptor PXR is a lithocholic acid sensor that protects against liver toxicity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 98: 3369-3374.
- Sueyoshi T, Kawamoto T, Zelko I, Honkakoski P, Negishi M. The repressed nuclear receptor CAR responds to phenobarbital in activating the human CYP2B6 gene. *J Biol Chem*. 1999; 274: 6043-6046.
- Sugimoto K, Ohmori M, Tsuruoka S, Nishiki K, Kawaguchi A, Harada K, Arakawa M, Sakamoto K, Masada M, Miyamori I, Fujimura A. Different effects of St John's wort on the pharmacokinetics of simvastatin and pravastatin. *Clin Pharmacol Ther*. 2001; 70: 518-524.
- Suino K, Peng L, Reynolds R, Li Y, Cha JY, Repa JJ, Kliewer SA, Xu HE. The nuclear xenobiotic receptor CAR: structural determinants of constitutive activation and heterodimerization. *Mol Cell*. 2004; 16: 893-905.
- Sun LQ. Information on research and application of Ginseng, the king of traditional and herbal medicines. *Asian Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. 2004; 4: 261-284.
- Sunter WH. Warfarin and garlic. *Pharm J*. 1991; 246: 722.
- Synold TW, Dussault I, Forman BM. The orphan nuclear receptor SXR coordinately regulates drug metabolism and efflux. *Nat Med*. 2001; 7: 584-90.
- 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.

- Takada T, Ogino M, Miyata M, Shimada M, Nagata K, Yamazoe Y. Differences in transactivation between rat CYP3A1 and human CYP3A4 genes by human pregnane X receptor. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2004; 19: 103-113.
- Tannergren C, Engman H, Knutson L, Hedeland M, Bondesson U, Lennernäs H. St John's wort decreases the bioavailability of R- and S-verapamil through induction of the first-pass metabolism. *Clin Pharmacol Ther.* 2004; 75: 298-309.
- Timsit YE, Negishi M. CAR and PXR: the xenobiotic-sensing receptors. *Steroids.* 2007; 72: 231-246.
- Tirona RG, Lee W, Leake BF, Lan LB, Cline CB, Lamba V, Parviz F, Duncan SA, Inoue Y, Gonzalez FJ, Schuetz EG, Kim RB. The orphan nuclear receptor HNF4alpha determines PXR- and CAR-mediated xenobiotic induction of CYP3A4. *Nat Med.* 2003; 9: 220-224.
- 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.
- Trieu L, Murray M. Metabolite-intermediate complexation and inhibition of microsomal CYP3A in rat liver by diltiazem. *Xenobiotica.* 2000; 30: 131-140.
- Tzamelis I, Pissios P, Schuetz EG, Moore DD. The xenobiotic compound 1,4-bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)] benzene is an agonist ligand for the nuclear receptor CAR. *Mol Cell Biol.* 2000; 20: 2951-2958.
- Umegaki K, Saito K, Kubota Y, Sanada H, Yamada K, Shinozuka K. Ginkgo biloba extract markedly induces pentoxifyllin O-dealkylase activity in rats. *Jpn J Pharmacol.* 2002; 90: 345-351.
- Vaes LP, Chyka PA. Interactions of warfarin with garlic, ginger, ginkgo or ginseng: nature of the evidence. *Ann Pharmacother.* 2000; 34: 1478-1482.
- van Duijnhoven EM, Boots JM, Christiaans MH, Stolk LM, Undre NA, van Hooff JP. Increase in tacrolimus trough levels after steroid withdrawal. *Transpl Int.* 2003; 16: 721-725.
- Venepally P, Chen O, Kemper B. Transcriptional regulatory elements for basal expression of cytochrome P450IIC genes. *J Biol Chem.* 1992; 267: 17333-17338.
- Venhorst J, ter Laak AM, Commandeur JN, Funae Y, Hiroi T, Vermeulen NP. Homology modeling of rat and human cytochrome P450 2D (CYP2D) isoforms and computational rationalization of experimental ligand-binding specificities. *J Med Chem.* 2003; 46: 74-86
- Vergères G, Waskell L. Cytochrome b5, its function, structure and membrane topology. *Biochimie,* 1995; 77: 604-620.
- Vesell ES. The liver. *Biology and Pathobiology.* Eds. Arias IM, Jakoby WB, Popper H, Schachter D, Shafritz DA. *Pharmacogenetics.* 1988; 213-234.
- 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.

- Wang EJ, Li Y, Lin M, Chen L, Stein AP, Reuhl KR et al. Protective effects of garlic and related organosulfur compounds on acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1996; 136: 146-154.
- Wang Z, Gorski JC, Hamman MA, Huang SM, Lesko LJ, Hall SD. The effects of St. John's Wort (*Hypericum perforatum*) on human cytochrome P450 activity. *Clin Pharmacol Ther.* 2001; 70: 317-326.
- Watkins PB, Murray SA, Winkelman LG, Heuman DM, Wrighton SA, Guzelian PS. Erythromycin breath test as an assay of glucocorticoid-inducible liver cytochromes P-450. *Studies in rats and patients. J Clin Invest.* 1989; 83: 688-698.
- 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.
- Wei P, Zhang J, Egan-Hafley M, Liang S, Moore DD. The nuclear receptor CAR mediates specific xenobiotic induction of drug metabolism. *Nature.* 2000; 407: 920-923.
- Wentworth JM, Agostini M, Love J, Schwabe JW, Chatterjee VK. St John's wort, a herbal antidepressant, activates the steroid X receptor. *J Endocrinol.* 2000; 166: R11-6.
- Whitlock JPJ. Induction of cytochrome P4501A1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1999; 39: 103-125.
- Wienkers LC, Heath TG. Predicting in vivo drug interactions from in vitro drug discovery data. *Nat Rev Drug Discov.* 2005; 4: 825-833.
- Williams JA, Ring BJ, Cantrell VE, Jones DR, Eckstein J, Ruterbories K, Hamman MA, Hall SD, Wrighton SA. Comparative metabolic capabilities of CYP3A4, CYP3A5, and CYP3A7. *Drug Metab Dispos.* 2002; 30: 883-891.
- Williamson EM. Interactions between herbal and conventional medicines. *Expert Opin Drug Saf.* 2005; 4: 355-378.
- Wiśniewska A, Koprowska J, Niemira M, Augustin E, Konopa J, Mazerska Z. Metabolism of antitumor 9-amino-1-nitroacridine derivative, C-1748 (Capridine – beta), in HepG2 tumor cells, Abstract of 10th ISSX European Meeting, Vienna May 18-21, *Drug Metab Rev.* 2008; 40: 186.
- Wiśniewska A, Mazerska Z. Izoenzymy cytochromu P450 w metabolizmie związków endo- i egzogennych. *Postępy Biochemii.* 2009; 55: 259-271.
- Wood PM. A comparison of peroxidase and cytochrome P450. *Biochem Soc Transact.* 1992; 20: 349-352.
- Wójcikowski J, Pichard –Garcia L, Maurel P, Daniel WA. Contribution of human cytochrome P-450 isoforms to the metabolism of the simplest phenothiazine neuroleptic promazine. *Br J Pharmacol.* 2003; 138: 1465-1474.
- Wrighton SA, Brian WR, Sari MA, Iwasaki M, Guengerich FP, Raucy JL, Molowa DT, Vandenbranden M. Studies on the expression and metabolic capabilities of human liver cytochrome P450III A5 (HLp3). *Mol Pharmacol.* 1990; 38: 207-213.

- Wu CC, Sheen LY, Chen HW, Kuo WW, Tsai SJ, Lii CK. Differential effects of garlic oil and its three major organosulfur components on the hepatic detoxification system in rats. *J Agric Food Chem.* 2002; 50: 378-383.
- Xia J, Kemper B. Structural determinants of constitutive androstane receptor required for its glucocorticoid receptor interacting protein-1-mediated nuclear accumulation. *J Biol Chem.* 2005; 280: 7285-7293.
- Xie CS, Evans RM. Orphan nuclear receptors: the exotics of xenobiotics. *J Biol Chem.* 2001; 276: 37739-42.
- Xie W, Barwick JL, Downes M, Blumberg B, Simon CM, Nelson MC, Neuschwander-Tetri BA, Brunt EM, Guzelian PS, Evans RM. Humanized xenobiotic response in mice expressing nuclear receptor SXR. *Nature.* 2000a; 406: 435-439.
- Xie W, Barwick JL, Simon CM, Pierce AM et al. Reciprocal activation of xenobiotic response genes by nuclear receptors SXR/PXR and CAR 2000b *Genes Dev* 14: 3014-3023.
- Xu RX, Lambert MH, Wisely BB, Warren EN, Weinert EE, Waitt GM, Williams JD, Collins JL, Moore LB, Willson TM, Moore JT. A structural basis for constitutive activity in the human CAR/RXRalpha heterodimer. *Mol Cell.* 2004; 16: 919-928.
- Yale SH, Glurich I, Analysis of the inhibitory potential of Ginkgo biloba, Echinacea purpurea, and Serenoa repens on the metabolic activity of cytochrome P450 3A4, 2D6, and 2C9. *J Altern Complement Med.* 2005; 11: 433-439.
- Yamazaki H, Inui Y, Wrighton SA, Guengerich FP, Shimada T. Procarcinogen activation by cytochrome P450 3A4 and 3A5 expressed in Escherichia coli and by human liver microsomes. *Carcinogenesis.* 1995; 16: 2167-2170.
- Yasui-Furukori N, Furukori H, Kaneda A, Kaneko S, Tateishi T. The effects of Ginkgo biloba extracts on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of donepezil. *J Clin Pharmacol.* 2004; 44: 538-542.
- Yano JK, Wester MR, Schoch GA, Griffin KJ, Stout CD, Johnson EF. The Structure of Human Microsomal Cytochrome P450 3A4 Determined by X-ray Crystallography to 2.05-A Resolution. *J Biol Chem.* 2004; 279: 38091-38094.
- Yeung EYH, Sueyoshi T, Negishi M, Chang TKH. Identification of Ginkgo biloba as a novel activator of pregnane X receptor. *Drug Metab Dispos.* 2008; 36: 2270-2276.
- Yeung PK, Mosher SJ, Quilliam MA, Montague TJ. Species comparison of pharmacokinetics and metabolism of diltiazem in humans, dogs, rabbits, and rats. *Drug Metab Dispos.* 1990; 18: 1055-1059.
- Yoshida Y, Aoyama Y, Noshiro M, Gotoh O. Sterol 14-demethylase P450 (CYP51) provides a breakthrough for the discussion on the evolution of cytochrome P450 gene superfamily. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000; 273: 799-804.
- Zaidenstein R, Soback S, Gips M, Avni B, Dishy V, Weissgarten Y, Golik A, Scapa E. Effect of grapefruit juice on the pharmacokinetics of losartan and its active metabolite E3174 in healthy volunteers. *Ther Drug Monit.* 2001; 23: 369-73.

Zhang H, Hamdane D, Sang-Choul I, Waskell L. Cytochrome b5 inhibits electron transfer from NADPH-Cytochrome P450 reductase to ferric cytochrome P450 2B4. *J Biol Chem.* 2008; 283: 5217-5225.

Zhang P, Noordine ML, Cherbuy C, Vaugelade P, Pascussi JM, Duée PH, Thomas M. Different activation patterns of rat xenobiotic metabolism genes by two constituents of garlic. *Carcinogenesis.* 2006; 27: 2090-2095.

Ziegler GA, Vornhein C, Hanukoglu I, Shulz G. The structure of adrenodoxin reductase of mitochondrial P450 systems: electron transfer for biosynthesis. *J Biol Chem.* 1999; 289: 981-990.

Zhou SF, Liu JP, Chowbay B. Polymorphism of human cytochrome P450 enzymes and its clinical impact. *Drug Metabolism Reviews.* 2009; 41: 89-295.

Zuber R, Anzenbacherova E, Anzenbacher P. Cytochromes P450 and experimental models of drug metabolism. *J Cell Mol Med.* 2002; 6: 189-198.

SPIS RYCIN I TABEL

Rycina 1. Fazy metabolizmu leku.....	12
Rycina 2. Przykładowa struktura ludzkiej izoformy cytochromu P450 CYP3A4 z zaznaczoną grupą prostetyczną.....	15
Rycina 3. Udział poszczególnych frakcji enzymów CYP450 w wątrobie człowieka na poziomie białka.....	17
Rycina 4. Centrum porfirynowo-żelazowe enzymu CYP450.....	18
Rycina 5. Cykl katalityczny cytochromu P450.....	19
Rycina 6. Udział enzymów CYP450 w biotransformacji leków w wątrobie człowieka.....	24
Rycina 7. Lokalizacja genu CYP3A4 na chromosomie 7 (7q22.1).....	29
Rycina 8. Lokalizacja genu CYP2D6 na chromosomie 22 (22q13.1).....	35
Rycina 9. Wpływ substancji egzogennych i endogennych oraz innych czynników w regulacji ekspresji genów CYP.....	44
Rycina 10. Aktywacja receptora jądrowego przez ligand i regulacja genów docelowych.....	45
Rycina 11. Schemat struktury receptora jądrowego (NR).....	47
Rycina 12. Motywy RE w promotorze genów docelowych rozpoznawane przez NR.....	48
Rycina 13. Schemat homologii funkcjonalnych domen receptora pregnanu X u różnych gatunków ssaków.....	49
Rycina 14. Indukcja metabolizmu leku poprzez receptor pregnanu X regulującego ekspresję genu CYP3A4.....	50
Rycina 15. Rola receptora pregnanu X (PXR) w metabolizmie kwasów żółciowych i ich udział w regulacji jego aktywności.....	52
Rycina 16. Mechanizm regulacji CYP2B6 poprzez konstytutywny receptor androstanu (CAR).....	54
Rycina 17. Schemat homologii domen PXR i CAR u człowieka.....	55
Rycina 18. Związek pomiędzy szlakami sygnalizacji PXR a CAR.....	56
Rycina 19. Rozdział elektroforetyczny amplikonów GAPDH, CYP2D2 i CYP3A1 reakcji PCR w czasie rzeczywistym w 1,5% żelu agarozowym.....	72
Rycina 20. Rozdział elektroforetyczny amplikonów PXR i CAR reakcji PCR w czasie rzeczywistym w 1,5% żelu agarozowym.....	73
Rycina 21. Wyznaczanie temperatury topnienia produktu GAPDH w reakcji rt-PCR.....	74
Rycina 22. Przebieg reakcji PCR w czasie rzeczywistym dla genu GAPDH przy różnych jego rozcieńczeniach. Krzywa wzorcowa dla GAPDH.....	74
Rycina 23. Wyznaczanie temperatury topnienia produktu CYP2D2 w reakcji rt-PCR.....	75
Rycina 24. Przebieg reakcji PCR w czasie rzeczywistym dla genu CYP2D2 przy różnych jego rozcieńczeniach cDNA. Krzywa wzorcowa dla CYP2D2.....	76
Rycina 25. Analiza wpływu izoniazydu na poziom transkryptu genu CYP2D2 z wykorzystaniem reakcji rt-PCR w komórkach wątroby szczurów rasy Wistar po 3 i 10 dniach podawania preparatu.....	77
Rycina 26. Analiza wpływu syntetycznego inhibitora CYP2D - chininy na poziom transkryptu genu CYP2D2 z wykorzystaniem reakcji rt-PCR w komórkach wątroby szczurów rasy Wistar po 3 i 10 dniach podawania.....	77
Rycina 27. Analiza wpływu preparatów roślinnych na poziom transkryptu CYP2D2 z wykorzystaniem reakcji rt-PCR w komórkach wątroby szczurów rasy Wistar po 3 i 10 dniach podawania.....	78
Rycina 28. Wyznaczanie temperatury topnienia produktu CYP3A1 w reakcji rt-PCR.....	80

Rycina 29. Przebieg reakcji PCR w czasie rzeczywistym dla genu CYP3A1 przy różnych jego rozcieńczeniach cDNA. Krzywa wzorcowa dla CYP3A1	80
Rycina 30. Analiza wpływu syntetycznego induktora CYP3A (deksametazon) na poziom transkryptu badanego genu CYP3A1 z wykorzystaniem reakcji rt-PCR w komórkach wątroby szczurów rasy Wistar po 3 i 4 dniach podawania preparatu	81
Rycina 31. Analiza wpływu ketokonazolu na poziom transkryptu genu CYP3A1 z wykorzystaniem reakcji rt-PCR w komórkach wątroby szczurów rasy Wistar po 3 i 10 dniach podawania.....	82
Rycina 32. Analiza wpływu preparatów roślinnych na poziom transkryptu CYP3A1 z wykorzystaniem reakcji rt-PCR w komórkach wątroby szczurów rasy Wistar po 3 i 10 dniach podawania.....	83
Rycina 33. Wyznaczanie temperatury topnienia produktu PXR w reakcji rt-PCR.....	84
Rycina 34. Przebieg reakcji PCR w czasie rzeczywistym dla transkryptu PXR przy różnych jego rozcieńczeniach cDNA. Krzywa wzorcowa dla PXR.....	85
Rycina 35. Analiza wpływu deksametazonu na poziom transkryptu PXR z wykorzystaniem reakcji rt-PCR w komórkach wątroby szczurów rasy Wistar po 3 i 4 dniach podawania.....	85
Rycina 36. Analiza wpływu ketokonazolu na poziom transkryptu PXR z wykorzystaniem reakcji rt-PCR w komórkach wątroby szczurów rasy Wistar po 3 i 10 dniach podawania.....	86
Rycina 37. Analiza wpływu preparatów roślinnych na poziom transkryptu PXR z wykorzystaniem reakcji rt-PCR w komórkach wątroby szczurów rasy Wistar po 3 i 10 dniach podawania.....	87
Rycina 38. Wyznaczanie temperatury topnienia produktu CAR w reakcji rt-PCR.....	88
Rycina 39. Przebieg reakcji PCR w czasie rzeczywistym dla transkryptu CAR przy różnych jego rozcieńczeniach cDNA. Krzywa wzorcowa dla CAR	89
Rycina 40. Analiza wpływu deksametazonu na poziom transkryptu CAR z wykorzystaniem reakcji rt-PCR w komórkach wątroby szczurów rasy Wistar po 3 i 4 dniach podawania.....	89
Rycina 41. Analiza wpływu ketokonazolu na poziom transkryptu CAR z wykorzystaniem reakcji rt-PCR w komórkach wątroby szczurów rasy Wistar po 3 i 10 dniach podawania.....	90
Rycina 42. Analiza wpływu preparatów roślinnych na poziom transkryptu CAR z wykorzystaniem reakcji rt-PCR w komórkach wątroby szczurów rasy Wistar po 3 i 10 dniach podawania.....	91
Rycina 43. Indukcja CYP3A4 i CYP2B6 przez hiperforynę (St. John's wort) przy udziale PXR	102
Rycina 44. Schemat prezentujący aktywację NR i indukcję enzymów metabolizujących leki (DME) przez EGb 761	124

Tabela 1. Enzymy metabolizujące ksenobiotyki	10
Tabela 2. Główne reakcje metabolizmu leków.....	11
Tabela 3. Zawartość całkowitej frakcji CYP w wybranych ludzkich tkankach	14
Tabela 4. Typy reakcji chemicznych katalizowanych przez enzymy CYP450.....	23
Tabela 5. Główne funkcje przypisywane ludzkim enzymom CYP z uwzględnieniem ich lokalizacji na chromosomie	25
Tabela 6. Klasyfikacja izoenzymów CYP450 w zależności od substratu	27
Tabela 7. Izoenzymy podrodziny CYP3A	28
Tabela 8. Indukcja enzymu CYP3A4 u człowieka <i>in vivo</i> przez ksenobiotyki.....	30
Tabela 9. Przykładowe substraty, inhibitory i induktory enzymu CYP3A4	31
Tabela 10. Kliniczne znaczenie wybranych interakcji lekowych z udziałem enzymu CYP3A4.....	32
Tabela 11. Przykładowe interakcje lek-lek poprzez indukcję CYP3A.....	35
Tabela 12. Wybrane reakcje katalizowane przez CYP2D6.....	36
Tabela 13. Przykładowe substraty, inhibitory i induktory enzymu CYP2D6	39
Tabela 14. Kliniczne znaczenie wybranych interakcji lekowych z udziałem enzymu CYP2D6.....	40
Tabela 15. Przykładowe leki syntetyczne aktywujące ludzki PXR.....	49
Tabela 16. Regulacja genów uczestniczących w metabolizmie ksenobiotyków przy udziale PXR i CAR.....	57
Tabela 17. Ortologiczne odpowiedniki ludzkich enzymów CYP i receptorów jądrowych w modelu zwierzęcym (szczur) w prezentowanym badaniu <i>in vivo</i>	58
Tabela 18. Wykaz dawek preparatów syntetycznych podawanych zwierzętom laboratoryjnym (szczur).....	63
Tabela 19. Wykaz dawek substancji roślinnych podawanych zwierzętom laboratoryjnym(szczur).....	63
Tabela 20. Sekwencje starterów użytych do reakcji PCR w czasie rzeczywistym	68
Tabela 21. Warunki reakcji PCR w czasie rzeczywistym	70
Tabela 22. Skład 1% i 1,5% żelu agarozowego.....	71
Tabela 23. Porównanie średnich dla poszczególnych prób w odniesieniu do analizowanych genów po zastosowaniu substancji wzorcowych, (n = 10)...93	93
Tabela 24. Porównanie średnich dla poszczególnych prób w odniesieniu do analizowanych genów po zastosowaniu standaryzowanych substancji roślinnych (n = 10).....	94
Tabela 25. Wpływ wzorcowych syntetycznych substancji podawanych dootrzewnowo (i.p.) na poziom ekspresji badanych genów w zależności od czasu, (n = 10) ..100	100
Tabela 26. Wpływ ekstraktu <i>H. perforatum</i> (300 mg/kg, p.o.) na poziom ekspresji badanych genów w zależności od czasu podawania, (n = 10).....	103
Tabela 27. Stałe inhibicji dla składników St. John's wort na aktywność ludzkiego cytochromu P450	105
Tabela 28. Wpływ <i>Hypericum perforatum</i> na aktywność izoformy CYP3A4 w badaniach klinicznych.....	107
Tabela 29. Wpływ ekstraktów <i>Hypericum perforatum</i> na aktywność izoform cytochromu P450 w badaniach klinicznych	108
Tabela 30. Wpływ ekstraktu <i>E. purpurea</i> (50 mg/kg, p.o.) na poziom ekspresji badanych genów w zależności od czasu podawania, (n = 10).....	111
Tabela 31. Wpływ <i>Echinacea purpurea</i> na aktywność enzymów CYP450.....	113
Tabela 32. Wpływ ekstraktu <i>V. officinalis</i> (300 mg/kg, p.o.) na poziom ekspresji badanych genów w zależności od czasu podawania, (n = 10).....	116

Tabela 33. Związki biologicznie aktywne wyizolowane z liści <i>Ginkgo biloba</i> jako inhibitory ludzkich izoenzymów CYP450 w warunkach <i>in vitro</i>	119
Tabela 34. Wpływ ekstraktu <i>G. biloba</i> (200 mg/kg, p.o.) na poziom ekspresji badanych genów w zależności od czasu podawania, (n = 10)	120
Tabela 35. Wpływ ekstraktu <i>G. biloba</i> na aktywność enzymów CYP w badaniach klinicznych.....	122
Tabela 36. Wpływ ekstraktu <i>P. ginseng</i> (30 mg/kg, p.o.) na poziom ekspresji badanych genów w zależności od czasu podawania, (n = 10).....	127
Tabela 37. Wpływ ginsenozydów na aktywność izoenzymów CYP450.....	128
Tabela 38. Wpływ ekstraktu <i>A. sativum</i> (250 mg/kg, p.o.) na poziom ekspresji badanych genów w zależności od czasu podawania, (n = 10).....	132
Tabela 39. Wpływ związków aktywnych ekstraktu <i>A. sativum</i> na aktywność ludzkich izoform cytochromu P450 w modelu <i>in vitro</i>	133
Tabela 40. Wpływ ekstraktu <i>G. max</i> (100 mg/kg, p.o.) na poziom ekspresji badanych genów w zależności od czasu podawania, (n = 10)	138
Tabela 41. Wpływ <i>G. max</i> i jej aktywnych substancji na aktywność enzymów CYP450.....	140
Tabela 42. Wpływ ekstraktu <i>C. sinensis</i> (300 mg/kg, p.o.) na poziom ekspresji badanych genów w zależności od czasu podawania, (n = 10).....	143
Tabela 43. Wpływ <i>C. sinensis</i> i jej aktywnych substancji na aktywność enzymów CYP450.....	145