

**Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu  
Wydział Farmaceutyczny**

**Joanna Cichocka**

**ROZPRAWA DOKTORSKA**

**Wpływ wyciągów roślinnych na poziom ekspresji wybranych  
genów kodujących enzymy II fazy metabolizmu ksenobiotyków  
w modelu *in vivo***

**PROMOTOR: Prof. dr hab. Przemysław M. Mrozikiewicz**

**Praca wykonana w Instytucie Włókien Naturalnych  
i Roślin Zielarskich w Poznaniu**

**POZNAŃ 2013**

*Serdeczne podziękowania kieruję do mojego Promotora  
Pana Prof. dr. hab. Przemysława M. Mrozikiewicza  
za pomoc merytoryczną oraz wyrozumiałość*

*Dziękuję również Wszystkim Pracownikom Zakładu Badania Jakości  
Produktów Leczniczych i Suplementów Diety za pomoc i przyjazną  
atmosferę*

## SPIS TREŚCI

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW .....	5
1. WSTĘP .....	8
1.1. Wprowadzenie .....	8
1.2. Metabolizm leków .....	9
1.3. Charakterystyka enzymów II fazy metabolizmu leków .....	12
1.3.1. UDP-glukuronylotransferazy .....	12
1.3.2. Sulfotransferazy .....	16
1.3.3. S-transferazy glutationowe .....	17
1.3.4. N-acetylotransferazy .....	21
1.4. Regulacja aktywności enzymów II fazy metabolizmu .....	24
1.4.1. Szlak Nrf2-Keap1-ARE .....	26
1.5. Wpływ preparatów pochodzenia roślinnego na metabolizm leków .....	28
1.6. Charakterystyka surowców roślinnych badanych w pracy .....	30
1.6.1. Zielona herbata ( <i>Camellia sinensis</i> ) .....	30
1.6.2. Soja zwyczajna ( <i>Glycine max</i> ) .....	32
1.6.3. Dziurawiec zwyczajny ( <i>Hypericum perforatum</i> ) .....	34
1.6.4. Kozłek lekarski ( <i>Valeriana officinalis</i> ) .....	37
2. CELE PRACY .....	39
3. MATERIAŁY I METODY .....	40
3.1. Badania na zwierzętach .....	40
3.2. Analizy molekularne .....	41
3.2.1. Odczynniki .....	41
3.2.2. Aparatura i sprzęt laboratoryjny .....	42
3.2.3. Izolacja RNA .....	43
3.2.4. Analiza ilościowa i jakościowa RNA .....	44
3.2.5. Odwrotna transkrypcja .....	45
3.2.6. Reakcja łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym .....	45
3.2.7. Elektroforeza żelowa .....	49
3.2.8. Analiza statystyczna .....	50
4. WYNIKI .....	51
4.1. Elektroforeza produktów reakcji <i>real-time</i> PCR .....	51
4.2. Przygotowanie krzywych standardowych oraz charakterystyka temperatury topnienia produktów reakcji <i>real-time</i> PCR .....	51
4.2.1. Krzywa standardowa i $T_m$ dla produktu amplifikacji genu GAPDH .....	52
4.2.2. Krzywa standardowa i $T_m$ dla produktu amplifikacji genu Nat1 .....	52
4.2.3. Krzywa standardowa i $T_m$ dla produktu amplifikacji genu Nat2 .....	53
4.2.4. Krzywa standardowa i $T_m$ dla produktu amplifikacji genu Sult1a1 .....	54
4.2.5. Krzywa standardowa i $T_m$ dla produktu amplifikacji genu Ugt1a1 .....	54
4.2.6. Krzywa standardowa i $T_m$ dla produktu amplifikacji genu Gstp1 .....	55
4.2.7. Krzywa standardowa i $T_m$ dla czynnika transkrypcyjnego Nrf2 .....	56
4.3. Analiza wpływu standaryzowanych ekstraktów roślinnych na poziom ekspresji wybranych genów II fazy metabolizmu ksenobiotyków .....	57
4.3.1. Efekt wyciągu z ziela <i>Hypericum perforatum</i> na poziom mRNA badanych enzymów i czynnika Nrf2 .....	57

---

4.3.2. Efekt wyciągu z liści <i>Camellia sinensis</i> na poziom mRNA badanych enzymów i czynnika Nrf2.....	58
4.3.3. Efekt wyciągu z korzenia <i>Valeriana officinalis</i> na poziom mRNA badanych enzymów i czynnika Nrf2.....	59
4.3.4. Efekt wyciągu z nasion <i>Glycine max</i> na poziom mRNA badanych enzymów i czynnika Nrf2.....	61
5. OMÓWIENIE WYNIKÓW .....	63
5.1. Ocena metody badawczej zastosowanej do pomiaru poziomu ekspresji genów w modelu zwierzęcym (szczur) .....	63
5.2. Wpływ <i>Hypericum perforatum</i> na poziom ekspresji wybranych enzymów II fazy biotransformacji .....	64
5.3. Wpływ <i>Camellia sinensis</i> na poziom ekspresji wybranych enzymów II fazy biotransformacji .....	67
5.4. Wpływ <i>Valeriana officinalis</i> na poziom ekspresji wybranych enzymów II fazy biotransformacji .....	71
5.5. Wpływ <i>Glycine max</i> na poziom ekspresji wybranych enzymów II fazy biotransformacji .....	72
5.6. Wpływ standaryzowanych ekstraktów roślinnych na poziom ekspresji czynnika Nrf2 .....	76
5.7. Podsumowanie .....	77
6. WNIOSKI .....	79
7. STRESZCZENIE .....	80
8. SUMMARY .....	82
9. LITERATURA .....	84
SPIS RYCIN I TABEL .....	98

**WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW**

AF-2	subdomena AF-2 odpowiedzialna za aktywność transkrypcyjną zależną od ligandu (ang. <i>activation function 2</i> )
AhR	receptor węglowodorów aromatycznych (ang. <i>aromatic hydrocarbon receptor</i> )
ARE	element odpowiedzi antyoksydacyjnej (ang. <i>antioxidant responsive element</i> )
ARNT	translokator jądrowy receptora Ah (ang. <i>aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator</i> )
C/EBP $\beta$	białko $\beta$ wiążące się z sekwencją CCAAT (ang. <i>CCAAT-enhancer binding protein-<math>\beta</math></i> )
CAR	konstitutywny receptor androstanu (ang. <i>constitutive androstane receptor</i> )
cDNA	komplementarny DNA, jednoniciowa postać DNA, będąca kopią RNA, uzyskana po odwrotnej transkrypcji (ang. <i>complementary DNA</i> )
COMT	katecholo-O-metylotransferaza (ang. <i>catechol-O-methyltransferase</i> )
CYP	cytochrom P450
DADS	disiarczek diallilu
DAS	siarczek diallilu
DEPC	pirowęglan dietylu
DHEA	dehydroepiandrosteron (ang. <i>dehydroepiandrosterone</i> )
dNTP	deoksyrybonukleotyd
DTT	1,4-ditiotreitol
EDTA	kwasy etylenodiaminotetraoctowy (ang. <i>ethylenediamine tetraacetic acid</i> )
EGC	epigallokatechina
EGCG	galusan epigallokatechiny
FXR	receptor farnezoidu X (ang. <i>farnesoid X receptor</i> )
GAPDH	dehydrogenaza gliceroaldehydrofosforanowa (ang. <i>glyceraldehydes phosphate 3-dehydrogenase</i> )

GSH	glutation
GST	S-transferaza glutationowa
HNF	hepatocytowy czynnik jądrowy (ang. <i>hepatocyte nuclear factor</i> )
HSP90	białko szoku termicznego 90 (ang. <i>heat –shock protein 90</i> )
JNK	kinaza fosforylująca N-terminalną część białka Jun (ang. <i>c-Jun N-terminal kinase</i> )
MAO	monoaminooksydaza (ang. <i>monoamine oxidase</i> )
MAPK	kinazy białkowe aktywowane mitogenem (ang. <i>mitogen-activated protein kinases</i> )
mRNA	informacyjny RNA (ang. <i>messenger RNA</i> )
MRP	białko oporności wielolekowej (ang. <i>multidrug resistance protein</i> )
NADPH	zredukowany fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego
NAT	N-acetylotransferaza
NQO1	NADPH oksydoreduktaza chinonu 1 (ang. <i>NADPH: quinone oxidoreductase1</i> )
4-NQO	4-nitrochinoliny N-tlenek (ang. <i>4-nitroquinoline 1-oxide</i> )
Nrf2	czynnik jądrowy 2 związany z NF-E2 (ang. <i>nuclear erythroid 2-related factor</i> )
OTC	leki bez recepty (ang. <i>over-the-counter</i> )
PAH	wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (ang. <i>polycyclic aromatic hydrocarbons</i> )
PAPS	3'-fosfoadenozyno-5'-fosfosiarozan (ang. <i>3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate</i> )
PCR	łańcuchowa reakcja polimerazy (ang. <i>polymerase chain reaction</i> )

PERK	kinaza białkowa umiejscowiona w retikulum endoplazmatycznym (ang. <i>protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase</i> )
PhIP	2-amino-1-metylo-6-fenylimidazo[4,5-b]pirydyna
PI3K	3 kinaza fosfatydyloinozytolu (ang. <i>phosphoinositide 3-kinase</i> )
PKC	kinaza białkowa C (ang. <i>protein kinase C</i> )
PPAR $\alpha$	receptor $\alpha$ aktywowany przez proliferatory peroksisomów (ang. <i>peroxisome proliferator-activated receptor alpha</i> )
PXR	receptor pregnanu X (ang. <i>pregnane X receptor</i> )
RFT	reaktywne formy tlenu
RXR	receptor kwasu retinoidowego (ang. <i>retinoid X receptor</i> )
SULT	sulfotransferaza
TBE	roztwór buforowy (TRIS, kwas borowy, EDTA)
T <sub>m</sub>	temperatura topnienia (ang. <i>melting temperature</i> )
Tris	trójhydroksymetyloaminometan (2-amino-2-hydroxymetylo-1,3-propanediol)
UDPGA	kwas urydyno-difosfo-alfa-D-glukuronowy (ang. <i>uridine-5-diphospho-<math>\alpha</math>-D-glucuronic acid</i> )
UGT	UDP-glukuronylotransferaza
XO	oksydaza ksantynowa (ang. <i>xanthine oxidase</i> )

## 1. WSTĘP

### 1.1. Wprowadzenie

W ostatnich latach można zauważyć znaczny wzrost zainteresowania preparatami pochodzenia roślinnego zarówno w Polsce, jak i innych krajach europejskich. Substancje te mogą wchodzić w interakcje z innymi lekami i zwiększa ryzyko poważnych komplikacji w przypadku niewłaściwego stosowania. Dlatego pogłębianie wiedzy dotyczącej oddziaływania tych związków na enzymy metabolizujące leki jest kwestią niezwykle istotną. Z uwagi na obserwowany w społeczeństwie wzrost tendencji do samoleczenia, konieczne jest zbadanie bezpieczeństwa stosowania powszechnie dostępnych preparatów pochodzenia roślinnego, zarówno leków, jak i suplementów diety.

Udział leku roślinnego w terapii jest znacznie wysoki, pomimo niezwykle rozwoju przemysłu farmaceutycznego zajmującego się syntezą leków syntetycznych. Coraz większa liczba preparatów OTC (*ang. over-the-counter* - leki bez recepty) i suplementów diety dostępnych w sprzedaży, a wraz z nią intensywne kampanie reklamowe generują zwiększoną konsumpcję tych leków. Ogromną większość preparatów wydawanych bez recepty i suplementów diety stanowią produkty zawierające składniki roślinne. Stosowanie leków naturalnych związane jest z szeroko popularyzowanym powrotem do natury, zdrowym trybem życia oraz zainteresowaniem medycyną niekonwencjonalną. Fitopreparaty częściej stosowane są w celu wspomaganie organizmu w przypadku choroby, w okresie powrotu do zdrowia, a także odgrywają ważną rolę w profilaktyce tzw. chorób cywilizacyjnych - metabolicznych i samoistnych, jako leki zasadnicze lub pomocnicze stosowane równoległe z chemioterapeutykami [Mohamed i Frye, 2011].

Jednoczesne stosowanie wielu leków, bez znajomości mechanizmów ich działania oraz interakcji zachodzących pomiędzy nimi staje się przyczyną nasilenia niebezpiecznego zjawiska jakim jest polipragmazja. Zjawisko interakcji leków roślinnych z lekami syntetycznymi wciąż jest niedocenianym problemem. W przypadku równoczesnego przyjmowania do pięciu leków jednocześnie, liczba interakcji wzrasta proporcjonalnie do liczby stosowanych leków, a powyżej pięciu przybiera charakter nieproporcjonalny. Dlatego tak istotne jest zwrócenie uwagi ile i jakie leki czy preparaty ziołowe są przyjmowane w tym samym czasie.



Coraz większa konsumpcja preparatów roślinnych, a także błędne przekonanie oraz wiara w to, że zioła nie wywołują skutków ubocznych, wiąże się z potrzebą oceny bezpieczeństwa ich stosowania oraz wyznaczenia zależności pomiędzy właściwościami określonego preparatu a reakcją organizmu na jego przyjmowanie. Substancje te mogą wzajemnie oddziaływać z innymi lekami i grozić wystąpieniem poważnych komplikacji w przypadku niewłaściwego ich stosowania. Skutkiem klinicznym tych zależności może być nieskuteczność stosowanej terapii, zwiększenie toksyczności stosowanych leków, zmiana czasu ich działania, nieodwracalny postęp choroby czy nawet śmierć pacjenta [Lazarou i wsp., 1998; Kee, 2004; Mohamed i Frye, 2011]. Możliwości interakcji leków ziołowych z syntetycznymi są słabo poznane, z tego względu zrozumienie molekularnych podstaw oddziaływania substancji leczniczych na enzymy metabolizmu leków pozwoli na ograniczenie występowania działań niepożądanych.

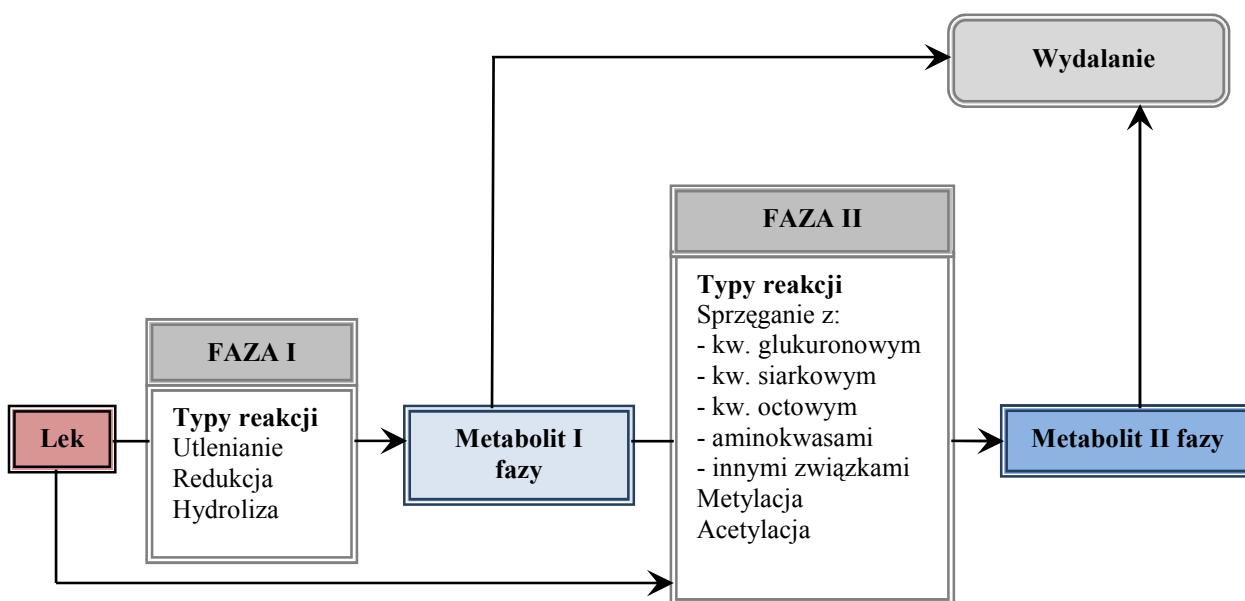
Wpływ leków roślinnych na metabolizm leków syntetycznych wynika z inhibicji bądź aktywacji enzymów metabolizmu leków zarówno fazy I jak i II. Ważnym z punktu widzenia klinicznego surowcem leczniczym zaburzającym metabolizm wielu leków jest ziele dziurawca (*Hyperici herba*), kozłek lekarski (*Valeriana officinalis*) a także powszechnie spożywana zielona herbata (*Camellia sinensis*) oraz soja (*Glycine max*). Dotychczas wyszczególniono wiele ważnych klinicznie interakcji, jednak liczne pozostają nadal niewyjaśnione a zwłaszcza z enzymami II fazy metabolizmu ksenobiotyków.

## **1.2. Metabolizm leków**

Organizm dąży do pozostania w stanie homeostazy, dlatego wszystko co dostaje się do organizmu musi zostać z niego wydalone. Jeśli ta równowaga zostaje zachwiana, organizm będzie akumulował związki a ich stężenie będzie wzrastać i może osiągnąć poziom toksyczny. Większość leków i innych ksenobiotyków ulega w organizmie biochemicznej modyfikacji do związków, które są lepiej rozpuszczalne w wodzie i dzięki temu mogą być znacznie łatwiej wydalane z organizmu przez nerki. Proces ten zwany biotransformacją może prowadzić najczęściej do utraty aktywności farmakologicznej leku jak również może być przyczyną powstania aktywnych metabolitów czy też związków toksycznych dla organizmu [Gonzalez i Tukey, 2006].

Metabolizm leków głównie jest przeprowadzany przez enzymy znajdujące się w błonach retikulum endoplazmatycznego komórek wątrobowych zwanych hepatocytami, w mniejszym stopniu przez enzymy zlokalizowane w osoczu krwi lub w innych miejscach organizmu, jak płuca, łożysko, jądra, jajniki, nerki, skóra czy jelita. Związki endogenne i egzogenne są metabolizowane w dwóch fazach (Rycina 1). Pewne leki mogą ulegać przemianom tylko w jednej z faz, lecz w większości przypadków metabolity powstające w fazie I są przekształcane w fazie II. Rzadko zdarza się, że leki nie są metabolizowane, przykładem jest wankomycyna [Mutschler i wsp., 2004].

Faza I obejmuje procesy utleniania, redukcji i hydrolizy, w wyniku której leki ulegają przekształceniu w bardziej polarne związki, natomiast faza II polega na łączeniu leków ze związkami endogennymi (np. kwasem glukuronowym), co prowadzi do powstania zazwyczaj związków nieaktywnych, przygotowanych do wydalenia z organizmu z moczem lub żółcią. Głównym celem obu faz jest zwiększenie rozpuszczalności leków w wodzie, co ułatwia ich wydalanie [Mutschler i wsp., 2004; Gonzalez i Tukey, 2006].



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

Reakcje fazy I zachodzą przy udziale enzymów cytochromu P450 (CYP), monoooksygenaz flawinowych (FMO) oraz hydrolaz epoksydowych (EH). W fazie II biotransformacji leków przeprowadzane są reakcje acetylacji, metylacji, sprzęgania z aminokwasami, kwasem glukuronowym, octowym lub siarkowym przy udziale transferaz, m.in. UDP-glukuronylotransferazy (UGT), S-transferazy glutationowej (GST), sulfotransferazy (SULT),

metylotransferazy (MT) i N-acetylotransferazy (NAT). Aby biotransformacja leków była skuteczna, niezbędne jest skoordynowane działanie enzymów uczestniczących w każdej z faz metabolizmu (Tabela 1) [Gonzalez i Tukey, 2006].

**Tabela 1.** Enzymy II fazy metabolizmu ksenobiotyków [Gonzalez i Tukey, 2006]

ENZYMY II FAZY	KATALIZOWANE REAKCJE	PRZYKŁADY
Sulfotransferazy (SULT)	Przyłączenie siarczanu	Paracetamol Steroidy Metyldopa
UDP-glukuronylotransferazy (UGT)	Przyłączenie kwasu glukuronowego	Paracetamol Morfina Oksazepam Lorazepam
Glutatio-S-transferazy (GST)	Przyłączenie glutationu	Adriamycyna Fosfomycyna Busulfan
N-acetylotransferazy (NAT)	Dodanie grupy acetylowej	Sulfonamidy Izoniazyd Dapson Klonazepam
Metylotransferazy (MT)	Dodanie grupy metylowej	L-DOPA Metyldopa Merkaptopuryna Kaptopril

Aktywność enzymów uczestniczących w tym procesie jest uwarunkowana wieloma czynnikami fizjologicznymi oraz czynnikami patologicznymi. Czynniki fizjologiczne obejmują rasę, płeć (większość leków jest szybciej metabolizowana u mężczyzn), polimorfizm genetyczny, ciążę, laktację, krążenie wątrobowo - jelitowe, florę jelitową oraz dietę (rodzaj przyjmowanych pokarmów, soki, suplementy diety) jak i używki (np. alkohol, papierosy). Zgodnie z ogólną zasadą, leki są metabolizowane wolniej u noworodków i starszych w porównaniu z innymi grupami wiekowymi. Przykładem są glukuronoylotransferazy, które zaczynają się tworzyć dopiero od chwili urodzenia, dlatego u noworodków tylko w nieznacznym stopniu zachodzą procesy glukuronidacji. U dzieci do lat 8 szybkość biotransformacji jest natomiast większa niż u dorosłych, co może być związane z różnicą w masie wątroby w stosunku do masy ciała [Mutschler i wsp., 2010]. Do patologicznych czynników zmniejszających aktywność enzymów należą, m.in. starzenie

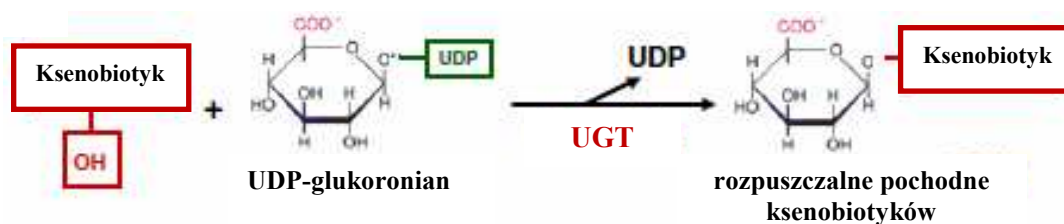
hepatocytów w chorobach wątroby, zmniejszenie przepływu krwi przez wątrobę w niewydolności serca jak i w chorobach nerek. Na tempo metabolizmu przeprowadzanego przez enzymy mikrosomalne duży wpływ mają także interakcje, czyli obecność w ustroju inhibitorów enzymatycznych, które hamują metabolizm leków i induktorów enzymatycznych, które wzmagają biotransformację leków. Wśród leków wyróżnia się zarówno inhibitory jak induktory enzymów, dlatego ważna jest znajomość, które z nich mogą mieć wpływ na efekt terapii poprzez terapeutyczne bądź toksyczne działanie [Badyal i Dadhick, 2001].

### 1.3. Charakterystyka enzymów II fazy metabolizmu

#### 1.3.1. UDP-glukuronylotransferazy

Sprzężenie z kwasem glukuronowym, czyli reakcja glukuronidacji, stanowi podstawowy mechanizm detoksykacji i eliminacji związków lipofilowych z organizmu [Ritter, 2000]. Kluczowymi enzymami biorącymi udział w tym procesie są UDP-glukuronylotransferazy (UGTs), które katalizują reakcje sprzęgania z kwasem glukuronowym około 40-70% wszystkich leków u ludzi [Wells i wsp., 2004, Jancova i wsp., 2010]

UGTs należą do rodziny enzymów mikrosomalnych integralnie związanych z błonami, katalizującymi tworzenie chemicznych wiązań między nukleofilowymi atomami O-, N-, S- lub C- z kwasem urydyno-difosfo-alfa-D-glukuronowym (UDPGA, uridine-5-diphospho- $\alpha$ -D-glucuronic acid) [Radomska-Pandya i wsp., 2002]. Enzymy te przenoszą hydrofilowe reszty kwasu glukuronowego na ich substraty, którymi są leki lub utlenione metabolity leku pochodzące z I fazy metabolizmu w wyniku czego powstają kwasy beta-D-glukopiranozoiduronowe (glukuronidy) (Rycina 2) [Gonzalez i Tukey, 2006].



**Rycina 2.** Reakcja sprzęgania z kwasem glukuronowym [na podstawie Gonzalez i Tukey, 2006]

Leki są wydalane do jelit po etapie reakcji glukuronidacji poprzez układ wątrobowo – żółciowy, następnie te produkty glukuronidacji ulegają rozkładowi poprzez bakteryjne beta-glukuronidazy [Gonzalez i Tukey, 2006; Jancova i wsp., 2010]. Wiele leków jest metabolizowanych najpierw w I fazie przez enzymy cytochromu P450 (CYP), po czym ulegają reakcji glukuronidacji, jednakże benzodiazepiny takie jak lorazepam, oksazepam czy temazepam są glukuronidowane bezpośrednio przez enzymy UGTs [Wynn i wsp., 2009].

U ludzi zidentyfikowano cztery rodziny glukuronylotransferaz UGT1, UGT2 (podrodziny 2A i 2B), UGT3 oraz UGT8. Pierwsze 2 rodziny wykorzystują kwas urydynodifosfo-glukuronowy do glukuronizacji związków endogennych i egzogennych. Enzymy UGT8 przeprowadzają procesy biosyntezy glikosfingolipidów i cerybrozydów używając UDP-galaktozy. Funkcja rodziny UGT3 nie jest dotąd dobrze poznana, ponieważ dopiero niedawno zidentyfikowano UGT3A1 [Mackenzie i wsp., 2008; Jancova i wsp., 2010]. U ludzi występują 22 geny kodujące białka UGT. Dziewięć jest kodowane przez miejsca UGT1 (UGT1A1, 1A3, 1A4, 1A5, 1A6, 1A7, 1A8, 1A9, 1A10), dziesięć przez rodzinę genów UGT2 (2A1, 2A2, 2A3, 2B4, 2B7, 2B10, 2B11, 2B15, 2B17, 2B28), dwa białka przez rodzinę UGT3 (3A1, 3A2) oraz jedno przez UGT8 (UGT8A1) [Miners i wsp., 2006; Court i wsp., 2008; Mackenzie i wsp., 2008; Sneitz i wsp., 2009].

Białka UGT2 są kodowane przez geny zlokalizowane tylko na chromosomie czwartym, a w strukturze każdego genu występuje sześć eksonów. Wszystkie enzymy UGT1 są produktami pojedynczego kompleksu genu znajdującego się na chromosomie 2 i mają wspólne eksony od 2 do 5, które kodują C-terminalną część białka enzymatycznego, natomiast ekson pierwszy koduje N - terminalną część białka będący unikatowy dla każdego z enzymów [Mackenzie i wsp., 2008; Ishii i wsp., 2010].

Enzymy należące do rodziny UGT1 takie jak UGT1A1, 1A3, 1A4, 1A6 oraz 1A9 ulegają ekspresji w wątrobie, gdzie większość ksenobiotyków jest metabolizowana. Wśród enzymów należących do rodziny UGT2 ekspresji w wątrobie ulegają UGT2B4, 2B7, 2B10, 2B11 i 2B15. Enzymy takie jak UGT1A7, UGT1A8 i UGT1A10 ulegają ekspresji głównie w przewodzie pokarmowym w przełyku, żołądku okrężnicy czy przewodach żółciowych [Jancova i wsp., 2010]. Ponad 1000 związków egzogennych włączając w to związki chemiczne, karcenogeny, flawonoidy i leki są substratami dla enzymów UGTs [Tukey i Strassburg, 2000]. Lekami głównie metabolizowanymi przez UGTs są lamotrygina (lek przeciwpadaczkowy), walproina, niesteroidowe leki przeciwzapalne, zidowudyna (lek o

działaniu anty-HIV) i większość opioidów (morfina, kodeina). Podobnie jak enzymy I fazy metabolizmu ksenobiotyków tak i UDP- glukuronozyltransferazy mają zarówno specyficzne jak i wspólne substraty i są wrażliwe na induktory i inhibitory w postaci leków. Może też występować inhibicja kompetycyjna pomiędzy substratami tych samych enzymów UGTs a także te same UGT induktory lub inhibitory mogą być metabolizowane przez inne enzymy UGTs lub inną drogą metabolizmu [Wynn i wsp., 2009].

Większość enzymów UGT wykazuje nakładającą się specyficzność substratową. Odkryto dwa selektywne inhibitory enzymów UGTs, pierwszy to hekogenina (saponina steroidowa) odpowiedzialna za hamowanie UGT1A4 oraz flukonazol hamujący aktywność UGT2B7, który jest głównym enzymem odpowiedzialnym za metabolizm opioidów [Coffman i wsp., 1998]. Wśród enzymów należących do UGT1 znajduje się izoforma UGT1A1, która jako jedyna metabolizuje bilirubinę, wykazuje także aktywność w koniugacji pojedynczych polifenoli, antrachinonów/flawonów, steroidów a także mniejszy udział w koniugacji fenolów i kumaryn. Wykazano, że bilirubina, inhibuje aktywność enzymatyczną UGT1A4 [Jancova i wsp., 2010].

Ekspresja UGT1A1 odgrywa znaczącą rolę w metabolizmie leków, ponieważ glukuronidyzacja bilirubiny jest etapem ograniczającym szybkość klirensu bilirubiny, a na szybkość tę mogą oddziaływać zarówno różnice genetyczne, jak i wiążące się substraty (leki). Brak sprawnego metabolizmu bilirubiny poprzez glukuronidyzację prowadzi do wzrostu jej stężenia w osoczu, co prowadzi do objawów klinicznych zwanych hiperbilirubinemią. Zespół Criglera-Najjara typu I jest diagnozowany jako całkowity brak aktywności enzymu (brak glukuronidacji bilirubiny), podczas gdy zespół Criglera-Najjara typu II jest odróżniany jako częściowo aktywny enzym z małymi ilościami glukuronidów bilirubiny w wydzielinach dwunastniczych (Tabela 2) [Gonzalez i Tukey, 2006; Jancova i wsp., 2010].

**Tabela 2.** UDP-glukuronylotransferazy i przykładowe substraty wraz z istonymi klinicznie defektami genetycznymi [Mutschler, 2010]

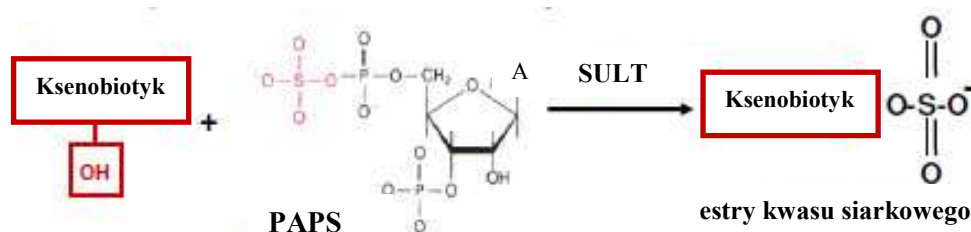
UDP-glukuronylotransferazy	Substrat	Zespół w przypadku defektu genetycznego
UGT1A1	Bilirubina Etynyloestradiol SN-38 (metabolit irynotekanu) Etopozyd	Zespół Criglera-Najjara Zespół Gilberta
UGT1A3	Norbuprenorfina	
UGT1A4	Amitryptylina Imipramina	
UGT1A6	Naproksen Paracetamol	
UGT1A9	Propofol	
UGT2B7	Kodeina Ibuprofen Ketoprofen Lorazepam Morfina Naproxen	

Przypadki z zespołem Gilberta dotyczące 8%-12% populacji kaukaskiej mają łagodną hiperbilirubinemię spowodowaną dinukleotydową insercją w promotorze genu UGT1A1, która obniża poziom transkrypcji genu. Jest on diagnozowany klinicznie, gdyż poziom bilirubiny jest od 60% do 70% wyższy niż prawidłowy [Gonzalez i Tukey, 2006]. Podobnie jak w przypadku wolnych metabolizerów genu CYP2D6, osobniki z wrodzoną hiperbilirubinemią mają podwyższone stężenie substratów enzymu UGT1A1. Ze względu, iż fenobarbital jest induktorem UGT1A1, w związku z tym lek ten używa się do obniżenia poziomu bilirubiny u pacjentów z częściowo aktywnym enzymem [Jansenn, 1999; Sugatani i wsp., 2001]. W przypadku osób z zespołem Gilberta, gdzie podaje się lek antynowotworowy irynotekan może dojść do ryzyka toksyczności hematologicznej i uszkodzenia komórek nabłonkowych jelit, ponieważ UGT1A1 jest głównym enzymem metabolizującym jego aktywną formę metaboliczną – SN-38 [Ando i wsp., 2002; Iyer i wsp., 1999, 2000]. Warto podkreślić, iż analiza genotypu w przypadku osób z polimorficznym genem UGT1A1 po podaniu irynotekanu wykazała zmniejszenie skutków ubocznych i wzrost skuteczności podawanego leku [Rauchschwalbe i wsp., 2002]. Ponadto, badania wstępne sugerują, że leczenie pacjentów poprzedzone dietą zawierającą bioflawonoid chryzynę obniża efekty irynotekanu w postaci biegunki, prawdopodobnie poprzez indukcję UGT1A1 w błonach

przewodu pokarmowego [Tobin i wsp., 2006]. Hiperbilirubinemia bez uszkodzeń komórek wątrobowych jest powszechnie wywoływana w przypadku leczenia infekcji HIV za pomocą inhibitorów proteaz takich jak indynawir czy atazanawir [Rotger i wsp., 2005]. Jest to spowodowane inhibicją przez te leki enzymu UGT1A1, pośredniczącego w glukuronidacji bilirubiny (Rotger i wsp. 2005; Zucker i wsp., 2001).

### 1.3.2. Sulfotransferazy

Sulfotransferazy (SULTs) są enzymami zlokalizowanymi w cytozolu komórki, które przeprowadzają reakcje sprzęgania z kwasem siarkowym pochodzącym z 3-fosfoadenozyno-5-fosfosiarczanu (PAPS) z grupami hydroksylowymi związków aromatycznych i alifatycznych (Rycina 3) [Gonzalez i Tukey, 2006; Hempel i wsp., 2007]. U ludzi zidentyfikowano 13 izoform SULT i zakwalifikowano je do czterech rodzin: SULT1 (1A1, 1A2, 1A3 i 1A4; 1B1; 1C2, 1C4; 1E1), SULT2 (SULT2A1, SULT2B1a, SULT2B1b), SULT4 (SULT4A1) i SULT6 (SULT6B1) [Lindsay i wsp., 2008].



**Rycina 3.** Reakcja sprzęgania z kwasem siarkowym (A-adenina) [na podstawie Gonzalez i Tukey, 2006]

Enzymy te odgrywają ważną rolę w metabolizmie szeregu endogennych niskocząsteczkowych związków organicznych (steroidy, katecholaminy, serotonina, jodotyronina, eikozanoidy, niektóre peptydy zawierające tyrozyne, retinol, 6-hydroksymelatonina, askorbinian i witamina D) a także biorą udział w biotransformacji ksenobiotyków (leki i inne związki chemiczne) [Glatt i Meinl, 2004; Gamage i wsp., 2006]. Metabolizm leków przebiegający na drodze sprzęgania z kwasem siarkowym często prowadzi



do powstania chemicznie aktywnych metabolitów, które mogą działać rakotwórczo i mutagennie [Surh, 1998].

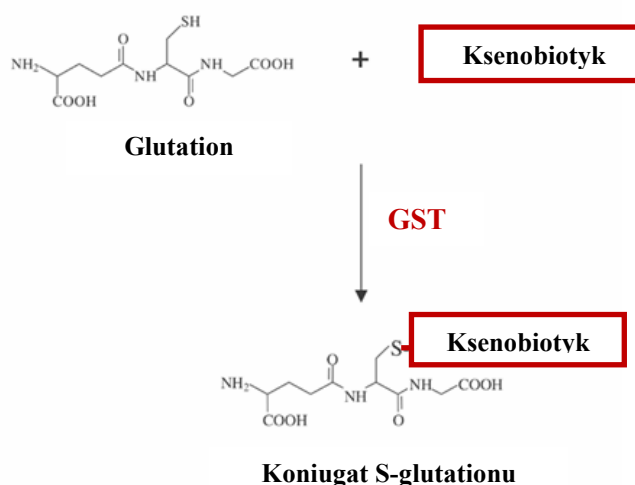
Sulfotransferazy wykazują szeroką dystrybucję tkankową. Obecność członków z podrodziny SULT1A stwierdzono w wątrobie, mózgu, piersi, jelicie czczym, płucach, nadnerczach, endometrium, łożysku, nerkach i płytkach krwi. SULT1A1 najwyższy poziom ekspresji spośród wszystkich SULT1 wykazuje w wątrobie, najliczniej występuje w tkankach ludzkich i wykazuje szeroką specyficzność substratową. W odróżnieniu od SULT1A1, SULT1A3 ulega ekspresji w większości tkanek z wyjątkiem wątroby u dorosłych osób [Jancova i wsp., 2010].

Uważa się, że w metabolizmie leków uczestniczą głównie izoformy należące do rodziny SULT1, z czego najważniejsze znaczenie ma SULT1A1, wykazujący dużą różnorodność katalityczną wobec reakcji sprzęgania z kwasem siarkowym wielu ksenobiotyków. SULT1A1 katalizuje również reakcje sprzęgania z kwasem siarkowym cząstek fenolowych, takich jak monocykliczne fenole, naftol, alkohol benzyłowy, aromatyczne aminy, hydroksyloaminy, dopamina i jodotyronina [Glatt i Meinl, 2004]. Do selektywnego wykrywania aktywności SULT1A1 stosuje się często 4-nitrofenol [Dajani i wsp., 1998].

Ponadto, sulfotransferazy pełnią także istotną funkcję w utrzymaniu prawidłowej homeostazy w organizmie. Enzym SULT1B1 bierze udział w katalizowaniu cholesterolu i hormonów tarczycy a powstający siarczan cholesterolu ma szczególne znaczenie w różnicowaniu keratynocytów i rozwoju skóry. SULT1A3 jest selektywny dla katecholamin natomiast SULT1E1 katalizuje reakcje sprzęgania estrogenów z kwasem siarkowym, podczas gdy SULT2A1 metabolizuje dehydroepiandrosteron (DHEA) [Gonzalez i Tukey, 2006].

### 1.3.3. S-transferazy glutationowe

S-transferazy glutationowe (GSTs) pełnią funkcję detoksykacyjną polegającą przede wszystkim na katalizowaniu reakcji sprzęgania endogennego glutationu z elektrofilowymi metabolitami powstającymi w I fazie procesu biotransformacji (Rycina 4). Enzymy te chronią komórki zarówno przed szkodliwymi oddziaływaniami związków chemicznych o właściwościach elektrofilnych, jak i przed produktami stresu oksydacyjnego [Gonzalez i Tukey, 2006]. Kosubstratem w tej reakcji jest glutation – tripeptyd syntetyzowany z kwasu gamma – glutaminowego, cysteiny i glicyny.



**Rycina 4.** Reakcja sprzęgania z glutationem [na podstawie *Gonzalez i Tukey, 2006*]

Mechanizm poprzez który S-transferaza glutationowa zwiększa szybkość reakcji sprzęgania związku chemicznego związany jest z deprotonacją cząsteczki glutationu (GSH do GS<sup>-</sup>), w czym bierze udział aktywna reszta aminokwasu tyrozyny (Tyr-O<sup>-</sup>) znajdującej się w centrum katalitycznym transferazy. W reakcjach sprzęgania katalizowanych przez S-transferazy glutationowe wyróżnić można reakcje wymiany, w których glutation zastępuje atom elektrofilowy lub całe ugrupowanie o takich właściwościach oraz reakcje addycji, w których glutation jest przyłączony do aktywnego wiązania podwójnego lub do naprężonego systemu pierścieniowego jaki może powstawać, np. w czasie reakcji oksydacji z udziałem cytochromu P450, kiedy powstają tlenki arenowe albo epoksydy alkenowe [*Lutz i wsp., 2001*].

U ludzi GSTs podzielono na dwie podrodziny: formy cytozolowe i mikrosomalne. Główną różnicą w działaniu pomiędzy nimi jest dobór substratów do sprzęgania. Forma cytozolowa odgrywa znaczącą rolę w metabolizmie leków i ksenobiotyków, podczas gdy mikrosomalne GSTs są ważne w metabolizmie związków endogennych, takich jak eikozanoidy, glutation, leukotrieny i prostaglandyny. S-transferazy glutationowe występujące w cytoplazmie są dimerami, natomiast te obecne w mikrosomach są trimerami. Wśród cytozolowych GSTs wymienia się siedem klas: alfa (GSTA1 i 2), mi (od GSTM1 do M5), omega (GSTO1), pi (GSTP1), sigma (GSTS1), teta (GSTT1 i 2) oraz zeta (GSTZ1) [*Oakley, 2005*].

GSTs występujące w klasie alfa i mi mogą tworzyć heterodimery, pozwalające na powstanie licznych, aktywnych transferaz. Katalityczna aktywność tych enzymów jest związana przede wszystkim z detoksykacją kancerogenów, leków przeciwnowotworowych i pestycydów. GSTs uczestniczą również w detoksykacji reaktywnych metabolitów, powstałych w czasie stresu oksydacyjnego, m.in. alfa-, beta- nienasycone karbonyle, chinony i wodoronadtlenki [Sheehan i wsp., 2001]. Jako wielofunkcyjne białka pełnią rolę także jako białka transportujące związki, które są słabo rozpuszczalne w wodzie. Inną funkcją S-transferaz glutationowych jest ochrona przed reaktywnymi formami tlenu (RFT), które powodują uszkodzenia w kwasach nukleinowych, białkach czy lipidach będące odpowiedzialne za patogenezę wielu schorzeń. Funkcja ochronna GSTs w odniesieniu do lipidów opiera się na sprzęganiu ich reaktywnych, aldehydowych produktów peroksydacji m.in. 4-hydroksynonenalu (4-HNE), który to odgrywa istotną rolę w komórkowej sygnalizacji, w tym również przekazywaniu sygnałów także do apoptozy [Gallager i wsp., 2006]. Biorąc pod uwagę powyższy fakt wykazano, iż zwiększona ekspresja GST klasy alfa jest ważnym mechanizmem chroniącym komórki przed indukowanym stresem oksydacyjnym – apoptoza. W badaniach immunoprecypitacyjnych zaobserwowano również, że w wątrobie i jądrach ludzi oraz szczurów około 50-60% całkowitej aktywności peroksydacyjnej w stosunku do hydronadtlenków fosfolipidowych przypisuje się GSTs klasy alfa, wskazując ich znaczenie w regulacji peroksydacji [Yang i wsp., 2001].

Ponadto, enzymy S-transferazy glutationu pełnią istotną rolę w detoksykacji związków, przy czym ich aktywność w komórce nowotworowej wiąże się z rozwojem oporności na leki chemioterapeutyczne zarówno będące jak i nie substratami dla GSTs. Skuteczność większości leków przeciwnowotworowych opiera się na zapoczątkowaniu śmierci komórkowej lub apoptozy w wyniku aktywacji kinaz białkowych aktywowanych mitogenem (MAPK), takich jak JNK i p38. Jednakże rezultaty badań wykazały, że nadmierna ekspresja GSTs wiąże się z opornością na apoptozę oraz zahamowaniem aktywności kinazy MAPK. Zaobserwowano również, że w komórkach nowotworowych poziom aktywności GSTs ulega znacznemu podwyższeniu prowadząc tym samym do redukcji aktywności kinazy MAPK oraz obniżeniu skuteczności chemioterapii [Gonzalez i Tukey, 2006; Zaremba, 2005]. Biorąc pod uwagę wysoki poziom GST w komórkach nowotworowych, zahamowanie aktywności GST jest wykorzystywane jako strategia terapeutyczna modulowania oporności na lek, prowadząc do uwrażliwienia guzów na leki przeciwnowotworowe.

Ze względu na fakt, iż izoenzymy GST biorą udział nie tylko w metabolizmie różnego rodzaju ksenobiotyków, ale także endogennych substratów stąd ich zmieniona ekspresja w określonych tkankach może być ważnym wskaźnikiem diagnostycznym. Zwiększone poziomy GST klasy alfa, mi i pi mogą być związane z ochroną tkanek przed cytotoksycznością, a także kancerogennym działaniem paracetamolu, tetrachlorku węgla i aflatoksyny B1. Oczyszczone GST mi i pi wykazują duże aktywności wobec epoksydów i epoksydioli. Związki te powszechnie występują w środowisku człowieka, m.in. w dymie tytoniowym. [Coles i wsp., 1999; Krajka-Kuźniak, 2007]

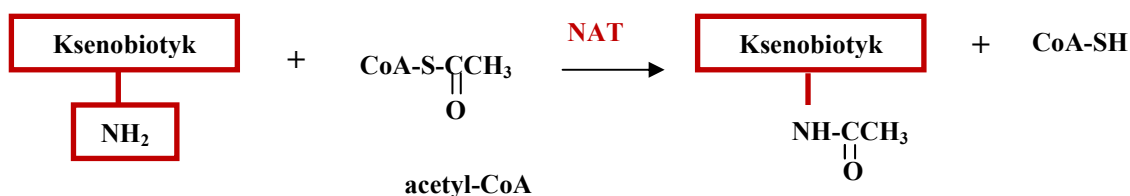
W klasie pi S-transferaz glutationowych (GST P) wykryto dotychczas tylko jeden gen oznaczony jako GST P1, który jest zlokalizowany na chromosomie 11q13. Wykazano, że poziom ekspresji izoformy GST pi ma wpływ na rozwój i przeżywalność komórek nowotworowych oraz na ich ochronę przed apoptozą [Gajewska i wsp., 2007]. Nadekspresja GSTP1 chroni komórki gruczołu krokowego przed cytotoksycznością i uszkodzeniami DNA wywołanymi ekspozycją na heterocykliczną amine, 2-amino-1-metylo-6-fenylimidazo(4,5-b)pirydynę. Celowana delecja genu GSTP1 zwiększała wrażliwość myszy na kancerogenezę skóry [Talalay i wsp., 2003].

Ekspresję izoenzymów klasy pi wykazano w większości badanych narządów człowieka: płucu, pęcherzu moczowym, okrężnicy, w tkankach jąder i prostaty, erytrocytach i limfocytach krwi obwodowej, a także w niewielkiej ilości w wątrobie i nadnerczach. Charakterystyczny dla każdej tkanki skład izoenzymów S-transferaz glutationowych oraz aktywność katalityczna mogą się zmieniać w rozwoju osobniczym, a także być modulowane przez szereg czynników endogennych (np. hormony) i egzogennych (np. induktory chemiczne). Specyficznym substratem dla GSTP1 jest kwas etakrynowy a ekstrakt z *Ginkgo biloba* jest jego induktorem [Lutz i wsp., 2001].

Większość S-transferaz glutationu jest polimorficzna. Przykładem jest allel GSTM1\*0 występujący u 50% populacji rasy białej, który często jest związany z ryzykiem wystąpienia nowotworów płuc, okrężnicy i pęcherza, natomiast zerowa aktywność genu GSTT1 prowadzi do toksyczności leków cytotoksycznych stosowanych w chemioterapii. Jak wykazano w populacji chińskiej i koreańskiej ekspresja zerowego genotypu GSTT1 osiąga wartość 60%, co może skutkować zmianą w skuteczności terapii i być przyczyną nasilenia działań niepożądanych stosowanych leków, będących substratami tego enzymu [Gonzalez i Tukey, 2006].

### 1.3.4. N-acetylotransferazy

N-acetylotransferazy (NATs) obecne w cytozolu odpowiedzialne są za metabolizm leków i czynników środowiskowych, które zawierają aromatyczne aminy lub grupy hydrazynowe. N-acetylacja amin aromatycznych (R-NH<sub>2</sub>) i hydrazyn (R-NH-NH<sub>2</sub>) do aromatycznych amidów (R-NH-COCH<sub>3</sub>) i hydrazydów (R-NH-NH-COCH<sub>3</sub>) przebiega z udziałem acetylokoenzymu A (Rycina 5) [Kłodowska-Duda i wsp., 2005]. N-acetylotransferazy katalizują przeniesienie grupy acetylowej z acetylokoenzymu A do terminalnej grupy aminowej aryloamin, arylohydrazyn i niektórych amin heterocyklicznych [Zabost i wsp., 2011].



**Rycina 5.** Reakcja acetylacji przy udziale N-acetylotransferazy [ na podstawie Kłodowska-Duda i wsp., 2005]

U człowieka aktywność acetylotransferaz jest kontrolowana przez dwa geny: NAT1 i NAT2, które znajdują się na chromosomie 8q22 i wykazano, że sekwencje kodujące obydwu genów są homologiczne w 85% [Hein, 2002; Jancova i wsp., 2010]. Pomimo wysokiego poziomu homologii NATs różnią się specyficznością substratową jak i dystrybucją tkankową. NAT1 ulega głównie ekspresji w wątrobie i wielu innych tkankach, natomiast NAT2 występuje w znacznej ilości w wątrobie i jelitach [Gonazalez i Tukey, 2006].

Specyficznymi substratami dla ludzkiego NAT1 są kwas p-aminobenzoowy, kwas p-aminosalicylowy i p-aminobenzylglutaminowy, podczas gdy sulfametazyna jest używana jako selektywny substrat dla NAT2 [Kawamura i wsp., 2005]. N-acetylotransferazy metabolizują szereg leków, które zamieszczono w tabeli 3.

**Tabela 3.** Leki metabolizowane przez N-acetylotransferazy (*Gonzalez i Tukey, 2006*)

Lek	Wskazanie
Acetobutalol	Nadciśnienie, arytmie
Amantadyna	Lek antywirusowy stosowany w leczeniu i profilaktyce grypy typu A oraz w chorobie Parkinsona
Aminoglutetimid	Rak prostaty, rak piersi
Amonafid	Rak prostaty
Amrinon	Niewydolność mięśnia sercowego
Benzokaina	Znieczulenie miejscowe
Dapson	Wszelkie postaci trądu, opryszczkowe zapalenie skóry, zapalenie chrząstek stawowych, choroba Crohna
Dipyron	Lek przeciwbólowy stosowany m.in. nerwobóle, napady kolki żółciowej i nerkowej
Fenelzyna	Depresja
Hydralazyna	Nadciśnienie
Izoniazyd	Gruźlica
Klonazepam	Różne formy padaczki
Kofeina	Niemowlęcy zespół zaburzeń oddechowych
Kwas aminobenzoowy	Schorzenia skórne, oparzenia słoneczne
Metamizol	Bóle różnego pochodzenia, stany gorączkowe nieustępujące po innych lekach
Nitrazepam	Bezsennosc różnego pochodzenia, środek uspakajający przed zabiegiem operacyjnym, niektóre formy padaczki u dzieci
Prokainamid	Tachyarytmia komorowa
Sulfonamidy	Leki przeciwbakteryjne

Opisano hamujące działanie związków polifenolowych na ludzkie NATs. Kwas kawowy, kamferol czy genisteina obniżają aktywność NAT1 a kumaryna jest inhibitorem NAT2 [Kukongviriyapan i wsp., 2006]. Wykazano również hamowanie aktywności NATs poprzez siarczki zawarte w czosnku: siarczek diallylu (DAS) i dwusiarczek diallylu (DADS) w ludzkich liniach komórkowych raka okrężnicy oraz białaczki promielocytowej [Chen i wsp., 1998, Lin i wsp., 2002]. Jak dotąd mało wiadomo o indukcji NATs. Badano wpływ androgenów na ekspresję NAT1 w ludzkich liniach komórkowych raka prostaty, gdzie wyniki badań pokazują wzrost ekspresji ludzkiego NAT1 [Butcher i wsp., 2007].

Ponadto, szybkość acetylacji jest cechą zdeterminowaną genetycznie i jest ona stała u każdego człowieka. Ze względu na szybkość przebiegu reakcji acetylacji głównie izoniazydu i sulfadimidyny w populacji ludzkiej wyróżnia się dwie fenotypowe grupy: szybkich i

wolnych acetylatorów. Enzym kodowany przez NAT2 wykazuje polimorfizm, który jest wynikiem mutacji punktowych. Aktywność N-acetylotransferazy 2 jest uwarunkowana kombinacjami 53 różnych alleli, zawierających od jednej do czterech zmian w sekwencji nukleotydu [Zabost i wsp., 2011]. Znaczenie terapeutyczne polimorfizmów NATs polega na unikaniu toksyczności indukowanej przez leki. Na przykład hydralazyna – popularny lek przeciwnadciśnieniowy jest metabolizowana przez NAT2. Działanie terapeutycznych dawek hydralazyny u wolnych acetylatorów może powodować niedociśnienie i tachykardię [Gonzalez i Tukey, 2006].

Postęp wiedzy jaki dokonał się w ostatnich latach w obszarze nauk medycznych umożliwił badaczom w większym stopniu zrozumienie kwestii zmienności międzyosobniczej w aktywności izoform NAT1 i NAT2, ich zdolności do katalizowania reakcji N-hydroksyacetylacji metabolitów z dwupierścieniowymi, aromatycznymi węglowodorami i N-acetylacji dwupierścieniowych aromatycznych amin egzogenego pochodzenia. W świetle obecnego stanu wiedzy konsekwencją katalizy reakcji N-hydroksyacetylacji jest nieenzymatyczne uwolnienie grup acetylowych (deacetylacja) i powstanie wysokoreaktywnych jonów nitrenium, co może prowadzić do aktywacji środowiskowych toksyn. Istotny jest również fakt, że u osób charakteryzujących się intensywną (szybką) acetylacją dochodzi do efektywnego metabolizowania i ich detoksykacji w wątrobie, w przeciwieństwie do wolnych acetylatorów, u których kumulują się dwupierścieniowe aromatyczne aminy będące substratami w procesie oksydacji, zależnym od CYP. Jednym z miejsc w organizmie ludzkim, w którym dochodzi do efektywnej katalizy N-hydroksyacetylacji, deacetylacji wspomnianych amin, a w konsekwencji do generowania potencjalnie mutagennych jonów nitrenium, szczególnie u osób z defektem NAT2 jest nabłonek powierzchniowy pęcherza. Wykazano, iż u wolnych acetylatorów poddanych ekspozycji na dwupierścieniowe aminy aromatyczne egzogenego pochodzenia zwiększa się ryzyko występowania zmian nowotworowych pęcherza moczowego [Gonzalez i Tukey, 2006].

#### 1.4. Regulacja aktywności enzymów II fazy metabolizmu

Ekspresja genów kodujących enzymy II fazy metabolizmu ksenobiotyków w tym również leków zależy od aktywacji wielu czynników transkrypcyjnych, takich jak receptor węglowodorów aromatycznych (AhR), konstytutywny receptor androstanu (CAR), receptor pregnanu X (PXR), receptor farnezoidu X (FXR), receptor  $\alpha$  aktywowany przez proliferatory peroksysomów (PPAR $\alpha$ ), czynnik transkrypcyjny Nrf2 (ang. *nuclear erythroid 2-related factor*), HNF1 $\alpha$  (ang. *hepatocyte nuclear factor 1  $\alpha$* ) oraz C/EBP $\beta$  (ang. *CCAAT-enhancer binding protein- $\beta$* ). Zarówno związki pochodzenia endogennego jak i egzogennego mogą modulować aktywność wymienionych czynników transkrypcyjnych wpływając jednocześnie na regulację transkrypcji enzymów II fazy metabolizmu (Tabela 4) [Mutschler, 2010; Yang i wsp., 2010].

**Tabela 4.** Regulacja aktywności enzymów II fazy z udziałem wybranego receptora [Mutschler, 2010]

Receptor	Miejsce ekspresji	Regulowany gen	Induktor
Receptor węglowodorów aromatycznych (AhR)	Wątroba, nerki, język	UGT1A1, UGT1A2	$\beta$ -naftoflawon, policykliczne węglowodory aromatyczne
Receptor konstytutywny androstanu (CAR)	Wątroba	UGT1A1	Fenobarbital, fenytoina
Receptor farnazyloy X (FXR)	Przewód pokarmowy, wątroba, nerki	UGT2B4	Kwasy żółciowe
Receptor alfa aktywowany przez proliferatory peroksysomów (PPAR $\alpha$ )	Wątroba, serce, mięśnie, nerki	UGT1A9, UGT2B4	Fibraty
Receptor pregnanu X (PXR)	Przewód pokarmowy, wątroba, limfocyty	UGT1A1, UGT1A3	Bosentan, karbamazepina, glukokortykosteroidy, fenobarbital, rifampicyna, ritonawir i inne
Receptor witaminy D (VDR)	Przewód pokarmowy	SULT2A1	Kalcytriol

AhR w stanie nieaktywnym występuje jako dimer związany z białkiem szoku termicznego (HSP90). Indukcja tego receptora następuje w wyniku przyłączenia ligandu (wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne – PAH, dioksyny), co prowadzi do rozpadu



kompleksu AhR-HSP90. Receptor następnie wiąże się z białkiem ARNT (translokator jądrowy receptora Ah) i jako heterodimer może wiązać się ze sekwencją DNA genu docelowego ARE (ang. antioxidant responsive element). Innym białkiem uczestniczącym w regulacji aktywności enzymów II fazy jest hepatocytowy czynnik jądrowy HNF1 $\alpha$ , który występuje jako homodimer a jego stężenie jest regulowane przez HNF4, HNF3 i C/EBP. Uważa się, że efekt aktywacji transkrypcji enzymów UGT jest wynikiem działania HNF1 $\alpha$  [Yang i wsp., 2010].

W metabolizmie leków z udziałem enzymów II fazy istotną rolę odgrywają receptory jądrowe PXR i CAR, które po aktywacji przemieszczają się z cytoplazmy do jądra komórkowego, gdzie tworzą heterodimer z receptorem kwasu retinoidowego (RXR) [Yang i wsp., 2010]. Receptor pregnanu X bierze udział w indukcji enzymów I fazy CYP3A, CYP2B, transporterów leków m.in. MRP1 oraz enzymów II fazy SULTs i UGTs, przez co ułatwia metabolizm i wydalanie ksenobiotyków z organizmu. Indukcja tego receptora zachodzi pod wpływem ligandów pochodzenia egzogenne (leki, składniki diety – kumestrol i karotenoidy) i endogenne (hormony steroidowe - progesteron, estrogen, korytykosteron, 5 $\beta$ -pregnan i androstanol) [Blumberg i wsp., 1998; Moore i wsp., 2000a; Pichard-Garcia i wsp., 2000]. Ponadto, hiperforyna jako składnik dziurawca zwyczajnego- preparatu na depresję również silnie aktywuje PXR [Moore i wsp., 2000b].

Jądrowy receptor CAR uczestniczy w aktywacji CYP2B, CYP3A, CYP2C oraz enzymów II fazy metabolizmu leków GSTs, SULTs i UGTs [Sueyoshi i wsp., 1999; Tzamelis i wsp., 2000]. W cytozolu tworzy nieaktywny kompleks z białkami opiekuńczymi typu HSP90 (ang. *HSP90 chaperon*) i białkiem cytoplazmatycznym CCRP (ang. *cytoplasmic CAR retention protein*) [Kobayashi i wsp., 2003], który to po aktywacji rozpada się a zaaktywowany CAR ulega translokacji do jądra komórkowego tworząc heterodimer z RXR. Potencjalnym aktywatorem CAR jest 5 $\beta$ -pregnan, natomiast wśród deaktywatorów wymienia się androstanol i klotrimazol, które hamują ekspresję genów aktywowanych przez ten receptor [Forman i wsp., 1998; Moore i wsp., 2000a]. Ponadto, CAR może być konstytutywnie aktywny bez obecności ligandu, ponieważ posiada w domenie wiążącej ligand subdomeny AF-2, która to jest stabilizowana do aktywnej konformacji [Xu i wsp., 2004; Suino i wsp., 2004; Shan i wsp., 2004].

Inny przykład regulacji aktywności enzymów II fazy dotyczy białka wiążącego się z sekwencją CCAAT (ang. CCAAT enhancer binding proteins) czyli C/EBP $\beta$ , który jest czynnikiem transkrypcyjnym odpowiedzialnym za ekspresję genów kodujących enzymy

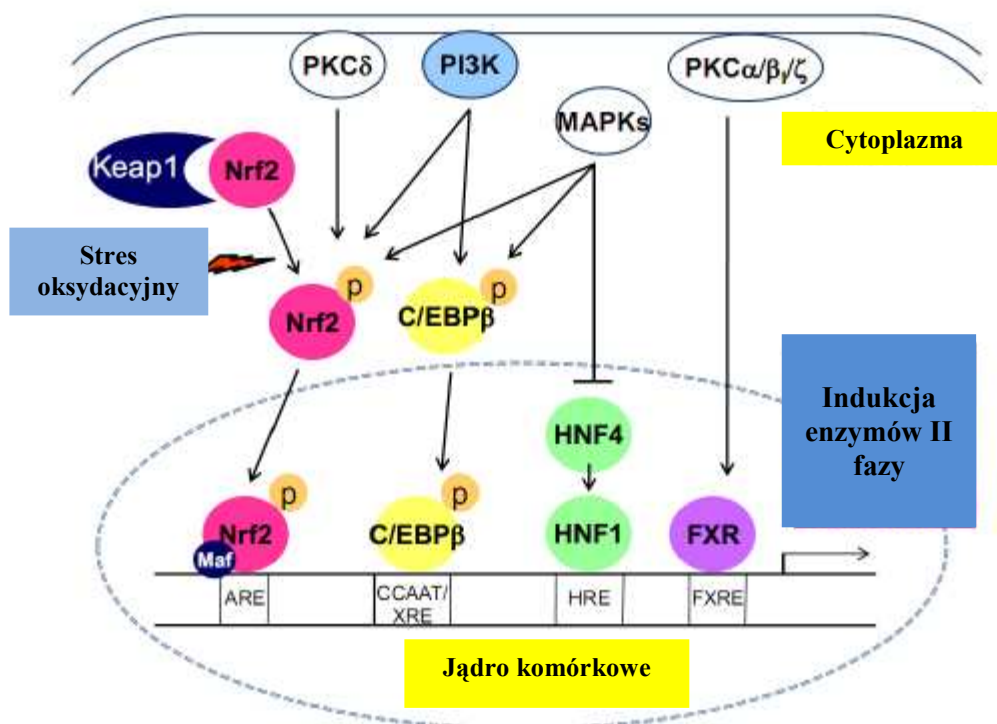
uczestniczące w reakcji sprzęgania lub biorących udział w procesach antyoksydacyjnych. Aktywność C/EBP $\beta$  może być regulowana poprzez fosforylację kinazą rybosomalną S6 p90 (RSK1), co prowadzi do translokacji tego czynnika z cytoplazmy do jądra komórkowego [Buck i Chojkier, 2003].

Wykazano, że ceramid może zmniejszać aktywność transkrypcyjną C/EBP $\beta$  w wyniku zmniejszonej jego fosforylacji, natomiast oltipraz (lek przeciwnowotworowy) indukuje C/EBP $\beta$ . Stosowanie prostaglandyny J2 także indukuje GSTA2 poprzez aktywację C/EBP $\beta$  jak i Nrf2. W większości przypadków jak dowiedziono, ekspresja genów kodujących enzymy II fazy metabolizmu może być wspólnie regulowana zarówno poprzez czynnik transkrypcyjny C/EBP $\beta$  jak i jądrowy czynnik Nrf2 [Yang i wsp., 2010; Kang i wsp., 2003; Sprott i wsp., 2002].

#### 1.4.1. Szlak Nrf2-Keap1-ARE

Istotną rolę w indukcji enzymów II fazy odgrywa czynnik transkrypcyjny Nrf2 (ang. nuclear erythroid 2-related factor), który ma zdolność wiązania się z elementem odpowiedzi antyoksydacyjnej (ARE) jądrowego DNA. Czynnikiem ten bierze udział w aktywacji wielu genów kodujących białka o działaniu cytoprotekcyjnym, które to deaktywują elektrofilowe metabolity, rozkładają RFT i uczestniczą w stabilizacji potencjału oksydoredukcyjnego. Do białek aktywowanych przez Nrf2 należą m.in. GSTs, NQO1, hydrolaza epoksydowa, reduktaza glutationu, UDP-glukuronylotransferaza, katalaza czy dysmutaza nadadtlenkowa [Holtzclaw i wsp., 2004; Yang i wsp., 2010]. W badaniach eksperymentalnych wykazano, że myszy pozbawione genu *nrf2* w wątrobie i żołądku wykazywały większą podatność na czynniki cytotoksyczne i genotoksyczne, ze względu na obniżoną ekspresję GSTs klasy 1, 3 i 2 oraz NQO1 [Chanas i wsp., 2002; Yu i Hensler, 2005].

Modulacja aktywności czynnika Nrf2 zachodzi poprzez białko inhibitorowe Keap1, które to pod wpływem induktora może zmieniać swoją konformację prowadząc do uwolnienia Nrf2, translokacji do jądra komórkowego, związania z ARE i aktywacji genów podlegających jego regulacji [Yang i wsp., 2010].(Rycina 6)



**Rycina 6.** Aktywacja czynników transkrypcyjnych, które prowadzą do indukcji enzymów II fazy metabolizmu. ARE – element odpowiedzi antyoksydacyjnej, XRE – element odpowiedzi na ksenobiotyk, HRE – element odpowiedzi na hormon, FXRE- element odpowiedzi na FXR [Yang i wsp., 2010]

Wykazano, że niektóre związki naturalne i syntetyczne, m.in. resweratrol, kurkumina, sulforafan oraz altipraz mogą aktywować układ Nrf2-Keap1-ARE [Talalay i wsp., 2003; Köhle i Bock, 2006]. Ponadto, czynnik transkrypcyjny Nrf2 może również podlegać aktywacji w procesie fosforylacji z udziałem kinaz, takich jak kinazy białkowe aktywowane przez mitogen (MAPK), kinazy białkowe C (PKC), kinazę fosfatydyloinozytolu (PI3K) czy także poprzez kinazę białkową umiejscowioną w retikulum endoplazmatycznym (PERK) [Kwak i wsp., 2004; Yang i wsp., 2010]. Taka indukcja ścieżki sygnałowej NRF2-ARE prowadząca do stymulacji syntezy enzymów II fazy inaktywuje zarówno reaktywne metabolity egzogennych kancerogenów, jak i endogennych czynników uszkadzających DNA stanowiąc unikalny cel działania czynników chemioprewencyjnych. Fakt ten można tłumaczyć tym, iż nadekspresja GSTP1 chroni komórki gruczołu krokowego przed cytotoksycznością i uszkodzeniami DNA po zastosowaniu m.in. heterocyklicznej aminy określanej PhIP (2-amino-1-metylo-6-fenylimidazo[4,5-b]pirydynę, podczas gdy delecja genu GSTP1 lub NQO1 zwiększa wrażliwość na kancerogenezę [Talalay i wsp., 2003].

W badaniach klinicznych wykazano natomiast, iż utrata ekspresji GSTT1 zwiększa ryzyko wystąpienia raka przewodu pokarmowego, pęcherza i skóry, a genotyp null związany jest z wysokim ryzykiem nowotworów jamy ustnej i płuc przy łącznym paleniu nikotyny [Landi, 2000]. Podkreślono również fakt, iż zwiększona ekspresja GSTs w terapii przeciwnowotworowej może prowadzić do rozwoju oporności na leki chemioterapeutyczne ze względu na przyspieszony ich metabolizm i eliminację z komórki nowotworowej, co zwiększa jej szanse na przeżycie.

### **1.5. Wpływ preparatów pochodzenia roślinnego na metabolizm leków**

Spożycie preparatów pochodzenia roślinnego na świecie charakteryzuje się tendencją wzrostową. Niepokojący wydaje się być fakt, że znaczna część osób spożywa je jednocześnie z innymi lekami syntetycznymi, co przyczynia się do wzrostu ryzyka wystąpienia interakcji typu lek syntetyczny - preparat ziołowy [Mohamed i Frye, 2011]. Interakcje te zachodzą przy udziale enzymów I i II fazy metabolizmu leków, czyli odpowiednio enzymów cytochromu P450 i transferaz biorących udział w procesach między innymi glukuronidacji, acetylacji, metylacji [Jancova i wsp., 2010]. Wnikliwa analiza literatury naukowej pokazuje, że dotychczas przeprowadzono niewiele badań klinicznych w zakresie interakcji zachodzących z udziałem enzymów II fazy metabolizmu leków, w szczególności transferaz biorących udział w procesie glukuronidacji.

Substancje aktywne pochodzenia roślinnego stanowią substraty dla enzymów UGT, w związku z tym wchodzi one w interakcje typu preparat roślinny - lek syntetyczny [Mohamed i Frye, 2011]. Badania *in vitro* oraz badania na zwierzętach wykazały, że w interakcjach tych uczestniczą surowce roślinne takie jak: żurawina, miłorząb, zielona herbata, głóg, soja, ziele dziurawca i korzeń kozłka, które modulują aktywność enzymów UGT. Nieznane są natomiast skutki tych interakcji *in vivo*, dlatego też istnieje potrzeba dalszych badań w celu określenia ich klinicznych konsekwencji [Mohamed i Frye, 2011]. W tabeli 5 zaprezentowano wyniki kilku badań *in vitro* i badań na zwierzętach dotyczących wpływu wybranych preparatów pochodzenia roślinnego na enzymy biorące udział w procesie glukuronidacji.

**Tabela 5.** Wpływ wybranych preparatów pochodzenia roślinnego na enzymy UGT [Mohamed i Frye, 2011]

Produkt/preparat	Substancja czynna	Enzym UGT <i>in vitro</i>	Enzym UGT <i>in vivo</i>
<i>Ginkgo biloba</i>	flawonoidy	↑UGT2B17 ↓UGT1A1 ↓UGT1A9	↑UGT (niespecyficznie)
	ekstrakt	↓UGT1A9	-
<i>Camellia sinensis</i>	galusan epigallokatechiny (EGCG)	↓UGT1A1	-
	polifenole	↓UGT1A	-
	ekstrakt	-	↑UGT1A
<i>Glycine max</i>	genisteina	↓UGT1A1	-
	daidzeina	↑UGT1A1	-
	ekstrakt	↓UGT2B15	-
<i>Hypericum perforatum</i>	kwercecytyna	↑UGT2B17 ↓UGT1A1 ↓UGT1A9	↑UGT (niespecyficznie)
	hiperycyna	↓UGT1A6	-
	ekstrakt	↓UGT1A1	-
<i>Valeriana officinalis</i>	Ekstrakt/kwas walerenowy	↓UGT1A1 ↓UGT2B7 ↓UGT (niespecyficznie)	-

Analiza interakcji dotycząca metabolizmu leków z udziałem enzymów I i II fazy budzi duże zainteresowanie wśród lekarzy i farmaceutów zmierzających w kierunku zapewnienia profesjonalnej opieki medycznej mającej na względzie przede wszystkim bezpieczeństwo pacjenta. Kontrolowane przyjmowanie preparatu roślinnego zmniejsza ryzyko niepowodzeń terapii i niekorzystnych skutków zdrowotnych. W tym celu podejmowane są prace eksperymentalne zmierzające do wyjaśnienia mechanizmów zachodzenia interakcji i poszukiwania egzogennych oraz endogennych czynników zmieniających metabolizm ksenobiotyków, biorąc pod uwagę fakt, iż większość preparatów pochodzenia roślinnego mogą modulować aktywność enzymów I i II fazy.

## 1.6. Charakterystyka surowców roślinnych badanych w pracy

### 1.6.1. Zielona herbata (*Camellia sinensis*)

Produkt w postaci herbaty, uzyskiwany z liści i pączków *Camellia sinensis* (rodzina kameliowata - *Camelliaceae*), pochodzi z Chin i uznawany jest za drugi najczęściej spożywany napój na świecie [Rietveld i Wiseman, 2003.]. W zależności od procesu produkcji, herbaty klasyfikowane są na trzy główne typy: "niesfermentowany" (produkowany poprzez suszenie i gotowanie na parze świeżych liści celem inaktywacji oksydazy polifenolowej, co zapobiega utlenianiu), "pół-fermentowany" (wytwarzany w wyniku poddawania świeżych liści procesowi częściowej fermentacji przed suszeniem) i "fermentowany" – herbata czarna i czerwona (Pu-Erh) (poddawane po zbiorze procesowi fermentacji przed suszeniem na parze), Fermentacja czarnej herbaty jest wynikiem reakcji utleniania katalizowanej przez oksydazę polifenolową a Pu-Erh jest uzyskiwana z udziałem mikroorganizmów [McKay i Blumberg, 2002].

Zielona herbata uznawana była za napój o korzystnych właściwościach zdrowotnych już od czasów starożytnych. W tradycyjnej medycynie chińskiej zaleca się ją jako środek przeciwbólowy w łagodzeniu bólów głowy, mięśni, wspomaganie procesu trawienia, w łagodzeniu objawów depresji, w detoksykacji, przyczynia się do obniżenia ryzyka wystąpienia chorób sercowo-naczyniowych i licznych nowotworów oraz w celu ogólnej poprawy jakości życia i przedłużenia czasu jego trwania [Mohamed i Frye, 2011]. Liście zielonej herbaty zawierają trzy główne składniki aktywne: kofeina i teofilina, olejki eteryczne, w szczególności związki polifenolowe [Varnam i Sutherland, 1994]. Ekstrakt z zielonej herbaty zawiera katechiny takie jak: polifenol galusan epigallokatechiny (EGCG), epigallokatechina (EGC), gallokatechina i katechina [Gupta i wsp., 2002]. W badaniach *in vitro*, na zwierzętach i ludziach udowodniono, że metabolizm katechin zawartych w zielonej herbacie odbywa się poprzez metylację, sprzęganie z kwasem siarkowym i glukuronidację [Feng, 2006].

Surowiec farmaceutyczny stanowią młode omszone liście, z których w procesie dekatyzacji parowej, produkowana jest herbata zielona i czarna. Liście są poddawane również procesowi suszenia i fermentacji. Roślina uprawiana jest przede wszystkim w Chinach, Indiach, Japonii, Indonezji, Kenii, Turcji, Pakistanie, Malawii i Argentynie. Właściwości

przeciwutleniające są sześć razy silniejsze w przypadku zielonej herbaty (Green Tea) niż herbaty czarnej (Black Tea) [PDR, 2007]. Składnikami zielonej herbaty są między innymi:

- 1) alkaloidy purynowe (metyloksantyny): kofeina (wcześniej określana nazwą teina (ang. *theine* lub *teine*, w zależności od stadium rozwojowego liści, od 2,9-4,2% - zawartość tej substancji obniża się wraz z rozwojem), teobromina (0,15-0,2%), teofilina (0,02-0,04%);
- 2) saponiny triterpenowe: barringtogenol C, R1-barringenol;
- 3) katechiny, które występują w ilości około 10-25% w niefermentowanej zielonej herbacie, w czasie fermentacji ulegają częściowej zmianie do oligomerycznych chinonów o charakterze tanin takich jak teaflawiny, kwasu teaflawinowego, tearubiginu lub nierozpuszczalnych w wodzie polimerycznych flawonoidów (kwercetyna, kamferol);
- 4) flawonoidy, takie jak kwercetyna, kamferol;
- 5) pochodne kwasu kofeinowego, takie jak kwas chlorogenowy i teogalina;
- 6) jony nieorganiczne: wysoka zawartość fluorków (130-160 mg/kg), potasu i jonów aluminium;
- 7) olejki eteryczne: linalool, w fermentowanej herbacie także 2-metylo-hepto-2-en-6-on, alpha-ionon, beta-ionon [PDR, 2007].

Badania kohortowe oraz badania typu *case study* dowodzą, że roślina ta posiada właściwości przeciwnowotworowe w odniesieniu do przewodu pokarmowego, płuc, gruczołów estrogenozależnych. Poza tym, zaobserwowano, że płukanie jamy ustnej roztworem zielonej herbaty zapobiega powstawaniu płytki nazębnej i działa przeciwbakteryjnie [Yamamoto i wsp., 1997]. Zielona herbata wpływa również na procesy termogenezy oraz utleniania tłuszczu, dlatego stosowana jest w leczeniu otyłości. Inne zastosowania zielonej herbaty wynikające z jej właściwości, to między innymi wspomaganie leczenia biegunki wywołanej przez bakterie *Clostridium*, działanie przeciwzapalne w zapaleniu jelit, czy wspomaganie obniżania poziomu cholesterolu [PDR, 2007].

Powszechnie uważa się, że polifenole zawarte w zielonej herbacie są w głównej mierze odpowiedzialne za właściwości chemoprotekcyjne, antyproliferacyjne i antyoksydacyjne. Wykazano, że związki występujące we frakcji niepolifenolowej, takie jak feofityna A i B, przejawiają właściwości antygenotoksyczne i przeciwzapalne. Dotychczas przeprowadzono wiele badań doświadczalnych wskazujących na przeciwnowotworowe działanie zielonej herbaty (*Camellia sinensis*) oraz zawartych w niej polifenoli. Jednakże mechanizm przeciwnowotworowego działania frakcji niefenolowej jest znacznie mniej poznany. Okai i Higashi-Okai analizowali *in vitro* i *in vivo* wpływ niefenolowej frakcji

uzyskanej z zielonych liści herbaty na rozwój guza nowotworowego i wykazali, że frakcja ta wykazywała zależne od dawki hamowanie dekarboksylazy ornityny (ODC) w modelu mysim Balb / c 3T3 oraz znaczące zahamowanie nowotworzenia skóry u myszy [Okai i Higashi-Okai, 1997-1998]. Feofityna A i B wykazują również hamowanie w stosunku do neutrofilii PMN (ang. polymorphonuclear leukocytes - granulocyty obojętnochłonne, komórki polimorfonuklearne) [Okai i Higashi-Okai, 1997-1998].

Badania przedkliniczne oraz kliniczne sugerują, że preparaty z zielonej herbaty mogą modulować ekspresję enzymów zarówno I jak II fazy metabolizmu ksenobiotyków (Tabela 6). Jednakże ze względu na nieliczne doniesienia literaturowe interakcje z lekami syntetycznymi na etapie ich biotransformacji pozostają kwestią dyskusyjną.

**Tabela 6.** Wybrane przykłady działania zielonej herbaty na aktywność enzymów CYP450

IZOFORMY	EFEKT	DAWKA	CZAS STOSOWANIA	MODEL	PIŚMIENNICTWO
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

### 1.6.2. Soja zwyczajna (*Glycine max*)

Soja zwyczajna (*Glycine max*) to jednoroczna roślina zielna z rodziny bobowatych (*Fabaceae*) dawniej określanych terminem motylkowate (*Papilionaceae*). Jej charakterystyczną cechą morfologiczną jest rozgałęziająca się łodyga, duże, owłosione 3 – listkowe liście oraz rodzaj owocu – kilkucentrymetrowy strąk [Strzelecka i Kowalski, 2000; Podbielkowski i Sudnik-Wójcikowska, 2003]. Roślina pochodzi ze wschodniej Azji i głównie



w krajach tego rejonu jest uprawiana, w szczególności w Chinach, Japonii, Indiach oraz w Rosji, Brazylii, Indonezji, w południowych stanach USA oraz południowej i południowo – wschodniej Europie [Podbielkowski i Sudnik-Wójcikowska, 2003; PDR, 2007]. Uprawiana jest głównie ze względu na zastosowanie w przemyśle spożywczym, mydlarskim, farbiarskim, hutnictwie (przy wyrobie form), przy produkcji kauczuku, mas plastycznych i impregnowanych tkanin nasion o względnie dużej zawartości białka (ok. 40%) i tłuszczu (ok. 20%) oraz uzyskiwanego z nich oleju, frakcji białkowej [Strzelecka i Kowalski, 2000; Podbielkowski i Sudnik-Wójcikowska, 2003] oraz lecytyny sojowej [PDR, 2007]. Nasiona lub preparaty otrzymywane z *Glycine max* posiadają ugruntowaną pozycję w przemyśle spożywczym – otrzymywane są bowiem z nich liczne pochodne produkty sojowe (m.in. mączka, sos sojowy, mleko sojowe, sery (tofu)), preparaty odżywcze dla niemowląt, dzieci, diabetyków, składniki nasion stanowią także elementy diety przeznaczanej dla osób z zaburzoną gospodarką lipidową i cholesterolową [Strzelecka i Kowalski, 2000].

W nasionach soi owłosionej (*Glycine max*) zidentyfikowano obecność m.in. fosfolipidów (45 – 60%), w szczególności fosfatydylocholina (lecytyna), fosfatydyloetanolamina, fosfatydyloinozytol; frakcji olejowej (30 – 35%), fitosteroli (2 – 5% - sitosterole, stigmasterol), flawonoidów, w tym izoflawonów (głównie genisteina i daidzeina) [PDR, 2007], a także saponin, błonnika, witamin A, B1, B2, PP i E, soli mineralnych [Strzelecka i Kowalski, 2000]. Olej sojowy charakteryzuje się wysoką zawartością nienasyconych kwasów tłuszczowych (80%, w tym 44 – 62% kwasu linolowego, 4 – 11% kwasu linolenowego, 19 – 30% glicerydów kwasu olejowego, kwas palmitynowy i stearynowy) [Strzelecka i Kowalski, 2000].

Zgodnie z monografią PDR szczególne znaczenie medyczne posiadają nasiona *Glycine max*, a w szczególności uzyskiwany z nich, w drodze wyłaczania lub poprzez ekstrakcje na ciepło, olej, białka, w tym lecytyna oraz tzw. mleko sojowe [PDR, 2007].

Analiza danych literaturowych pochodzących z licznych doświadczeń eksperymentalnych (*in vitro*, *in vivo*) oraz badań klinicznych wskazuje, iż wyciągi uzyskiwane z nasion *G. max*, olej, a także bioaktywne metabolity wtórne izolowane z soi wykazują wielokierunkowe spektrum fizjologicznego i farmakologicznego działania. Badania eksperymentalne *in vivo* i badania kliniczne potwierdziły m.in. właściwości obniżające stężenie cholesterolu LDL. Ponadto soja stanowi potencjalne źródło fitoestrogenów, które imitują działanie żeńskich hormonów płciowych. Fakt ten jest wykorzystywany w terapii

zaburzeń związanych z okresem menopauzy oraz w profilaktyce osteoporozy [Potter i wsp., 1998].

Warto podkreślić, iż dotychczas istnieje niewiele doniesień dotyczących potencjalnych interakcji preparatów sojowych z lekami syntetycznymi, w związku z tym podejmowane są badania mające wyjaśnić tego typu interakcje na podłożu molekularnym, co pozwoli na zwiększenie efektywności terapii i bezpieczeństwa przyjmowanych leków syntetycznych łącznie z preparatami sojowymi. W tabeli 7 zaprezentowano niektóre przykłady wpływu soi i jej aktywnych składników na aktywność enzymów CYP I fazy metabolizmu ksenobiotyków.

**Tabela 7.** Wybrane przykłady działania soi zwyczajnej lub jej aktywnych składników na aktywność enzymów CYP

DOŚWIADCZENIE	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
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
Izolat białka sojowego (65 mg izoflawonów/kg na dzień)	Indukcja CYP3A1 i CYP3A2	<i>In vivo</i>	Ronis i wsp., 2004

### 1.6.3. Dziurawiec zwyczajny (*Hypericum perforatum*)

Dziurawiec zwyczajny (*Hypericum perforatum*) jest rośliną należącą do rodziny dziurawcowatych (*Hypericaceae*), która występuje w zachodniej Azji, Chinach, Ameryce Północnej i Afryce oraz Środkowej Europie a także w Polsce. Surowcem zielarskim jest ziele

dziurawca (*Hyperici herba*), który zawiera czerwony barwnik hiperycynę, pseudohiperycynę, flawonoidy (rutyna, kwercytyna), hiperozyd, garbniki katechinowe, olejek eteryczny oraz fenolokwasy (kwas kawowy i chlorogenowy) [Strzelecka i Kowalski, 2000; Bagdonaite i wsp., 2012]. Wykazano, że jego skład jak i sposób przygotowywania ekstraktów wpływa na końcową zawartość związków biologicznie aktywnych. Ekstrakty olejowe bądź alkoholowe oraz sproszkowane ziele dziurawca zwyczajnego zawierają wysoką zawartość hiperycyny, pochodnych ksantonu i floroglucyny, natomiast wodne wyciągi z ziela posiadają głównie glikozydy flawonoidowe, fenolokwasy i garbniki katechinowe [Strzelecka i Kowalski, 2000; Lamer-Zarawska i wsp., 2007; PDR, 2007].

Ziele z *Hypericum perforatum* stosowane głównie w łagodnych i umiarkowanych stanach depresyjnych, wchodzi w skład najpopularniejszych preparatów leczniczych spotykanych na rynku farmaceutycznym [Foti i Wahlstrom, 2008]. Bierze udział w metabolizmie neurotransmiterów poprzez hamowanie głównie aktywności monoaminooksydazy (MAO) i katecholo-O-metylotransferazy (COMT) oraz działa jako inhibitor zwrotnego wychwytu serotoniny i noradrenaliny [Bladt i Wagner, 1993; Butterweck i wsp., 2002a,b]. Ponadto preparaty z dziurawca zwyczajnego wykazują działanie zarówno spazmolityczne jak i żółciopędne wspomagając funkcjonowanie wątroby oraz mogą być stosowane zewnętrznie ułatwiając gojenie ran, oparzeń, owrzodzeń dzięki obecności garbników działających ściągająco i antyseptycznie. Pomocniczo mogą być także stosowane w stanach zapalnych jamy ustnej, dziąseł i gardła [Jakovljevic i wsp., 2000; Gilani i wsp., 2005; PDR, 2007].

Z przeglądu piśmiennictwa wynika, że *Hypericum perforatum* jest najlepiej przebadanym surowcem roślinnym pod względem interakcji, szczególnie w zakresie działania enzymów CYP należących do I fazy metabolizmu leków. Udowodniono, że hiperycyna wykazuje działanie indukujące na CYP1A2, natomiast hiperforyna na CYP3A4, przy czym ekstrakt *Hypericum perforatum* może indukować aktywność CYP2C9 [Bachmann i wsp., 2004; Mrozikiewicz, 2001]. Obserwowane interakcje farmakokinetyczne dziurawca zwyczajnego z inhibitorem proteazy HIV indinawiru, immunosupresantem cyklosporyny oraz doustnych środków antykoncepcyjnych, które prowadzą do osłabienia efektu farmakologicznego stosowanych leków stanowią podstawę do podjęcia dalszych badań w zakresie metabolizmu leków [Breidenbach i wsp., 2000; Bon i wsp., 1999]. Ponadto, hiperforyna stanowiąca ligand dla receptora pregnanu X indukuje transkrypcję CYP3A4, co prowadzi do zwiększonej biotransformacji leków, a wzrost ekspresji genu oporności

wielolekowej MDR1 pod wpływem ekstraktu z *Hypericum perforatum* może modulować jelitowy i mózgowy transport leków poprzez glikoproteinę P będącą produktem tego genu [Moore i wsp., 2000b; Wentworth, 2000].

Jak wykazano preparaty z dziurawca zwyczajnego mogą wchodzić w interakcje z różnymi grupami leków m.in. z lekami antydepresyjnymi (paroksetyny, sertraliny), antykoagulantami (warfaryny, fenprokumon), immunosupresantami (cyklosporyna, takrolimus) jak również z cytostatykami [Tannergren i wsp., 2004, Jiang i wsp., 2004]. W tabeli 8 przedstawione wybrane przykłady wpływu *Hypericum perforatum* na aktywność enzymów CYP w przeprowadzonych badaniach klinicznych.

**Tabela 8.** Wybrane przykłady działania ekstraktu z dziurawca zwyczajnego na aktywność enzymów CYP

CYP	EFEKT	DAWKA I CZAS STOSOWANIA EKSTRAKTU	SUBSTRAT	PIŚMIENNICTWO
CYP3A4 CYP2D6	Indukcja	900 mg/14 dni	Amitryptylina	Johne i wsp., 2002
CYP3A4	Indukcja	900 mg/14 dni	Karbamazepina	Burstein i wsp., 2000
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
CYP3A4	Indukcja	600 mg/14 dni	Takrolimus	Mai i wsp., 2003
CYP3A4	Indukcja	900 mg/ 28dni	Cyklosporyna A	Mai i wsp., 2004
CYP3A4	Indukcja	900 mg/12 dni	Midazolam	Dresser i wsp., 2003
CYP3A4	Indukcja	900 mg/31 dni	Metadon	Eich-Höchli i wsp., 2003

Dotychczas przeprowadzono niewiele badań, które nie pozwalają jednoznacznie stwierdzić wpływu ekstraktu dziurawca zwyczajnego na aktywność enzymów II fazy

metabolizmu leków, co skłania do podjęcia dalszych badania z tego zakresu, które pozwolą zminimalizować ryzyko wystąpienia potencjalnych interakcji.

#### 1.6.4. Kozłek lekarski (*Valeriana officinalis*)

Kozłek lekarski (*Valeriana officinalis*) znany powszechnie jako waleriana jest rośliną wieloletnią z rodziny kozłkowatych (*Valerianaceae*) obejmująca ponad 250 gatunków, która rośnie głównie w Europie i Azji, przy czym w Polsce spotykane są: *V. exaltata* i *V. angustifolia*. Surowcem zielarskim jest korzeń *Radix valerianae* zawierający liczne biologiczne czynne substancje, m.in. seskwiterpeny (kwas walerenowy, walerenal, waleranon), monotereny (kamfen, limonen, pinen, felandren), triterpenowy związek walerozyd A i aktynidynę, który poddany procesowi suszenia w temperaturze do 35°C zawiera około 0,5-1% irydoidów o charakterze estrów - walepotriatów (waltrat, acetowaltrat, dihydrowaltrat) i 0,5-2% olejku eterycznego z estrami kwasu walerianowego i izowalerianowego. W zależności od sposobu ekstrakcji wyciągi mogą charakteryzować się zróżnicowaną ilości poszczególnych związków czynnych [PDR, 2007].

Zarówno kłącze jak i korzeń kozłka lekarskiego są wykorzystywane do leczenia zaburzeń neurovegetatywnych, jako łagodny środek uspokajający oraz ułatwiający zasypianie. Wykazano, że walepotriaty zawarte w kłączach i korzeniu powodują, iż w małych dawkach umiarkowanie popudzają OUN, natomiast w wysokich dawkach działają spowalniająco na OUN [Strzelecka i Kowalski, 2000]. *Valeriana officinallis* wykazuje również działanie rozkurczające w stanach napięcia układu pokarmowego oraz zwiększa wydzielanie żółci i soku żołądkowego, wspomagając leczenie kamicy żółciowej [ESCOP, 2003; PDR, 2007].

Istotny jest fakt, że preparaty z korzeni kozłka lekarskiego popularne na rynku farmaceutycznym szczególnie wśród osób z problemami psychoneurovegetatywnymi mogą wchodzić w interakcje z barbituranami i benzodiazepinami nasilając ich działanie [ESCOP, 2003]. Przeprowadzone badania *in vitro* oraz *in vivo* z zakresu oceny interakcji pomiędzy ekstraktami z kozłka lekarskiego a lekami syntetycznymi wykazały, że związki biologicznie czynne, m.in. frakcja olejku eterycznego czy standaryzowane ekstrakty posiadają kilka punktów farmakologicznego uchwytu biorąc pod uwagę mechanizmy receptorowe i pozareceptorowe. Dotychczas wykonano niewiele badań dotyczących zachodzenia interakcji

pomiędzy preparatami kozłka lekarskiego a lekami syntetycznymi stosowanymi na ośrodkowy układ nerwowy. Jednakże, istnieją sugestie, iż przetwory z *Valeriana officinalis* mogą wpływać na aktywność enzymów CYP jak również modulować działanie enzymów należących do II fazy metabolizmu, dlatego wymagane są dalsze badania z zakresu interakcji farmakokinetycznych i farmakodynamicznych w celu zapewnienia bezpieczeństwa ich stosowania łącznie z lekami syntetycznymi [Hellum i Nilsen, 2007; Donovan i wsp., 2004a].

## 2. CELE PRACY

1. Określenie wpływu substancji czynnych zawartych w powszechnie stosowanych roślinach zielarskich na poziom ekspresji genów N-acetylotransferazy 1 i 2 (Nat1 i Nat2), sulfotransferazy 1a1 (Sult1a1), glukuronozylotransferazy 1a1 (Ugt1a1) oraz S-transferazy glutationowej pi 1 (Gstp1) w tkance wątrobowej w modelu *in vivo*
2. Ocena poziomu ekspresji czynnika transkrypcyjnego Nrf2, biorącego udział w regulacji transkrypcji genów kodujących enzymy II fazy
3. Próba określenia molekularnych podstaw interakcji pomiędzy preparatami roślinnymi a lekami syntetycznymi metabolizowanymi przez enzymy II fazy w aspekcie zwiększenia bezpieczeństwa i skuteczności farmakoterapii

### 3. MATERIAŁY I METODY

#### 3.1. Badania na zwierzętach

W pracy doktorskiej wykorzystano do badań materiał zwierzęcy w postaci tkanki wątrobowej zgromadzony w ramach projektu badawczego MNiSW nr N 405 023 31/1522 realizowanego w Instytucie Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich w Poznaniu, mającego na celu ustalenie wpływu substancji roślinnych na aktywność enzymów cytochromu P450.

Badania *in vivo* na szczurach rasy Wistar (samce) 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, natomiast badania na tkankach wątrobowych za zgodą Lokalnej Komisji Etycznej nr 24/2011.

Zwierzęta pochodzące z Hodowli Zwierząt Laboratoryjnych w Brwinowie przetrzymywano w plastikowych klatkach, w pomieszczeniach o temperaturze 20°C, wilgotności 60%, z 12-godzinnym cyklem oświetleniowym. Szczury karmiono standardową paszą laboratoryjną (Labofeed B –Wytwórnia Pasz i Koncentratów, Kcynia) i pojoło wodą. Po dwóch tygodniach kwarantanny, zwierzęta o masie ciała od 220 do 350 gramów podzielono losowo na grupy liczące 10 sztuk, którym podawano substancje roślinne standaryzowane na zawartość określonych związków biologicznie aktywnych. Suche etanolowe wyciągi roślinne z dziurawca zwyczajnego i kozłka lekarskiego pochodziły z Phytopharm Klęka S.A. Ekstrakt z zielonej herbaty otrzymano z TTD International (Australia), a materiał sojowy dostarczono z Pierre Fabre Sante (Francja).

Eksperyment obejmował podawanie zwierzętom dożołądkowo za pomocą metalowej sondy standaryzowanych etanolowych ekstraktów roślinnych w dawkach wykazujących efekty farmakologiczne ustalonych na podstawie literatury. Doświadczenie z udziałem zwierząt eksperymentalnych prowadzono przez okres 3 i 10 dni. Wydzielono grupę kontrolną, czyli szczury karmione standardową dietą, stanowiące odniesienie dla grup poddanych procedurze eksperymentalnej. Rodzaj wykorzystanych w badaniu *in vivo* wyciągów roślinnych ich dawkowanie oraz standaryzację przedstawiono w tabeli 9.



**Tabela 9.** Charakterystyka surowców roślinnych użytych w doświadczeniu, dawkowanie ekstraktów i ich standaryzacja

WYCIĄGI ROŚLINNE	SUROWIEC	DAWKA	STANDARYZACJA
<b>Dziurawiec zwyczajny</b> ( <i>Hypericum perforatum</i> )	ziele	300 mg/kg, p.o.	0,3% hiperycyny 0,61% hiperforyny
<b>Kozłek lekarski</b> ( <i>Valeriana officinalis</i> )	korzeń	300 mg/kg, p.o.	0,82% kwasu walerenowego
<b>Zielona herbata</b> ( <i>Camellia sinensis</i> )	liść	300 mg/kg, p.o.	61% katechin
<b>Soja zwyczajna</b> ( <i>Glycine max</i> )	nasiona	100 mg/kg, p.o.	37% izoflawonów (genisteina)

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.

Badania farmakologiczne wykonano we współpracy z Katedrą i Zakładem Farmakologii Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

## 3.2 Analizy molekularne

### 3.2.1 Odczynniki

W celu przeprowadzenia izolacji RNA, oceny jakościowej i ilościowej preparatów RNA, syntezy cDNA i reakcji PCR w czasie rzeczywistym (real-time 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- dietylopirokarbonian (Sigma, USA)
- izopropanol (Sigma, USA)
- EDTA - kwas etylenodiaminotetraoctowy (Sigma, USA)
- marker masy DNA (GeneRuler Low Range DNA Ladder, Fermentas, Litwa)
- bromek etydyny -10mg/ml (Sigma, USA)
- odczynnik TriPure Isolation Reagent (Roche Diagnostic, Niemcy)
- zestaw Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Diagnostic, Niemcy)
- zestaw Fast Start DNA Master Sybr Green I (Roche Diagnostic, Niemcy)
- oligonukleotydy (primery) do reakcji PCR w czasie rzeczywistym (TIB Molbiol, Polska).

### 3.2.2 Aparatura i sprzęt laboratoryjny

Sprzęt laboratoryjny wykorzystany w niniejszej pracy doktorskiej umożliwił przeprowadzenie izolacji RNA, pomiaru spektrofotometrycznego preparatów RNA, reakcji *real-time* 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 pobranego materiału w postaci tkanki wątrobowej, przeprowadzono izolację całkowitego RNA według zmodyfikowanej metody Chomczyńskiego i Sacchi (1987). Odważoną tkankę o masie 0,2g homogenizowano mechanicznie w 1ml odczynnika TriPure Isolation Reagent. Do zmacerowanej tkanki wątrobowej dodano 200 $\mu$ l chloroformu i intensywnie wytrząsano a następnie wirowano w warunkach 12 000 x g, 4°C przez okres 15 min. Po zwirowaniu prób, zebrano górną fazę, którą przeniesiono do czystej probówki a następnie podano izopropanol w stosunku objętościowym 1:1. Zawartość probówek zmieszano i wytrącano przez 30 min w temperaturze -80°C. Po rozmrożeniu, próby zwirowano w warunkach 4°C, 12 000 x g przez 10 min. Następnie usunięto nadsącz, a osad RNA jednokrotnie płukano w 1ml 75% etanolu przygotowanego z użyciem wody dejonizowanej, zawierającej DEPC. Tak przygotowane próby wirowano przez okres 5 min, w warunkach 7500 x g, 4°C, po czym usunięto etanol a osady RNA pozostawiono na okres 20 min w celu ich wysuszenia. Następnie do probówek podano 200 $\mu$ l wody wolnej od RNaz i w celu pełnego rozpuszczenia RNA, probówki umieszczono w termobloku w temperaturze 65°C przez 5 min. Po inkubacji próby delikatnie zworteksowano i krótko zwirowano, a następnie przechowywano w -80°C. Wyizolowane RNA wcześniej poddane analizie jakościowej i ilościowej wykorzystywano jako matrycę do syntezy cDNA w procesie odwrotnej transkrypcji.

### 3.2.4 Ocena ilościowa i jakościowa RNA

Wyzolowany RNA oceniano ilościowo i jakościowo dokonując spektrofotometrycznego pomiaru absorbancji przy użyciu aparatu BioPhotometer (Eppendorf) oraz przeprowadzając elektroforetyczny rozdział w 1,5% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny (2,5µl roztworu bromku etydyny / 100ml buforu). W celu przeprowadzenia pomiaru spektrofotometrycznego próby RNA rozcieńczono 100-krotnie sterylną H<sub>2</sub>O w stosunku 1µl RNA : 99µl H<sub>2</sub>O po uprzednim skalibrowaniu spektrofotometru. Mierzoną absorbancję określaną jako gęstość optyczną (ang. *optical density*) ustalaną przy trzech długościach fali: 260 nm (maksimum absorpcji dla RNA), 280 nm (maksimum absorpcji dla białek) oraz 320 nm (absorpcja dla drobin komórkowych, tzw. tło).

Stężenie RNA (C) obliczono według wzoru:

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

gdzie:

A<sub>260</sub> – wartość absorbancji przy λ= 260 nm

A<sub>280</sub> – wartość absorbancji przy λ= 280 nm

R – krotność rozcieńczenia próbki

40(µg/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<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>, gdzie uzyskana wartość pomiędzy 1,8 - 2,0 świadczyła o wysokiej czystości tego preparatu.

Po uprzednim przygotowaniu żelu elektroforetycznego dodano 0,5µg buforu obciążającego (6xSB) do probówek zawierających RNA a następnie nakładano materiał na żel. Rozdział elektroforetyczny prowadzono przez 1 godz. 60V (7,5V/cm) a wizualizację rozdziału dokonano przy użyciu transiluminatora w świetle UV.

### 3.2.5 Odwrotna transkrypcja

Reakcję syntezy pierwszej nici cDNA prowadzono w sterylnych warunkach przy użyciu komercyjnego zestawu Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche) w termocyklerze PTC 200 DNA Engine Gradient Cycler (MJ Research Inc.). Mieszaninę

reakcyjną przygotowano na lodzie zgodnie z protokołem producenta. Do reakcji wykorzystano 2 µg całkowitego RNA rozpuszczonego w wodzie wolnej od RNaz a następnie dodawano 1 µl oligonukleotydu tzw. oligo(dT)<sub>20</sub> (stężenie wyjściowe 50 µM) i uzupełniano wodą wolną od RNaz do objętości 11,4 µl. Zawartość próbki mieszano i wirowano po czym umieszczano w termobloku na 10 min, w temperaturze 65°C w celu denaturacji RNA. W kolejnym etapie reakcji odwrotnej transkrypcji do próbek, po ich schłodzeniu w lodzie i odwirowaniu, dodawano następujące składniki mieszaniny reakcyjnej do objętości końcowej 20µl:

- 4 µl stężonego buforu 10 x
- 2 µl mieszaniny deoksyrybonukleotydów (dNTP) (stężenie wyjściowe 10 mM)
- 1 µl DTT (stężenie wyjściowe 0,1 M)
- 0,5 µl inhibitora rybonukleaz Rnase (40 U/µl)
- 1,1 µl odwrotnej transkryptazy SuperScript III RT (200 U/µl).

Próbki następnie wortexowano, odwirowano i ponownie przeniesiono do termocyklera. Syntezę cDNA prowadzono w czasie 35 min w temperaturze 55°C, a następnie reakcję zakończono inkubacją przez 5 min w temperaturze 85°C. Uzyskane w ten sposób cDNA stanowiło matrycę do reakcji ilościowego PCR w czasie rzeczywistym (ang. *quantitative real-time* PCR).

### 3.2.6 Reakcja łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym

W celu określenia zmian w poziomie ekspresji badanych genów wykorzystano reakcję łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (ang. *real-time* PCR) z użyciem specyficznych par starterów komplementarnych do fragmentu sekwencji badanego mRNA, pozwalające na uzyskanie specyficznego produktu reakcji wyłącznie z cDNA (Tabela 10).

**Tabela 10.** Sekwencje starterów użytych do reakcji PCR w czasie rzeczywistym

Izoforma	Accession Number (GenBank)	Sekwencja starterów Forward (5' → 3') Reverse (5' → 3')	Wielkość produktu (pz)
Ugt1a1	NM_012683.2	F. TGTCCTACGTGCCCAAGAGTT R. TGCAGGACTAAGAAGGTCCTTG	185
Gstp1	NM_012577.2	F. CTTCAAGGCTCGCTCAAGTC R. CCCCATCATTACCATATCC	172
Sult1a1	NM_031834.1	F. CTTAAGACACATCTGCCCTGT R. CATGAAGTTCTCCAAGAAGCTGT	177
Nat1	NM_053853.2	F. CCAAACATGGCGAACTCGT R. GAAGATACAGGTCATTAGTTGATCAATATTG	146
Nat2	NM_053854.1	F. GTGCCTAAACATGGTGATCGATT R. ACATGGTCAGAAGTATGTCCTTGTC	122
Nrf2	NM_031789.2	F. CAGTCTTCACCACCCCTGAT R. GGTAGTCTCAGCCTGCTGCT	170
GAPDH	NM_017008	F. GATGGTGAAGGTCGGTGTG R. ATGAAGGGGTCGTTGATGG	108

Startery dla poszczególnych badanych genów zaprojektowano z wykorzystaniem programu Oligo 6.0 (National Biosciences).

Reakcję PCR w czasie rzeczywistym prowadzono w szklanych kapilarach (Light Cycler Capillaries), z wykorzystaniem zsyntetyzowanego uprzednio cDNA oraz zestawu Fast Start DNA Master SYBR Green I (Roche Diagnostic). Reakcję PCR przeprowadzono w aparacie LightCycler Version 1,5 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), obsługiwanym przez oprogramowanie LightCycler3 Run Version 5.32 i LightCycler Data Analysis Version 3.5.28 umożliwiającym analizę uzyskanych wyników. Zmiany w poziomie analizowanych transkryptów normalizowano względem genu referencyjnego – GAPDH kodującego dehydrogenazę gliceroaldehydrofosforanową (ang. glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase), należącego do grupy genów określanych terminem *housekeeping genes*, tj. takich, których 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

Nat1:

- 5,9 µl wody wolnej od RNaz
- 1,6 µl MgCl<sub>2</sub> (stężenie końcowe 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

Nat2:

- 6,3 µl wody wolnej od RNaz
- 1,2 µl MgCl<sub>2</sub> (stężenie końcowe 4 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

Ugt1a1:

- 6,3 µl wody wolnej od RNaz
- 1,2 µl MgCl<sub>2</sub> (stężenie końcowe 4 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

Sult1a1:

- 6,7 µl wody wolnej od RNaz
- 0,8 µl MgCl<sub>2</sub> (stężenie końcowe 3 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

## Gstp1:

- 6,7  $\mu\text{l}$  wody wolnej od RNaz
- 0,8  $\mu\text{l}$   $\text{MgCl}_2$  (stężenie końcowe 3 mM)
- 0,25  $\mu\text{l}$  starter Forward (stężenie końcowe 0,5  $\mu\text{M}$ )
- 0,25  $\mu\text{l}$  starter Reverse (stężenie końcowe 0,5  $\mu\text{M}$ )
- 1  $\mu\text{l}$  LightCycler Fast-Start Reaction Mix SYBR Green I (10 x stężony)
- 1  $\mu\text{l}$  cDNA

## Nrf2:

- 6,7  $\mu\text{l}$  wody wolnej od RNaz
- 0,8  $\mu\text{l}$   $\text{MgCl}_2$  (stężenie końcowe 3 mM)
- 0,25  $\mu\text{l}$  starter Forward (stężenie końcowe 0,5  $\mu\text{M}$ )
- 0,25  $\mu\text{l}$  starter Reverse (stężenie końcowe 0,5  $\mu\text{M}$ )
- 1  $\mu\text{l}$  LightCycler Fast-Start Reaction Mix SYBR Green I (10 x stężony)
- 1  $\mu\text{l}$  cDNA

## GAPDH:

- 6,2  $\mu\text{l}$  wody wolnej od RNaz
- 1,2  $\mu\text{l}$   $\text{MgCl}_2$  (stężenie końcowe 4 mM)
- 0,3  $\mu\text{l}$  starter Forward (stężenie końcowe 0,6  $\mu\text{M}$ )
- 0,3  $\mu\text{l}$  starter Reverse (stężenie końcowe 0,6  $\mu\text{M}$ )
- 1  $\mu\text{l}$  LightCycler Fast-Start Reaction Mix SYBR Green I (10 x stężony)
- 1  $\mu\text{l}$  cDNA

Reakcję prowadzono w optymalnej dla badanego genu cyklach amplifikacji kończących się każdorazowo pomiarem sygnałów fluorescencji produktów amplifikacji, po czym zachodziło ich topienie w toku zwiększania temperatury do wartości 95°C. Warunki termiczne reakcji ilościowego PCR w czasie rzeczywistym przedstawiono w tabeli poniżej (Tabela 11).

Ilość transkryptu wyznaczano z krzywej wzorcowej dla każdego z badanych genów, którą sporządzono poprzez wykonanie serii rozcieńczeń otrzymanego cDNA. Każdą analizę powtarzano co najmniej dwukrotnie a wyniki reakcji wizualizowano w postaci wykresów jako wartość względną w odniesieniu do grupy kontrolnej.



**Tabela 11.** Warunki reakcji PCR w czasie rzeczywistym

Gen	Liczba cykli	Warunki reakcji RT-PCR				
		Denaturacja wstępna	Denaturacja	Wiązanie starterów	Synteza	Synteza końcowa
Nat1	35	95°C, 600s	95°C, 4s	64°C, 6s	72°C, 8s	72°C, 20s
Nat2	40		95°C, 6s	60°C, 5s	72°C, 8s	
Sult1a1	35		95°C, 4s	64°C, 6s	72°C, 8s	
Ugt1a1	35		95°C, 8s	59°C, 6s	72°C, 8s	
Gstp1	35		95°C, 8s	56°C, 6s	72°C, 8s	
Nrf2	35		95°C, 8s	58°C, 6s	72°C, 8s	
GAPDH	35		95°C, 4s	56°C, 8s	72°C, 8s	

### 3.2.7 Elektroforeza żelowa

W celu potwierdzenia wielkości produktów reakcji PCR w czasie rzeczywistym oraz dla oceny jakościowej preparatów RNA przeprowadzono elektroforezę w 1,5% żelu agarozowym sporządzonym z 1,5 g agarozy rozpuszczonej w 100ml buforu 1 x TBE. Bufor 1 x TBE sporządzono z 10 x stężonego TBE (88 mM TRIS, 89 mM kwas borowy, 2 mM EDTA). Dla uwidocznienia uzyskanych produktów reakcji żel wybarwiano bromkiem etydyny (0,5 µg/ml). Rozdział elektroforetyczny prowadzono 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.

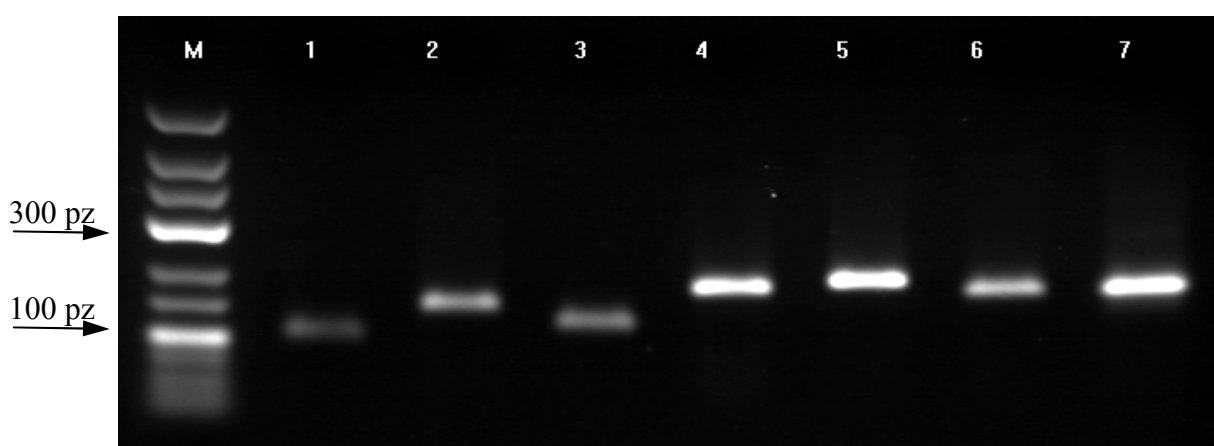
### 3.2.8 Analiza statystyczna

W celu przeprowadzenia analizy statystycznej uzyskanych w niniejszej pracy wyników ilościowej oceny zmian poziomu ekspresji genów wykorzystano program Microsoft Excel, za pomocą którego obliczono średnie wartości dla poszczególnych prób, odchylenie standardowe oraz współczynnik SEM. Uzyskane wyniki oznaczeń ilościowych mRNA w badanych próbach dzielono względem wartości standardu wewnętrznego - mRNA genu referencyjnego GAPDH. Następnie wprowadzono średnie wartości poziomu ekspresji analizowanych genów dla poszczególnych prób do Edytora Danych SPSS 17.0 PL, gdzie za pomocą algorytmu jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA dokonano obliczeń poziomu istotności. Wartość  $p < 0,05$  przyjęto za statystycznie istotną.

## 4 WYNIKI

### 4.1. Elektroforeza produktów reakcji *real-time* PCR

Dla identyfikacji specyfiki reakcji i potwierdzenia wielkości uzyskanych produktów reakcji PCR w czasie rzeczywistym dla genów GAPDH, Nat1, Nat2, Sult1a1, Ugt1a1, Gstp1 i Nrf2 wykonano ich rozdział elektroforetyczny w 1,5% żelu agarozowym przy napięciu 5V/cm w buforze 1x TBE przez 1,5h. Wynik analizy elektroforetycznej sprawdzano w świetle UV. Uzyskany obraz przedstawiono na rycinie 7.



**Rycina 7.** Rozdział elektroforetyczny amplikonów GAPDH, Nat1, Nat2, Sult1a1, Ugt1a1 i Nrf2 reakcji PCR w czasie rzeczywistym w 1,5% żelu agarozowym. Tor M - marker wielkości GeneRuler Low Range DNA Ladder, tor 1 – GAPDH (108 pz), tor 2 – Nat1 (146 pz), tor 3 – Nat2 (122 pz), tor 4 – Sult1a1 (177 pz), tor 5 – Ugt1a1 (185 pz), tor 6 – Gstp1 (172 pz), tor 7 – Nrf2 (170 pz).

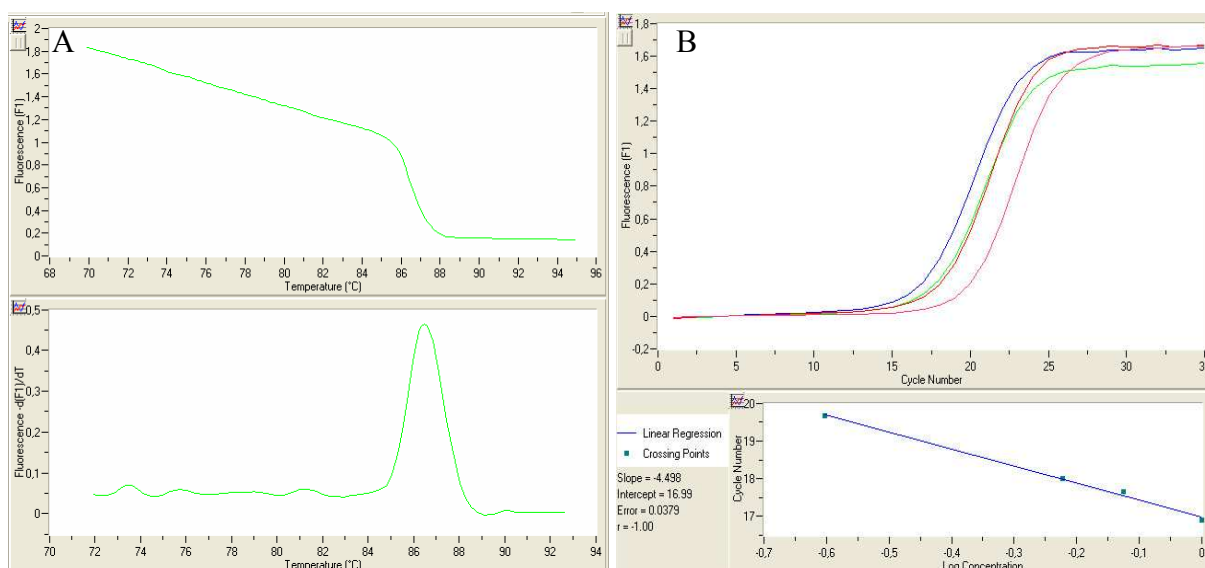
### 4.2 Przygotowanie krzywych standardowych oraz charakterystyka temperatury topnienia produktów reakcji *real-time* PCR

W celu oceny dokonania zmian ilościowych transkryptów badanych genów wykorzystano metodę względnego pomiaru przyrostu fluorescencji w toku reakcji ilościowego PCR z jej detekcją w czasie rzeczywistym (q-rtPCR; syn. qPCR – ang. *quantitative real time PCR*) z wykorzystaniem samodzielnie zaprojektowanych starterów, komplementarnych do badanego fragmentu cDNA. W tym celu wykonano krzywe rozcieńczeń cDNA badanych próbek podzielonych na poszczególne grupy – tzw. krzywe wzorcowe. Otrzymane w toku poszczególnych reakcji ilościowego PCR rezultaty odpowiadały wartościom względnym stanowiącym krotność ekspresji badanego genu w

warunkach procedury doświadczalnej w stosunku do rezultatu grupy kontrolnej, które to następnie zestawiano z wynikami dla genu referencyjnego GAPDH (jego poziom ekspresji nie ulegał zmianie pod wpływem zastosowanych ekstraktów). Zmiany ilościowe badanych mRNA w próbkach kontrolnych stanowiły wartości względne – referencyjne dla grup badanych i przyjęto dla nich wartość 100%.

#### 4.2.1. Krzywa standardowa i $T_m$ dla produktu amplifikacji genu GAPDH

Wyznaczanie temperatury topnienia (ang. *melting temperature*,  $T_m$ ) produktu GAPDH oraz przebieg reakcji amplifikacji i charakterystykę krzywej wzorcowej zamieszczono odpowiednio na rycinie 8.

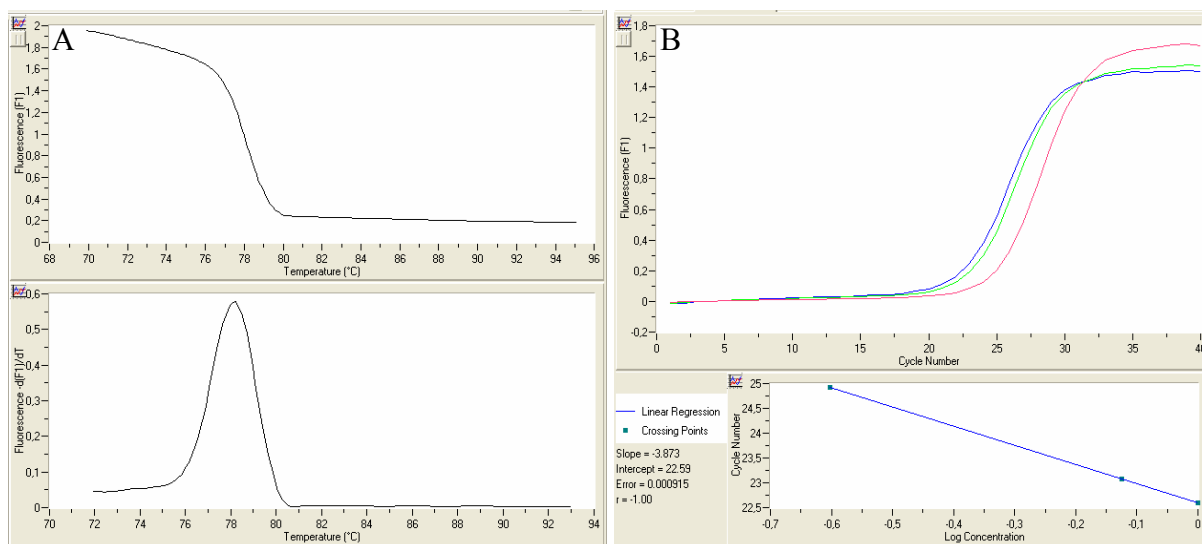


**Rycina 8.** Wyznaczanie temperatury topnienia produktu genu GAPDH w reakcji PCR w czasie rzeczywistym. Temperatura topnienia amplikonu wyniosła 86,50°C (A). Amplifikacja produktu dla genu GAPDH w czasie rzeczywistym przy malejącym stężeniu cDNA w reakcji oraz krzywa wzorcowa dla GAPDH (B).

Specyficzność reakcji *real-time* PCR dla genu referencyjnego obrazuje przebieg krzywej topnienia amplikonu GAPDH (Rycina 8A). Reakcje przeprowadzone na rozcieńczonych próbkach cDNA pozwoliły wykreślić krzywą standardową (Rycina 8B.).

#### 4.2.2. Krzywa standardowa i $T_m$ dla produktu amplifikacji genu Nat1

Wyznaczanie  $T_m$  amplikonu Nat1 oraz przebieg reakcji amplifikacji i charakterystykę krzywej wzorcowej zamieszczono odpowiednio na rycinie 9.

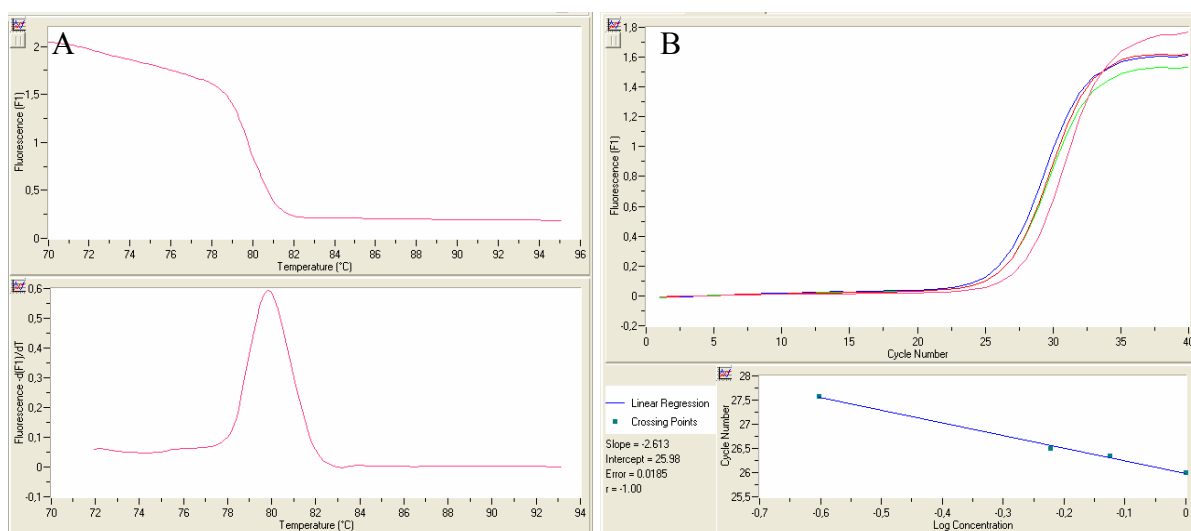


**Rycina 9.** Wyznaczanie temperatury topnienia produktu genu Nat1 w reakcji PCR w czasie rzeczywistym. Temperatura topnienia amplikonu wyniosła 78,20°C (A). Amplifikacja produktu dla genu Nat1 w czasie rzeczywistym przy malejącym stężeniu cDNA w reakcji oraz krzywa wzorcowa dla Nat1 (B).

Specyficzność reakcji *real-time* PCR dla genu referencyjnego obrazuje przebieg krzywej topnienia amplikonu Nat1 (Rycina 9 A). Reakcje przeprowadzone na rozcieńczonych próbach cDNA pozwoliły wykreślić krzywą standardową (Rycina 9 B.).

#### 4.2.3. Krzywa standardowa i $T_m$ dla produktu amplifikacji genu Nat 2

Wyznaczanie  $T_m$  amplikonu Nat2 oraz przebieg reakcji amplifikacji i charakterystykę krzywej wzorcowej zamieszczono odpowiednio na rycinie 10.

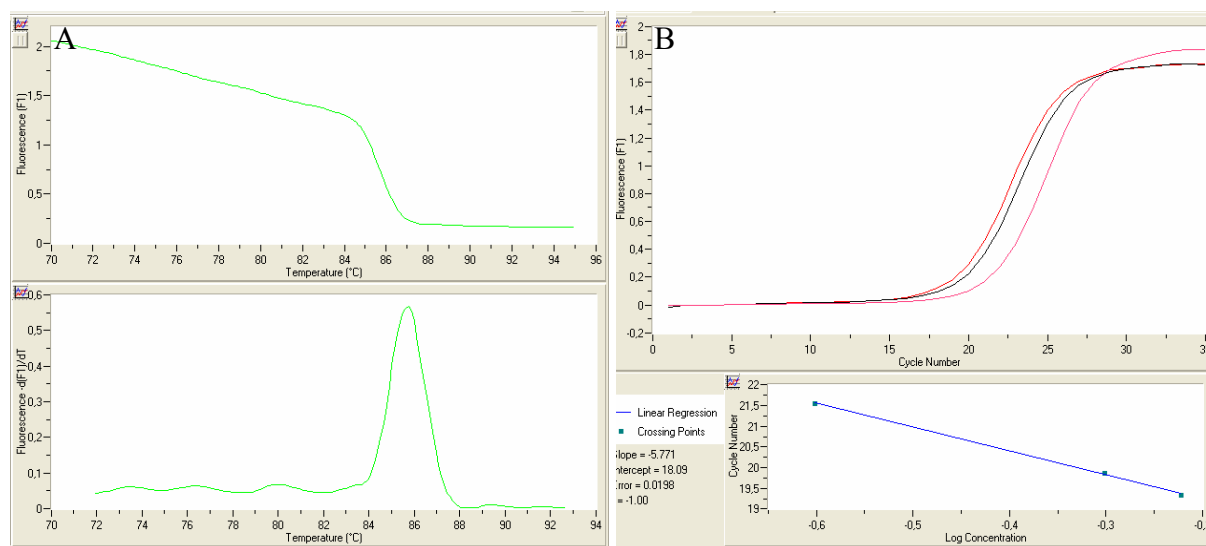


**Rycina 10.** Wyznaczanie temperatury topnienia produktu genu Nat2 w reakcji PCR w czasie rzeczywistym. Temperatura topnienia amplikonu wyniosła 79,87°C (A) Amplifikacja produktu dla genu Nat2 w czasie rzeczywistym przy malejącym stężeniu cDNA w reakcji oraz krzywa wzorcowa dla Nat2 (B).

Specyficzność reakcji *real-time* PCR dla genu referencyjnego obrazuje przebieg krzywej topnienia ampliconu Nat2 (Rycina 23A). Reakcje przeprowadzone na rozcieńczonych próbach cDNA pozwoliły wykreślić krzywą standardową (Rycina 23B).

#### 4.2.4. Krzywa standardowa i $T_m$ dla produktu amplifikacji genu Sult1a1

Wyznaczanie  $T_m$  ampliconu Sult1a1 oraz przebieg reakcji amplifikacji i charakterystykę krzywej wzorcowej zamieszczono odpowiednio na rycinie 11.

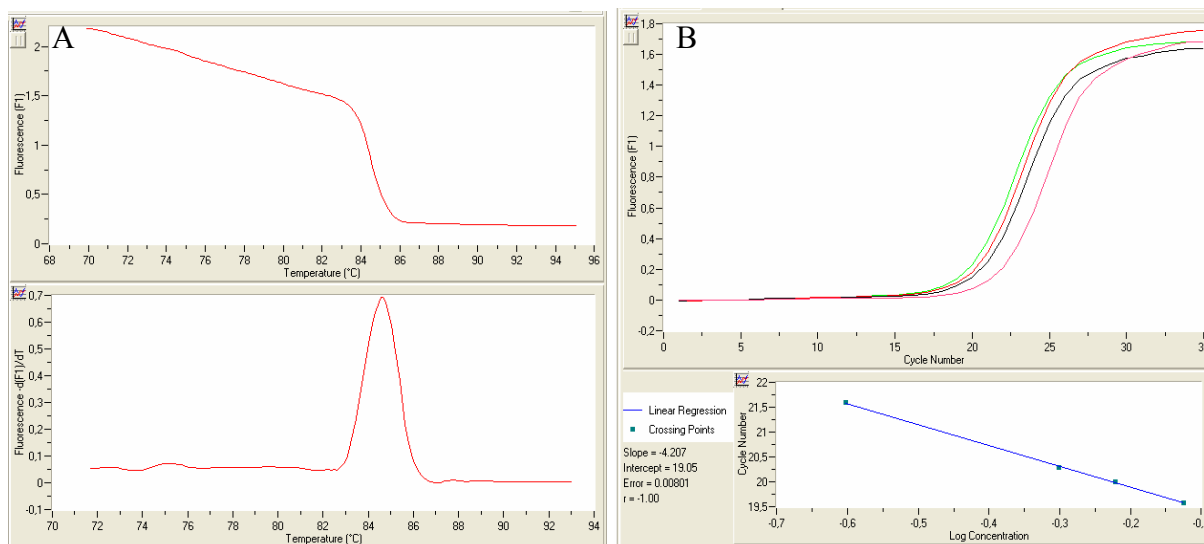


**Rycina 11.** Wyznaczanie temperatury topnienia produktu genu Sult1a1 w reakcji PCR w czasie rzeczywistym. Temperatura topnienia ampliconu wyniosła 85,73°C (A) Amplifikacja produktu dla genu Sult1a1 w czasie rzeczywistym przy malejącym stężeniu cDNA w reakcji oraz krzywa wzorcową dla Sult1a1(B)

Specyficzność reakcji *real-time* PCR dla genu referencyjnego obrazuje przebieg krzywej topnienia ampliconu Sult1a1 (Rycina 11A). Reakcje przeprowadzone na rozcieńczonych próbach cDNA pozwoliły wykreślić krzywą standardową (Rycina 11B).

#### 4.2.5. Krzywa standardowa i $T_m$ dla produktu amplifikacji genu Ugt1a1

Wyznaczanie  $T_m$  ampliconu Ugt1a1 oraz przebieg reakcji amplifikacji i charakterystykę krzywej wzorcowej zamieszczono odpowiednio na rycinie 12.

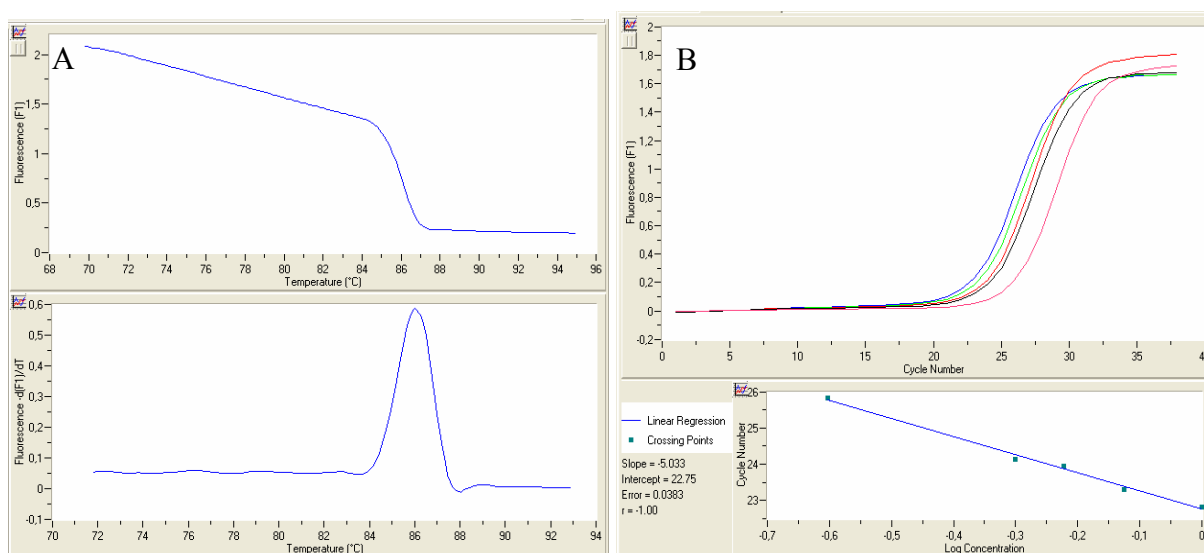


**Rycina 12.** Wyznaczanie temperatury topnienia produktu genu *Ugt1a1* w reakcji PCR w czasie rzeczywistym. Temperatura topnienia amplikonu wyniosła 84,65°C (A). Amplifikacja produktu dla genu *Ugt1a1* w czasie rzeczywistym przy malejącym stężeniu cDNA w reakcji oraz krzywa wzorcowa dla *Ugt1a1* (B)

Specyficzność reakcji *real-time* PCR dla genu referencyjnego obrazuje przebieg krzywej topnienia amplikonu *Ugt1a1* (Rycina 12A). Reakcje przeprowadzone na rozcieńczonych próbach cDNA pozwoliły wykreślić krzywą standardową (Rycina 12B.).

#### 4.2.6. Krzywa standardowa i $T_m$ dla produktu amplifikacji genu *Gstp1*

Wyznaczanie  $T_m$  amplikonu *Gstp1* oraz przebieg reakcji amplifikacji i charakterystykę krzywej wzorcowej zamieszczono odpowiednio na rycinie 13.

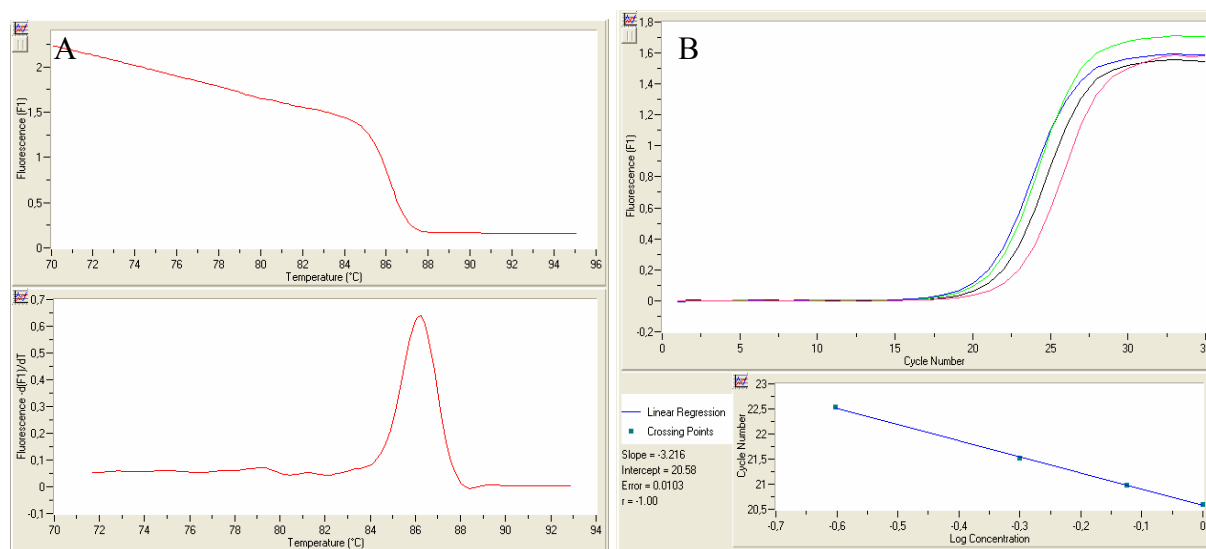


**Rycina 13.** Wyznaczanie temperatury topnienia produktu genu *Gstp1* w reakcji PCR w czasie rzeczywistym. Temperatura topnienia amplikonu wyniosła 85,99°C (A) Amplifikacja produktu dla genu *Gstp1* w czasie rzeczywistym przy malejącym stężeniu cDNA w reakcji oraz krzywa wzorcowa dla *Gstp1*(B).

Specyficzność reakcji *real-time* PCR dla genu referencyjnego obrazuje przebieg krzywej topnienia ampliconu Gsp1 (Rycina 13A). Reakcje przeprowadzone na rozcieńczonych próbach cDNA pozwoliły wykreślić krzywą standardową (Rycina 13B).

#### 4.2.7 Krzywa standardowa i $T_m$ dla produktu amplifikacji genu czynnika Nrf2

Wyznaczanie  $T_m$  ampliconu Gsp1 oraz przebieg reakcji amplifikacji i charakterystykę krzywej wzorcowej zamieszczono odpowiednio na rycinie 14



**Rycina 14.** Wyznaczanie temperatury topnienia produktu genu Nrf2 w reakcji PCR w czasie rzeczywistym. Temperatura topnienia ampliconu wyniosła 85,91°C (A) Amplifikacja produktu dla genu Nrf2 w czasie rzeczywistym przy malejącym stężeniu cDNA w reakcji oraz krzywa wzorcowa dla czynnika Nrf2 (B).

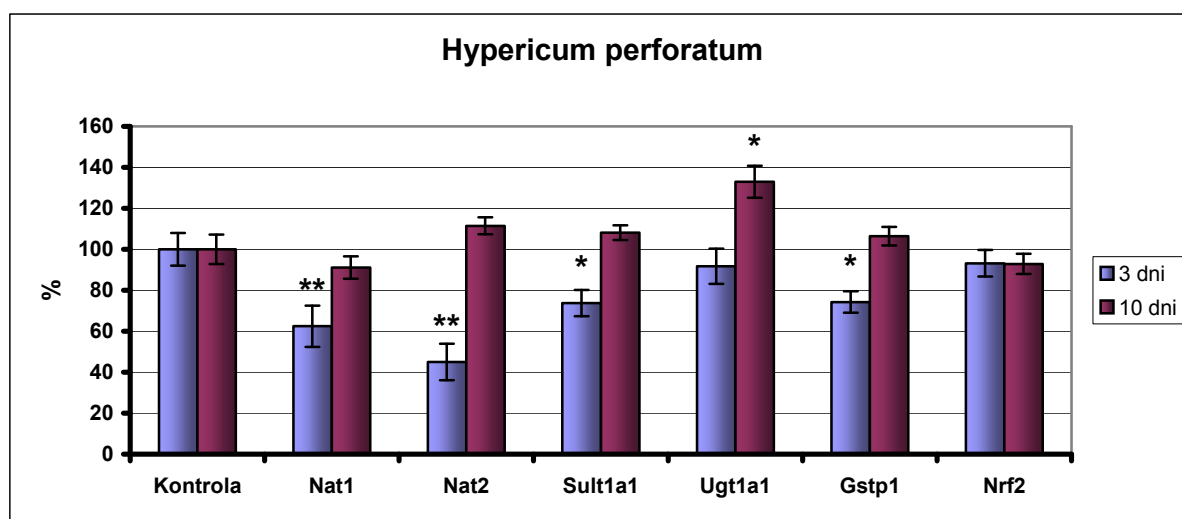
Specyficzność reakcji *real-time* PCR dla genu referencyjnego obrazuje przebieg krzywej topnienia ampliconu czynnika Nrf2 (Rycina 14A). Reakcje przeprowadzone na rozcieńczonych próbach cDNA pozwoliły wykreślić krzywą standardową (Rycina 14B).



### 4.3 Analiza wpływu standaryzowanych ekstraktów roślinnych na poziom ekspresji wybranych genów II fazy metabolizmu ksenobiotyków

#### 4.3.1. Efekt wyciągu z ziela *Hypericum perforatum* na poziom mRNA badanych enzymów i czynnika Nrf2

W wątrobie zwierząt modelowych obserwowano istotną statystycznie redukcję poziomu transkryptu genów dwóch izoform Nat1 i Nat2 odpowiednio do wartości 62% i 45% ( $p < 0,001$ ) względem grupy zwierząt karmionych standardową dietą po trzech dniach stosowania wyciągu w dawce 300 mg/kg p.o. Obniżenie ilości cDNA w krótkim okresie trwania doświadczenia uzyskano również dla enzymów Sult1a1 i Gstp1, w obu przypadkach osiągnęły one wartość 74% ( $p < 0,05$ ) (Rycina 15).



**Rycina 15.** Ocena wpływu ekstraktu z surowca *H. perforatum* na poziom transkryptu genów Nat1, Nat2, Sult1a1, Ugt1a1, Gstp1 i Nrf2 z wykorzystaniem reakcji *real-time* PCR w tkance wątrobowej szczurów rasy Wistar po 3 i 10 dniach podawania p.o. Poziom cDNA odpowiada ilości mRNA wymienionych genów w komórkach. Wartość ilorazu cDNA poszczególnych genów do GAPDH w grupie kontrolnej przyjęto jako 100%. Wykres obrazuje zestawienie wartości średnich dla poszczególnych grup z SEM. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,001$  (jednoczynnikowa ANOVA).

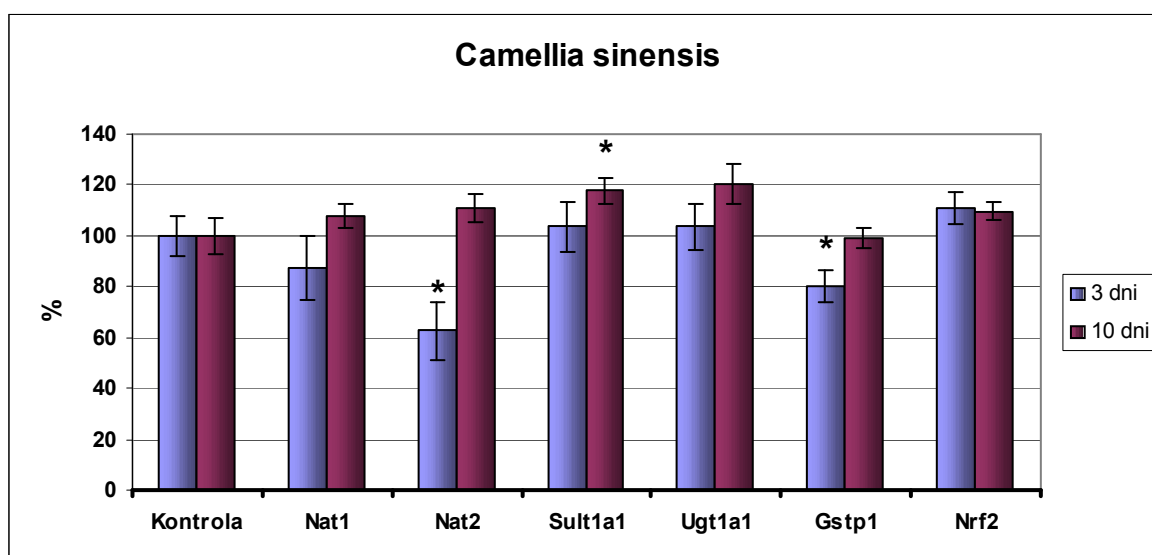
Jednocześnie zmianom tym towarzyszył niewielki spadek transkrypcji czynnika Nrf2 o około 7% w stosunku do zwierząt kontrolnych (Rycina 15). Dłuższy okres stosowania wyciągu z *H. perforatum* (10 dni) znamienne podniósł stężenie transkryptu Ugt1a1 do wartości niemal 133% względem kontroli ( $p < 0,05$ ). W przypadku pozostałych enzymów a także czynnika Nrf2 nie obserwowano istotnych zmian w ilości mRNA w tym okresie doświadczenia (Tabela 12).

**Tabela 12.** Wpływ standaryzowanego ekstraktu *Hypericum perforatum* na poziom ekspresji badanych genów w zależności od czasu podawania

Substancja roślinna	Gen	Czas podawania	Poziom ekspresji	P*
<i>H. perforatum</i> (300mg/kg, p.o.)	Nat1	3 dni	62,46 ± 10,07	<b>0,001</b>
		10dni	91,09 ± 5,42	0,326
	Nat2	3 dni	45,04 ± 8,88	<b>&lt; 0,001</b>
		10 dni	111,44 ± 4,12	0,242
	Ugt1a1	3 dni	91,76 ± 8,61	0,326
		10 dni	132,93 ± 7,81	<b>0,007</b>
	Sult1a1	3 dni	73,8 ± 6,42	<b>0,001</b>
		10 dni	108,1 ± 3,59	0,122
	Gstp1	3dni	74,27 ± 5,2	<b>0,003</b>
		10 dni	106,44 ± 4,57	0,521
	Nrf2	3 dni	93,17 ± 6,44	0,085
		10 dni	92,85 ± 4,93	0,480

#### 4.3.2. Efekt wyciągu z liści *Camellia sinensis* na poziom mRNA badanych enzymów i czynnika Nrf2

Zastosowanie zielonej herbaty w postaci wyciągu w dawce 300 mg/kg p.o. przez okres 3 dni obniżyło poziom transkryptu genów Nat2 i Gstp1 odpowiednio do wartości około 62% i 80% względem zwierząt kontrolnych ( $p < 0,05$ ) (Rycina 16).



**Rycina 16.** Ocena wpływu ekstraktu z surowca *C. sinensis* na poziom transkryptu genów Nat1, Nat2, Sult1a1, Ugt1a1, Gstp1 i Nrf2 z wykorzystaniem reakcji *real-time* PCR w tkance wątrobowej szczurów rasy Wistar po 3 i 10 dniach podawania p.o. Poziom cDNA odpowiada ilości mRNA wymienionych genów w komórkach. Wartość ilorazu cDNA poszczególnych genów do GAPDH w grupie kontrolnej przyjęto jako 100%. Wykres obrazuje zestawienie wartości średnich dla poszczególnych grup z SEM. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,001$  (jednoczynnikowa ANOVA).

Ekspresja izoformy Nat1 kształtowała się w tym okresie blisko wartości 87%. Wydłużenie doświadczenia do 10 dni zwiększyło poziom mRNA Sult1a1 o ponad 17% ( $p < 0,05$ ) oraz Ugt1a1 o powyżej 20% względem grupy karmionej standardową dietą. Zależności tej nie obserwowano w krótkim okresie stosowania ekstraktu. Niewielki efekt indukcji (około 110%) w dłuższym czasie zanotowano również dla Nat2 a także czynnika Nrf2, przy czym dla wyników tych nie uzyskano istotności statystycznej. W zastosowanym modelu *in vivo* po 10 dniach nie uzyskano znamienych zmian w ekspresji Nat1 i Gstp1 (Tabela 13).

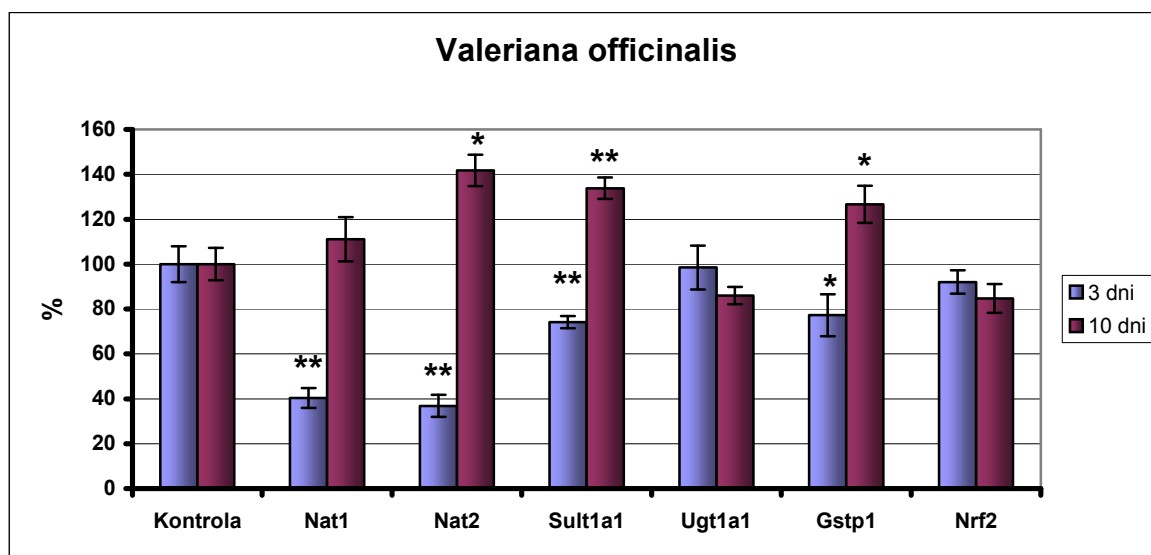
**Tabela 13.** Wpływ standaryzowanego ekstraktu *Camellia sinensis* na poziom ekspresji badanych genów w zależności od czasu podawania

Substancja roślinna	Gen	Czas podawania	Poziom ekspresji	P*
<i>C. sinensis</i> (300mg/kg, p.o.)	Nat1	3 dni	87,21 ± 12,43	0,245
		10dni	107,62 ± 4,83	0,371
	Nat2	3 dni	62,56 ± 11,76	<b>0,007</b>
		10 dni	110,88 ± 5,76	0,322
	Ugt1a1	3 dni	103,46 ± 9,32	0,692
		10 dni	120,47 ± 7,85	0,079
	Sult1a1	3 dni	103,49 ± 9,84	0,702
		10 dni	117,61 ± 5,42	<b>0,015</b>
	Gstp1	3dni	80,37 ± 6,47	<b>0,027</b>
		10 dni	98,99 ± 3,84	0,914
	Nrf2	3 dni	110,97 ± 6,14	0,418
		10 dni	109,67 ± 3,81	0,138

#### 4.3.3. Efekt wyciągu z korzenia *Valeriana officinalis* na poziom mRNA badanych enzymów i czynnika Nrf2

W komórkach wątroby zwierząt otrzymujących wyciąg z *V. officinalis* w dawce 300 mg/kg p.o. przez okres 3 dni wykazano znaczny spadek transkryptów genów Nat1 i Nat2 o wartość odpowiednio 60% oraz 63% względem zwierząt otrzymujących standardową dietę ( $p < 0,001$ ). Po 10 dniach eksperymentu obserwowano znamienne zwiększenie stężenia mRNA Nat2 do wartości blisko 142% co świadczyć może o indukcji tej izoformy na etapie transkrypcji ( $p < 0,05$ ). Poziom Nat1 wzrósł jedynie o około 11%, przy czym wynik ten nie jest istotny statystycznie. Efekt nasilonej ekspresji po dłuższym stosowaniu wyciągu zanotowano również wobec Sult1a1 do poziomu ponad 134% ( $p < 0,001$ ) oraz Gstp1 do wartości blisko

127% ( $p < 0,05$ ) (Rycina 17). Obie izoformy wykazywały obniżoną ekspresję po 3 dniach stosowania ekstraktu z *V. officinalis* przy zastosowanej dawce 300 mg/kg p.o.. Względny poziom ekspresji Sult1a1 wyniósł wówczas około 74% ( $p < 0,001$ ) natomiast Gstp1 około 77% ( $p < 0,05$ ).



**Rycina 17.** Ocena wpływu ekstraktu z surowca *V. officinalis* na poziom transkryptu genów Nat1, Nat2, Sult1a1, Ugt1a1, Gstp1 i Nrf2 z wykorzystaniem reakcji *real-time* PCR w tkance wątrobowej szczurów rasy Wistar po 3 i 10 dniach podawania p.o. Poziom cDNA odpowiada ilości mRNA wymienionych genów w komórkach. Wartość ilorazu cDNA poszczególnych genów do GAPDH w grupie kontrolnej przyjęto jako 100%. Wykres obrazuje zestawienie wartości średnich dla poszczególnych grup z SEM. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,001$  (jednoczynnikowa ANOVA).

**Tabela 14.** Wpływ standaryzowanego ekstraktu *Valeriana officinalis* na poziom ekspresji badanych genów w zależności od czasu podawania

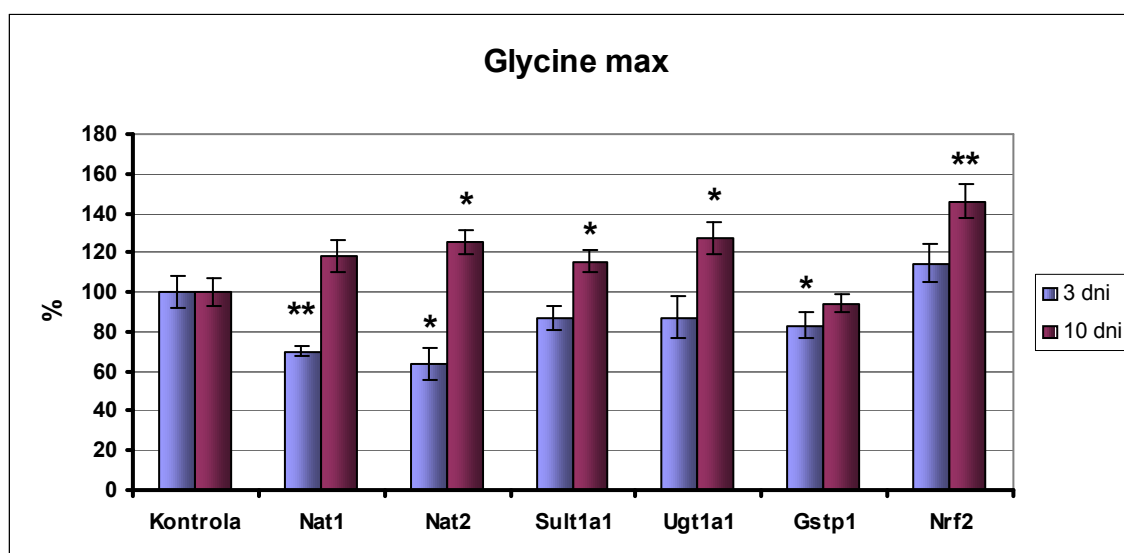
Substancja roślinna	Gen	Czas podawania	Poziom ekspresji	$P^*$
<i>V. officinalis</i> (300mg/kg, p.o.)	Nat1	3 dni	40,37 ± 4,39	< 0,001
		10dni	111,07 ± 9,86	0,373
	Nat2	3 dni	36,83 ± 4,94	< 0,001
		10 dni	141,74 ± 6,97	0,003
	Ugt1a1	3 dni	98,49 ± 9,78	0,867
		10 dni	86,02 ± 3,89	0,091
	Sult1a1	3 dni	74,17 ± 2,69	< 0,001
		10 dni	133,81 ± 4,79	< 0,001
	Gstp1	3dni	77,26 ± 9,37	0,029
		10 dni	126,62 ± 8,29	0,044
	Nrf2	3 dni	92,02 ± 5,22	0,527
		10 dni	84,74 ± 6,44	0,086

Jednocześnie wykazano, że ilość transkryptu izoformy Ugt1a1 pozostaje niezmienna przy 3 dniach podawania wyciągu z kozłka lekarskiego, natomiast po 10 dniach obserwowano niewielkie hamowanie enzymu na etapie transkrypcji o wartość niemal 14% względem grupy zwierząt kontrolnych (Tabela 14). Zastosowany ekstrakt nieznacznie obniżył ilość mRNA czynnika transkrypcyjnego Nrf2 o wartość około 8% po 3 dniach oraz 15% po 10 dniach podawania. Wynik ten nie był istotny statystycznie (Tabela 14).

#### **4.3.4. Efekt wyciągu z nasion *Glycine max* na poziom mRNA badanych enzymów i czynnika Nrf2**

Analiza poziomu ekspresji Nat1 oraz Nat2 w tkance wątrobowej zwierząt otrzymujących wyciąg *G. max* w dawce 100 mg/kg p.o. przez okres 3 dni wykazała, że obie izoformy uległy redukcji zanotowanej na poziomie mRNA do wartości 70% ( $p < 0,001$ ) oraz około 64% ( $p < 0,05$ ) względem zwierząt nie otrzymujących tego preparatu. Po 10 dniach podawania ekstraktu nie obserwowano efektu hamowania lecz zwiększenie stężenia transkryptu tych enzymów odpowiednio w przybliżeniu o wartości 18% oraz 26% ( $p < 0,05$ ). Niewielkie obniżenie ilości mRNA o wartość około 13% w krótkim okresie stosowania wyciągu obserwowano dla enzymów Sult1a1 i Ugt1a1. Dłuższe podawanie prowadziło do istotnego statystycznie ( $p < 0,05$ ) nasilenia ich ekspresji odpowiednio o około 16% oraz 27% względem grupy kontrolnej (Rycina 18).

Redukcji ekspresji Gstp1 obserwowanej w tkankach zwierząt otrzymujących ekstrakt przez 3 dni do poziomu około 83% względem kontroli nie zanotowano po 10 dniach trwania eksperymentu. Wykazano jednocześnie istotny statystycznie wzrost względnego poziomu ekspresji czynnika Nrf2 do wartości ponad 146% ( $p < 0,001$ ) po 10 dniach podawania wyciągu w dawce 100 mg/kg p.o. W krótszym okresie indukcja utrzymywała się na poziomie 15% przy braku istotności dla tego wyniku (Tabela 15).



**Rycina 18.** Ocena wpływu ekstraktu z surowca *G. max* na poziom transkryptu genów Nat1, Nat2, Sult1a1, Ugt1a1, Gstp1 i Nrf2 z wykorzystaniem reakcji *real-time* PCR w tkance wątrobowej szczurów rasy Wistar po 3 i 10 dniach podawania p.o. Poziom cDNA odpowiada ilości mRNA wymienionych genów w komórkach. Wartość ilorazu cDNA poszczególnych genów do GAPDH w grupie kontrolnej przyjęto jako 100%. Wykres obrazuje zestawienie wartości średnich dla poszczególnych grup z SEM. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,001$  (jednoczynnikowa ANOVA).

**Tabela 15.** Wpływ standaryzowanego ekstraktu *Glycine max* na poziom ekspresji badanych genów w zależności od czasu podawania

Substancja roślinna	Gen	Czas podawania	Poziom ekspresji	$P^*$
<i>G. max</i> (100mg/kg, p.o.)	Nat1	3 dni	70,21 ± 2,81	< 0,001
		10dni	118,31 ± 8,21	0,105
	Nat2	3 dni	63,72 ± 7,85	0,002
		10 dni	125,61 ± 5,83	0,007
	Ugt1a1	3 dni	87,42 ± 10,39	0,192
		10 dni	127,04 ± 8,19	0,028
	Sult1a1	3 dni	87,19 ± 6,19	0,075
		10 dni	115,68 ± 5,74	0,034
	Gstp1	3dni	83,12 ± 6,56	0,050
		10 dni	94,47 ± 4,94	0,579
Nrf2	3 dni	114,74 ± 9,14	0,384	
	10 dni	145,96 ± 8,55	< 0,001	

## 5 OMÓWIENIE WYNIKÓW

### 5.1. Ocena metody badawczej zastosowanej do pomiaru poziomu ekspresji genów w modelu zwierzęcym (szczur)

Niedostateczna wiedza z zakresu poznania molekularnego podłoża interakcji pomiędzy preparatami roślinnymi a lekami syntetycznymi skłania do podjęcia badań w kierunku pełnego poznania tego typu interakcji celem zwiększenia bezpieczeństwa i skuteczności farmakoterapii. Badania przedkliniczne przeprowadzone w niniejszej pracy doktorskiej z wykorzystaniem modelu zwierzęcego miały na celu określenie wpływu standaryzowanych ekstraktów roślinnych na poziom ekspresji wybranych enzymów II fazy metabolizmu leków w wątrobie. W oparciu o pewną konserwatywność i podobieństwo sekwencyjne GST, SULT, NAT oraz zdolność metabolizowania podobnych substancji w odniesieniu do ludzkich enzymów II fazy wykorzystano szczury rasy Wistar, które w porównaniu do badań *in vitro* umożliwiły uzyskanie bardziej wiarygodnych wyników w aspekcie funkcjonowania całego organizmu a w konsekwencji możliwość ekstrapolacji uzyskanych obserwacji na człowieka. Powyższe stwierdzenie wynika z faktu, iż badania na zwierzętach pozwalają na pobranie tkanek narządów i umożliwiają pełniejsze poznanie biochemicznych i molekularnych mechanizmów działania, dlatego też stanowią lepszy model eksperymentalny w odniesieniu do badań *in vitro*. Ponadto, doświadczenia przeprowadzone *in vitro* nie zawsze przekładają się na faktyczny stan *in vivo* i dlatego trudno jest wówczas przenieść otrzymane wyniki do badań klinicznych w odniesieniu do funkcjonowania organizmu. Należy podkreślić, że ortologicznymi odpowiednikami ludzkich enzymów NAT1 i NAT2 są odpowiednio szczurze enzymy Nat2 i Nat1, które wykazują częściowe podobieństwo sekwencji i zdolność metabolizowania niektórych substancji, będących substratami ludzkich NAT.

Na podstawie przeglądu piśmiennictwa można także wnioskować, że analizy indukcji lub hamowania enzymów II fazy metabolizmu prowadzone w oparciu o techniki hybrydyzacyjne, test immunoenzymatyczny ELISA oraz badania aktywności nie dają możliwości oznaczenia precyzyjnego ilościowych zmian transkryptu badanych genów. W tym celu dla pomiaru poziomu ekspresji genów Nat1, Nat2, Sult1a1, Ugt1a1, Gstp1 oraz czynnika transkrypcyjnego Nrf2, biorącego udział w regulacji transkrypcji genów kodujących enzymy

II fazy wykorzystano technikę real-time PCR, która pozwala na wgląd w kinetykę reakcji PCR oraz dokładne i szybkie oszacowanie początkowej ilości badanego DNA pod wpływem badanych substancji. Technika ta poprzedzona reakcją odwrotnej transkrypcji, która jest znacznie bardziej czuła niż testy immunoenzymatyczne ELISA i metody hybrydizacyjne, umożliwia w czasie rzeczywistym wnioskować wpływ analizowanego czynnika nie tylko na poziomie transkryptomu ale również w aspekcie syntezy białka.

W pracy doktorskiej dla zapewnienia powtarzalności otrzymanych wyników dokonano właściwej optymalizacji techniki rt-PCR. Specyficzność produktów reakcji zapewniono poprzez odpowiednio dobrane do sekwencji startery warunkujące amplifikację wyłącznie wybranych fragmentów cDNA oraz stosując wysokiej jakości odczynniki. W celu potwierdzenia specyficzności stosowanej metody wykorzystano analizę krzywej topnienia produktu, zakładając, iż czułość oraz powtarzalność techniki rt-PCR z użyciem fluorochromu SYBR Green I umożliwiającego detekcję amplikonu jest porównywalna do metody z sondami fluorescencyjnymi. Wyniki standaryzowano względem genu referencyjnego GAPDH o stabilnej ekspresji, który to umożliwił wykluczenie ewentualnych odstępstw pod względem ilości i jakości matrycy wykorzystywanej w reakcji. Ponadto dla określenia poziomu ekspresji badanych genów zastosowano aparat LightCycler® ze systemem kapilarowym, który posiada większą czułość i dokładność niż system płytkowy.

## **5.2. Wpływ *Hypericum perforatum* na poziom ekspresji wybranych enzymów II fazy biotransformacji**

Ze względu na fakt, że dziurawiec indukuje aktywność enzymów cytochromu P450, powodując niepowodzenia leczenia z powodu zwiększonego metabolizmu wielu leków ocenie poddano wpływ standaryzowanego ekstraktu z ziela dziurawca zwyczajnego na wybrane enzymy prowadzące reakcje II fazy metabolizmu ksenobiotyków. Enzym S-transferaza glutationu kodowana przez gen GSTP1 funkcjonuje w II fazie biotransformacji ksenobiotyków katalizując reakcje sprzęgania substratów z glutationem. Wykazano, że nadekspresja tego enzymu jest obserwowana w wielu typach nowotworów [Tuna i wsp., 2010]. W literaturze opisuje się również znaczące zwiększenie jej aktywności podczas indukowanej chemicznie hepatokancerogenezy [Kitahara i wsp., 1984; Sugioka i wsp., 1985]. W badaniach *in vivo* wykazano, że hamowanie ekspresji GST pi powoduje obniżenie proliferacji komórek i nasilenie apoptozy w ludzkich komórkach raka prostaty co uzasadnia



się możliwością oddziaływania GST pi na N-terminalną kinazę c-Jun 1 (JNK-1) pełniącą istotną rolę w szlakach sygnalizacji komórkowej [Hokaiwado i wsp., 2008]. Istnieje pogląd, że GST pi jest głównym wewnątrzkomórkowym celem dla hiperycyny co wykazano w ludzkich komórkach nerek [Dabrowski i wsp., 2006]. Jednak pomimo istotnego znaczenia funkcji tego enzymu liczba badań nad wpływem hiperycyny na GST pi jest bardzo ograniczona.

W badaniach prowadzonych przez zespół Tuna i wsp. (2010) nad wpływem hiperycyny w zakresie stężeń od 5-30  $\mu\text{M}$  na szczurze enzymy GST alfa i GST pi wyizolowane z jelita cienkiego wykazano, że składnik ten wiąże i hamuje oba izoenzymy lecz kinetyka tego oddziaływania nie jest jeszcze poznana. Efekt inhibicji na poziomie 45% obserwowano przy 5  $\mu\text{M}$  stężeniu a jego stopień nie zwiększał się ze wzrostem dawki hiperycyny. Autorzy uznali na tej podstawie, że w związku z udziałem GST pi w oporności na leki hamowanie enzymu może prowadzić do zwiększenia efektywności chemioterapii [Tuna i wsp., 2010].

W pracy doktorskiej prowadzonej w modelu *in vivo* obserwowano istotne obniżenie ilości cDNA u szczurów rasy Wistar otrzymujących dobowo 300mg/kg m.c. p.o. standaryzowanego na obecność 0,3% hiperycyny i 0,61% hiperforyny ekstraktu z ziela *H. perforatum* jedynie po 3 dniach podawania ( $p=0,003$ ). Poziom ekspresji genu *Gstp1* kształtował się blisko wartości 74% względem zwierząt z grupy kontrolnej. Po 10 dniach eksperymentu nie obserwowano takiej zależności. Brak jest innych doniesień literaturowych oceniających podobną zależność. Jedynie dane dotyczące możliwości oddziaływania ekstraktu z *H. perforatum* na wątrobową frakcję GST-P pochodzą z pracy zespołu Shibayama i wsp. (2004). Autorzy zanotowali odmienny od obserwowanego w pracy doktorskiej efekt przejściowej nadekspresji na poziomie białka, przy czym należy podkreślić że grupa badana miała znacząco mniejszą liczebność ( $n=3$ ). W pracy tej wykorzystano dawki dobowe 40 oraz 400mg/kg m. c. podawane doustnie przez odpowiednio 1, 3, 10, 15 i 30 dni. Poziom ekspresji określono poprzez ocenę ilości białka o masie cząsteczkowej 24 kDa techniką Western blott. Wykazano, że niższa z zastosowanych dawek ekstraktu nie wpływa na poziom GST-P po 10 dniach jej stosowania, natomiast dawka 400mg/kg stosowana w tym samym okresie wywoływała nadekspresję enzymu na poziomie 252% względem kontroli. Wydłużenie eksperymentu do 15 i 30 dni, zdaniem autorów znosi nadekspresję, gdyż nie obserwowano

istotnych różnic w poziomie białek u zwierząt otrzymujących *H. perforatum* w porównaniu z grupą kontrolną [Shibayama i wsp., 2004].

W oparciu o dane z badań molekularnych wiadomo, że 15-deoksyprostaglandyna J2 indukuje ekspresję Gstp1 u szczurów poprzez przyłączenie białek c-Jun do specyficznego enhancera I Gstp1 [Kawamoto i wsp., 1999]. Sugeruje się, że nadekspresja Gstp może być indukowana przez niektóre składniki ekstraktu z *H. perforatum* będące agonistami czynnika AHR poprzez aktywację białka c-Jun. Sądzi się, że GST-P hamuje kinazę białka Jun (JNK) a jego nasiloną ekspresja może hamować fosforylację białka c-Jun związaną z hamowaniem JNK. Wobec powyższych doniesień uznać można, że stosowanie ekstraktu z *H. perforatum* może w pewnych warunkach prowadzić do zmian w reakcjach sprzężania z glutationem [Shibayama i wsp., 2004]. Sugestie te wymagają jednak potwierdzenia w badaniach *in vivo* oraz obserwacji klinicznych.

Ponadto w niniejszej pracy doktorskiej analizowano wpływ ekstraktu z dziurawca pospolitego (300mg/kg) na poziom ekspresji Sult1a1. Po 3 dniach podawania tego ekstraktu wykazano spadek poziomu ekspresji Sult1a1 o 26% ( $p < 0,05$ ) natomiast po 10 dniach zanotowano nieistotny statystycznie wzrost o 8% względem grupy kontrolnej karmionej standardową dietą. Natomiast po 3 dniach nie obserwowano znaczących zmian w poziomie ekspresji Ugt1a1 (redukcja o około 8%), przy czym dłuższe stosowanie ekstraktu wykazało tendencję wzrostową w ilości analizowanego transkryptu o wartość około 33% w porównaniu do grupy kontrolnej ( $p < 0,05$ ).Warto zauważyć, iż dotychczas nie opublikowano żadnych doniesień na temat efektu wyciągu lub składników aktywnych z *H. perforatum* na ekspresję i aktywność Sult1a1 i Ugt1a1.

Brak również doniesień na temat potencjalnej możliwości oddziaływania przetworów z surowca dziurawca zwyczajnego na ekspresję i aktywność N-acetylotransferazy. Istnieją pośrednie wskazówki opierające się na badaniach wykorzystujących prokainamid jako lek modelowy metabolizowany do N-acetylo-prokainamidu do obserwacji efektu *H. perforatum* stosowanego 1 oraz 2 tygodnie przed podaniem substratu na enzymy metabolizmu leków w modelu mysim. Autorzy na podstawie swoich obserwacji sugerowali, że dziurawiec wykazuje silny efekt zwiększenia biodostępności prokainamidu, ale nie ma wpływu na jego metabolizm [Dasgupta i wsp., 2007]. W przedstawionej pracy doktorskiej wykazano, że stosowanie preparatu z dziurawca zwyczajnego w dawce 300 mg/kg p.o. przez okres 3 dni znacząco obniżyło ilość transkryptu genów Nat1 i Nat2, odpowiednio o 38% ( $p < 0,001$ ) i 55% ( $p < 0,001$ ) w stosunku do grupy kontrolnej, przy czym dłuższe jego podawanie nie wpłynęło

znacząco na poziom ekspresji genu Nat1 i Nat2 względem grupy niepoddanej procedurze eksperymentalnej. Istniejące dotychczas badania kliniczne z tego zakresu przedstawione w 2004r. przez Wenk i wsp. (2004), prowadzone na grupie 16 osób (8 mężczyzn i 8 kobiet) przez okres 2 tygodni wykazały brak wpływu ekstraktu z dziurawca zwyczajnego (3x300mg/dzień) na aktywność enzymu NAT2.

### **5.3. Wpływ *Camellia sinensis* na poziom ekspresji wybranych enzymów II fazy biotransformacji**

Wielu autorów jest zdania, że związki fenolowe pełnią funkcję przeciwutleniaczy i induktorów enzymów detoksykacyjnych. Jednak można uznać, że efekt stosowania przetworów z zielonej herbaty na enzymy II fazy nie jest jasny bowiem istnieją nieliczne doniesienia dotyczące badań z tego zakresu. W doświadczeniach *in vitro* prowadzonych przez zespół Zanden i wsp. (2003) wykazano, iż kwercetyna w sposób zależny od dawki (1, 10, 25 i 100  $\mu\text{M}$ ) i czasu oddziaływania (1-2 h) może, w sposób odwracalny, hamować aktywność izoformy GSTP1 poprzez oddziaływanie z cysteiną w pozycji 47 struktury przestrzennej białka [Van Zanden i wsp., 2003.]. Obserwacje te zasugerowały możliwość istnienia związku między aktywnością tego enzymu a stosowaniem przetworów z liści *C. sinensis* jak również izolowanych związków aktywnych. Ponadto analizie *in vitro* poddano wpływ ekstraktu z zielonej herbaty (GTE) zawierającego 82,66% katechin, w tym 55,67% EGCG oraz 1% kofeiny jak i sam EGCG na poziom białka i mRNA GSTP1 w prawidłowych komórkach nabłonkowych oskrzeli (NHBE) i unieśmiertelnionych komórkach HBEC a także gruczolakoraka płuc (A549) [Tan i wsp., 2010]. Zastosowano dawki GTE (0,5, 1,0, 2,0 mg / l) lub EGCG (0,5, 1,0, 2,0 mmol / l) przez 24 godziny, 48 godzin, i 6 dni a oznaczenia wykonano techniką RT-PCR i Western blotting. Wykazano aktywność antyproliferacyjną komórek NHBE zależną od dawki po 48h inkubacji z EGCG lub GTE w zakresie zastosowanych stężeń. Wykazano istotne zwiększenie poziomu mRNA GSTP1 w komórkach NHBE po ekspozycji na GTE w dawce 2mg/l, przy czym największy ponad 3-krotny efekt obserwowano po 6 dniach. Natomiast po ekspozycji na izolowany EGCG nie obserwowano tego efektu. Wnioski z badań na pozostałych liniach komórkowych są analogiczne. Natomiast żadne z zastosowanych stężeń zarówno ekstraktu z zielonej herbaty jak i EGCG nie zmieniły poziomu białka GSTP1 w czasie przeznaczonym na eksperyment we wszystkich badanych liniach komórkowych [Tan i wsp., 2010]. Niektórzy autorzy (Netsch i wsp., 2006) twierdzą, iż GTE a nie EGCG indukuje CYP1A2 na etapie transkryptu w komórkach linii LS-180.

Ponadto Yan i wsp. (2007) sugerują, że preparat polifenon E zawierający 65% EGCG i 25% innych katechin oraz około 0,5% kofeiny zmniejsza ryzyko rozwoju raka płuc w przeciwieństwie do izolowanego EGCG u myszy traktowanej benzopirenem. W związku z tym autorzy sugerują, że za właściwości chemoprewencyjne może odpowiadać inny niż EGCG składnik ekstraktów zielonej herbaty [Tan i wsp., 2010].

W zaprezentowanej pracy doktorskiej zastosowanie ekstraktu zielonej herbaty w dawce 300 mg/kg p.o. przez okres 3 dni obniżyło istotnie poziom transkryptu Gstp1 o wartość około 20% względem zwierząt kontrolnych ( $p < 0,05$ ). Efekt hamowania nie był obserwowany po 10 dniach eksperymentu. Istnieją doniesienia sugerujące, że 1,4-difenole wykazują wysoką zdolność indukowania aktywności GST u szczura, co zaobserwowano po długotrwałym spożywaniu zielonej herbaty (Maliakal i wsp., 2001). Podobny wzrost poziomu GST klasy alfa zanotowano u szczurów otrzymujących galusan epigallokatechiny [Chou i wsp., 2000; Krajka-Kuźniak, 2007]. Potwierdzeniem indukcyjnego wpływu kwercetyny i katechiny są badania, gdzie podawanie ww. flawonoidów w wysokiej dawce 2g/kg m.c. (p.o.) przez okres 3 tygodni u samców szczura rasy Wistar spowodowało 24% podwyższenie aktywności wątrobowego GST przy jednoczesnym braku zmian w procesie peroksydacji lipidów i całkowitego stężenia glutationu. Autorzy zakładają, że zastosowane w pracy flawonoidy zawarte w diecie mogą być odpowiedzialne za indukcję enzymów II fazy metabolizmu ksenobiotyków, w szczególności GST i NQO1 w wątrobie [Wiegant i wsp., 2009]. Protekcyjne działanie frakcji polifenoli *Camellia sinensis* (200mg/kg m.c./dobę p.o.) analizowano w indukowanym przez podanie 4-NQO (ang. 4-nitroquinoline 1-oxide) szczurzym modelu nowotworowej zmiany jamy ustnej i języka. Wykazano statystycznie istotne ( $p < 0,05$ ) zahamowanie postępującej redukcji aktywności GST oraz UGT w badanych tkankach w porównaniu do zwierząt indukowanych 4-NQO i nie otrzymujących związków polifenolowych [Srinivasan i wsp., 2008].

W pracy nad efektem 1,5% (w/v) ekstraktu z zielonej herbaty na toksyczne działanie ołowiu u szczurów wykazano, że aktywność GST w tkance wątrobowej zwierząt otrzymujących GTE przez okres 8 tygodni jest istotnie wyższa niż u osobników otrzymujących jedynie Pb. Ponadto aktywność GST była także wyższa w nerkach u szczurów otrzymujących kombinację ekstraktu i ołowiu wobec grupy z samym Pb. Autorzy wnioskują, że doustna suplementacja GTE u zwierząt otrzymujących ołów zwiększa aktywność enzymów antyoksydacyjnych [Mehanaa i wsp., 2012]. Ponadto stosowanie diety bogatej w kwercetynę może być odwrotnie skorelowane z ryzykiem rozwoju nowotworu płuc, co

obserwowano w badaniu klinicznym zespołu Lam i wsp. (2010). Autorzy podjęli próbę wyjaśnienia molekularnego podłoża metabolizmu kwercetyny zawartej w diecie. Przeprowadzone przez autorów kompleksowe badania populacyjne na pacjentach cierpiących na nowotwór płuc doprowadziły do wnioskowania, że częstsze przyjmowanie diety bogatej w kwercetynę może skutkować indukcją transkrypcji mRNA izoform GST a w konsekwencji obniżeniem ryzyka wystąpienia kancerogenezy płuc [Lam i wsp., 2010].

W pracy doktorskiej ocenie poddano również wpływ ekstraktu z liści zielonej herbaty na aktywność Sult1a1 w wątrobie u szczurów rasy Wistar. Ze względu na fakt, iż sulfotransferazy SULT1A1 oraz SULT1A3 pełnią istotną rolę w inaktywacji agonistów receptora beta2-adrenergicznego przed osiągnięciem przez nie krążenia układowego odpowiednio w wątrobie i jelicie, hamowanie aktywności tych enzymów może, według niektórych autorów, zwiększać biodostępność doustnych leków będących substratami tych izoform [Nishimuta i wsp., 2007]. Z danych literaturowych wynika, że epikatechina występująca w surowcu nie ulega glukuronidacji w ludzkiej wątrobie a także frakcji mikrosomalnej jelita cienkiego. Natomiast podlega ona reakcjom sprzęgania z aktywowanym siarczanem w wyniku aktywności SULT1A1 w wątrobie a także z udziałem SULT1A3 w jelicie. Wskazuje to na główne szlaki metabolizmu tej frakcji flawonoidów [Vaidyanathan i Walle, 2002]. Jedyne dostępne dane *in vitro* analizujące zależność podawania aktywnych składników występujących również w przetworach z *C. sinensis* pochodzą z obserwacji zespołu Mesía-Vela i Kauffman (2003) i dotyczą hamowania przez kemferol i kwercytnę reakcji sprzęgania estradiolu z kwasem siarkowym będącej wskaźnikiem aktywności SULT1A1. Autorzy wskazują jednocześnie, że efekt kwercetyny i kemferolu był wyższy niż izoflawonów sojowych, co ich zdaniem może wynikać z liczby i ustytuowania grup hydroksylowych w cząsteczce flawonoidu [Mesía-Vela i Kauffman, 2003]. Podobny efekt hamowania aktywności ludzkich rekombinowanych izoform SULT1A1 i SULT1A3 pod wpływem zarówno ekstraktu z zielonej herbaty jak i kwercetyny, gallusanu epikatechiny i epigallokatechiny uzyskali Nishimuta i wsp. (2007). Według De Santi i wsp. (2002) kwercetyna jest potencjalnym inhibitorem aktywności ludzkiego enzymu SULT1A1 zarówno w wątrobie dorosłych jak i u płodu.

W pracy doktorskiej oceniającej efekt stosowania suplementacji diety ekstraktem z liści zielonej herbaty w dawce 300 mg/kg m.c. p.o. u szczurów rasy Wistar zanotowano brak zmian w poziomie mRNA po 3 dniach stosowania wzbogaconej diety oraz nieznaczną, istotną statystycznie indukcję transkrypcji o około 17% ( $p < 0,05$ ) po 10 dniach stosowania. Jest to

pierwsze doniesienie z zakresu badań nad efektem *C. sinensis* na stężenie transkryptu SULT1A1 w hepatocytach *in vivo* i wymaga dalszej weryfikacji.

Wpływ zielonej herbaty na aktywność enzymów UGT jest dotychczas słabo opisany. Wiadomo jedynie, że katechiny mogą wywierać indukcyjny wpływ na aktywność UGT1A1 lecz jest on wysoce zmienny [Mirkov i wsp., 2006]. W badaniach z zastosowaniem ludzkich enzymów mikrosomalnych wątroby oceniano potencjał do hamowania aktywności UGT1A1 pod wpływem kozłka lekarskiego i galusanu epigalokatechiny (EGCG) izolowanego z zielonej herbaty. Aktywność enzymu określano analizując tworzenie estradiolo-3-O-glukuronidu (E-3-G). Oba ekstrakty roślinne wykazały hamowanie UGT1A1. Zdaniem autorów EGCG posiada wysoki potencjał do generowania interakcji i wskazuje na konieczność przeprowadzenia badań klinicznych [Mohamed i wsp., 2010].

W pracy doktorskiej wykazano, że zastosowanie ekstraktu z liści zielonej herbaty w dawce 300 mg/kg m.c.p.o. u szczurów rasy Wistar indukowało transkrypcję izoenzymu Ugt1a1 po 10 dniach suplementacji. Zwierzęta otrzymujące standaryzowany wyciąg wykazywały wyższy o ponad 20% poziom mRNA względem średniej wartości w grupie kontrolnej. Zastosowanie frakcji polifenoli *Camellia sinensis* w dobowej dawce 200mg/kg m.c./dobę p.o. zdaniem zespołu Srinivasan i wsp. (2008) statystycznie istotnie hamuje spadek aktywności UGT w indukowanym podaniem 4-NQO szczurzym modelu nowotworowej zmiany jamy ustnej i języka [Srinivasan i wsp., 2008].

W niniejszej pracy analizowano również wpływ standaryzowanego ekstraktu z zielonej herbaty na ekspresję genów Nat1 i Nat2. Stosowanie tego preparatu przez okres 3 dni istotnie statystycznie ( $p < 0,05$ ) obniżyło poziom transkryptu Nat2 o 37% w stosunku do grupy kontrolnej, natomiast ekspresja Nat1 zmalała o 13%. Po 10 dniach podawania zanotowano brak zmian w ekspresji zarówno Nat1 jak i Nat2 w stosunku do grupy kontrolnej. Jedyne badania analizujące potencjalne zdolności aktywnych składników surowców roślinnych, w tym pochodzących z zielonej herbaty przeprowadził Kukongviriyapan i wsp. (2006). Zespół ten podjął analizę oddziaływania pochodnych kwasu cyjankowego oraz flawonoidów i kumaryny na aktywność NAT1 NAT2 w komórkach ludzkiej wątroby oraz na linii komórek KMBC ludzkiego raka dróg żółciowych. Autorzy obserwowali efekt hamowania aktywności NAT1 pod wpływem kwasu galusowego i EGCG a także kwasu kofeinowego i ferulowego. Inne badane flawonoidy takie jak skopuletyna i kurkumina wysoce specyficznym hamowały aktywność NAT2 przy braku zmian NAT1. W odróżnieniu do wyżej opisanych związków flawonoidy takie jak kwercetyna i kemferol wykazały aktywność

hamującą obie izoformy NAT. Wykazano również, że kinetyka reakcji hamowania NAT1 przez kwas kawowy, EGCG i kwercyinę wskazuje na ich charakter inhibitora niekonkurencyjnego, podobnie jak hamowanie NAT2 przez kwercyinę, kurkuminę i kemferol. Wobec powyższego istnieją podstawy do obserwacji wpływu tego surowca na aktywności N-acetylotransferaz w pracach klinicznych.

#### **5.4. Wpływ *Valeriana officinalis* na poziom ekspresji wybranych enzymów II fazy biotransformacji**

Preparaty kozłka lekarskiego są środkami szeroko stosowanymi w zaburzeniach snu i stanach lękowych. Ze względu na ich popularność niezbędne jest określenie bezpieczeństwa stosowania w aspekcie wpływu na aktywność enzymów katalizujących przemianę leków w organizmie. Analiza publikacji oraz doniesienia o możliwości występowania interakcji między produktami zawierającymi przetwory lub substancje pozyskane z korzenia kozłka lekarskiego ze standardową terapią dostarczają powodów do badań nad farmakologicznymi punktami uchwytu związków biologicznie aktywnych tego surowca. Potencjalnych powodów oddziaływania na losy leków w organizmie można poszukiwać na etapie I i II fazy biotransformacji. Istnieją bowiem dane literaturowe sugerujące taki wpływ na funkcjonowanie izoform cytochromu P450, głównie CYP3A4, CYP2C9 i CYP2C19 [Foti i Wahlstrom, 2008]. Niestety brak jest badań nad wpływem ekstraktu i substancji czynnych tego surowca na enzymy II fazy biotransformacji ksenobiotyków. W pracy doktorskiej obserwowano istotny efekt nasilonej ekspresji Gstp1 po 10 dniach stosowania wyciągu *V. officinalis* w dawce 300 mg/kg p.o., gdzie osiągnął on wartość blisko 127% ( $p < 0,05$ ) względem grupy szczurów rasy Wistar ( $n=10$ ) otrzymujących standardową dietę. W krótszym okresie czasu podawania zanotowano spadek poziomu mRNA o niespełna 23% ( $p < 0,05$ ). Ponadto stwierdzono, iż podawanie szczurom ekstraktu z kozłka lekarskiego w zastosowanej dawce spowodowało istotny statystycznie spadek w poziomie transkrypty Sult1a1 o około 26% po 3 dniach oraz istotny statystycznie wzrost o niemal 34% po 10 dniach. Podobnie wyniki kształtowały się dla mRNA Nat1 i Nat2, ponieważ zanotowano istotne statystycznie ( $p < 0,001$ ) obniżenie poziomu ekspresji dla tych enzymów odpowiednio o 60% i 63%. Dłuższe stosowanie ekstraktu wykazało tendencję podwyższenia w ilości analizowanego transkrypty o wartość około 42% dla Nat2 i 11% dla Nat1 w porównaniu do grupy kontrolnej.

Observacje pochodzące z przedstawionej pracy doktorskiej są jedynymi dostępnymi z tej tematyki dla opisanych enzymów.

Ponadto w badaniach na ludzkich mikrosomach wątroby wykazano, że alkoholowy ekstrakt z tego surowca hamuje zależne od aktywności UGT tworzenie glukuronidów acetaminofenu, estradiolu, morfiny i testosteronu, a stopień redukcji w przypadku estradiolu wynosi nawet około 87%. Podobne efekty redukcji obserwowano na poziomie aktywności UGT1A1 i UGT2B7 w obecności ekstraktu z kozłka i substratów odpowiednio estradiolu i morfiny. Efekt ten zanotowano także dla izolowanego kwasu walerenowego. Wobec powyższych obserwacji autorzy twierdzą, iż istnieje możliwość oddziaływania produktów zawierających *V. officinalis* na reakcje glukuronidacji związków endogennych oraz ksenobiotyków [Alkharfy i Frye, 2007]. Na tej podstawie podjęto w pracy doktorskiej również próbę weryfikacji wpływu ekstraktu z korzenia kozłka lekarskiego na ekspresję Ugt1a1 w modelu *in vivo*. Na poziomie mRNA obserwowano niewielkie obniżenie stężenia transkryptyu tego genu o wartość około 14% w wątrobie u szczurów rasy Wistar po 10 dniach stosowania wyciągu.

### **5.5. Wpływ *Glycine max* na poziom ekspresji wybranych enzymów II fazy biotransformacji**

Izoflawony sojowe stanowią grupę związków fenolowych o istotnym znaczeniu w chemoprewencji. Niektórzy autorzy prac badawczych uznają, że składniki aktywne zawarte w nasionach soi mogą być induktorami aktywności enzymów II fazy metabolizmu ksenobiotyków [Appelt i Reicks, 1997]. Istnieją doniesienia z badań *in vitro* sugerujące, że składnikiem tym może być genisteina mogąca regulować ekspresję genów kodujących enzymy zaangażowane w biotransformację. W celu weryfikacji tych właściwości zespół Lepri i wsp. (2012) przeprowadził obserwacje nad wpływem genisteiny i daidzeniny na aktywność GST oraz poziom ekspresji genu GSTA2. Wykazano chemoprotekcyjne i antymutagenne właściwości daidzeiny i genisteiny z ekstraktów soi w nowotworowych komórkach wątrobowych (HTC) objawiające się między innymi wzrostem aktywności cytoplazmatycznej GST. Badania prowadziły do obserwacji potwierdzających brak cytotoksycznego wpływu zastosowanych izoflawonów na komórki oraz zmniejszenie stopnia indukowanych chemicznie zmian DNA. Hodowla komórek z obecnością genisteiny i daidzeniny w stężeniu



10  $\mu$ M wykazała zwiększenie aktywności GST przy jednoczesnym braku zmian na poziomie transkryptu genu GSTA2 [Lepri i wsp., 2012]. Pomimo, iż wśród uwarunkowań wpływu diety sojowej na zmniejszenie ryzyka zachorowania na nowotwory typuje się możliwość oddziaływania składników tego surowca na aktywność enzymów I i II fazy biotransformacji, efekt ten jest słabo poznany w warunkach *in vivo* [Froyen i wsp., 2009].

W pracy doktorskiej zanotowano nieznaczne obniżenie poziomu transkryptu Gstp1 po 3 dniach stosowania ekstraktu w dawce 100mg/kg m.c. p.o. do wartości 83% względem grupy kontrolnej ( $p=0,05$ ). Po 10 dniach stosowania preparatu poziom cDNA w grupie badanej nie różnił się istotnie od wartości uzyskanej wśród samców szczura rasy Wistar z grupy kontrolnej. Brak znaczącego wpływu na aktywność całkowitego GST w wątrobie w porównaniu do grupy kontrolnej obserwowano w pracy Wiegand i wsp. (2009) w badaniu na szczurach karmionych dietą bogatą w genisteinę (200mg/kg masy ciała) przez okres 22 dni. Zastosowany przez autorów długi okres podawania wraz z dietą wysokiej dawki izolowanej genisteiny wpłynął na poziom mRNA izoenzymu Gsta2 znacząco go podnosząc oraz obniżając ilość transkryptów Gstm2 i Gstp1. Jednocześnie autorzy nie zanotowali zmian w poziomie transkryptu i białka czynnika zaangażowanego w transkrypcję enzymów II fazy Nrf2 w wątrobie [Wiegand i wsp., 2009]. Redukcję aktywności GST w wątrobie u samic myszy rasy Swiss Webster zanotowano w pracy Froyen i wsp. (2009) pod wpływem genisteiny 1500mg/kg w diecie. Odmienny efekt określono w nerkach gdzie nastąpił wzrost aktywności badanego enzymu pod wpływem zarówno genisteiny jak i daidzeiny, przy czym najwyższą indukcję obserwowano u samców [Froyen i wsp., 2009]. W obserwacjach innego zespołu zanotowano istotnie zwiększony poziom aktywności GST u szczurów Sprague-Dawley otrzymujących przez 7 i 14 dni mąkę sojową a także w grupie ze swobodnym dostępem do izolatu białka sojowego przez 2 tygodnie względem grupy kontrolnej [Appelt i Reicks, 1997]. Długoterminowe (13 tygodni) stosowanie białkowego izolatu sojowego zawierającego izoflawony (0,81 mg/g) w diecie samic szczura Sprague-Dawley ( $n=6-7$ ) prowadzi, zdaniem zespołu Appelt i Reicks (1999), do blisko 16-krotnego wzrostu aktywności transferazy S- glutationowej. Krótszy czas trwania doświadczenia wiązał się z indukcją katalityczną enzymu na poziomie 183% mierzoną w nerkach badanych zwierząt otrzymujących w diecie najwyższą zawartość izoflawonów (0,81 mg/g) w stosunku do grupy otrzymującej oczyszczoną kazeinę [Appelt i Reicks, 1999]. Jest to potwierdzenie wcześniejszych sugestii Cai i Wei (1996) o wyższym poziomie aktywności transferazy S- glutationowej w skórze, jelicie cienkim, tkance wątrobowej, nerkach i płucach myszy typu

SENCAR otrzymujących przez 30 dni w diecie 50 ppm genisteiny [Cai i Wei, 1996]. Stosowanie diety wzbogaconej o 7,5% (w/w) *G. max* przez 90 dni powoduje zwiększenie aktywności GST u myszy z indukowanym DMBA nowotworem skóry i rakiem szyjki macicy wywołanym narażeniem na MCA. Autorzy uznają, że ekstrakt może mieć właściwości chemoprewencyjne poprzez modyfikację enzymów detoksykacyjnych [Singh i wsp., 2011].

Analiza danych literaturowych wskazuje, że regulacja ekspresji sulfotransferaz przez hormony i cząsteczki endogenne jest poznana relatywnie dobrze w porównaniu do indukcji ich aktywności przez substancje egzogenne dotychczas niedostatecznie opisanej. Doniesienia z prac *in vitro* i *in vivo* potwierdzają, że izoflawony mogą oddziaływać z czynnikami jądrowymi zaangażowanymi w ekspresję enzymów metabolizmu leków. Mesía-Vela i Kauffman (2003) na podstawie swoich obserwacji uznają, że genisteina i daidzeina *in vitro* hamują sprzężanie estradiolu z kwasem siarkowym w II fazie biotransformacji będącej wskaźnikiem aktywności SULT1A1 [Mesía-Vela i Kauffman, 2003]. Harris i wsp. (2004) potwierdzają w badaniach *in vitro*, że flawonoidy, w tym głównie genisteina i daidzeina, mogą wpływać na ekspresję enzymów katalizujących przemiany estrogenów i w ten sposób zmieniać równowagę między poziomem hormonów i ich metabolitów w ludzkich tkankach. W pracy Chen i wsp. (2008) obserwowano natomiast zwiększenie aktywności Sult1a1 w ludzkich nowotworowych komórkach wątroby (HepG2) i jelita cienkiego (Caco2) proporcjonalnie do zastosowanej w eksperymencie dawki (0,2, 0,5, 1, 5 i 25  $\mu\text{M}$ ) i długości ekspozycji na genisteinę w okresie 7 dni. Przy 25  $\mu\text{M}$  stężeniu genisteiny w komórkach HepG2 obserwowano blisko 10-krotne zwiększenie ekspresji mRNA Sult1a1 i 2,5-krotne zwiększenie ilości badanego białka. Zbliżone efekty działania genisteiny obserwowano również w komórkach Caco2 gdzie badany izoflawonoid w stężeniach 1, 5 i 25  $\mu\text{M}$  spowodował zwiększenie ilości mRNA Sult1a1 odpowiednio - 1,3 -; 3,4 - i 11,3 - krotnie a na poziomie białka, odpowiednio: 1,2 -; 1,8 - i 2,3 - krotnie [Chen i wsp., 2008]. W modelu *in vivo* w pracy doktorskiej zastosowanie dawki 100mg/kg m.c. p.o. ekstraktu z nasion soi związane było z obserwacją obniżenia poziomu mRNA Sult1a1 po 3 dniach o około 13% oraz niewielką indukcją transkrypcji po 10 dniach na poziomie około 115% ( $p < 0,05$ ) względem grupy kontrolnej karmionej standardową dietą. Badanie to jest jedynym dostępnym zawierającym ocenę efektu wyciągu z surowca na poziom transkryptu Sult1a1 w modelu szczurzym.

Ze względu na obserwowany związek konsumpcji soi i jej produktów z obniżeniem ryzyka rozwoju niektórych typów nowotworów poszukuje się uzasadnienia tych zależności

poprzez analizę wpływu składników aktywnych i przetworów na aktywność enzymów I i II fazy biotransformacji ksenobiotyków. Badania te podjęte zostały w celu weryfikacji hipotezy wskazującej na zdolność zawartych w diecie izoflawonów sojowych do zwiększania aktywności UGT i GST funkcjonujących w II fazie w krótkim okresie stosowania. Uznaje się, że główne izoflawony soi – genisteina i daidzeina ulegają glukuronidacji w II fazie biotransformacji. W warunkach *in vitro* zespół Pritchett i wsp. (2008) wykazał, że za katalizę reakcji sprzęgania tych izoflawonów z kwasem UDP-glukuronowym odpowiadają UGT1A1 i UGT1A9. Wnioskuje się jednocześnie, że międzyosobnicze zróżnicowanie w zakresie korzystnego dla zdrowia stosowania tych flawonoidów może wynikać również ze zróżnicowanej aktywności UGT1A1 [Pritchett i wsp. 2008].

W niniejszej pracy doktorskiej analiza ekspresji na poziomie mRNA wykazała istotną indukcję stężenia transkryptu w tkance wątrobowej u zwierząt otrzymujących z diety standaryzowany ekstrakt sojowy w ilości 100mg/kg m.c. podawany p.o. w ciągu kolejnych 10 dni. Ilość cDNA dla genu *Ugt1a1* osiągnęła wartość o ponad 27% wyższą niż w grupie zwierząt karmionych standardową dietą. Po 3 dniach stosowania preparatu obserwowano nieistotny, blisko 13% spadek ilości mRNA badanego genu przy tej samej dawce i drodze podawania. Warto podkreślić, że efekt indukcji UGT u szczurów rasy Sprague-Dawley na poziomie aktywności po 2 tygodniach stosowania białkowego izolatu sojowego o zawartości izoflawonów 0,03; 0,4 i 0,81 mg/g sugerował zespół Appelt i Reicks (1999). Efekt indukcji w badaniach tych zależał od zawartości izoflawonów w diecie i obserwowany był zarówno w wątrobie, jak i nerkach, jelicie cienkim oraz okrężnicy badanych zwierząt [Appelt i Reicks, 1999]. W pracy prowadzonej na samcach i samicach myszy rasy Swiss Webster przez okres 1, 3, 5 i 7 dni wykazano iż genisteina i daidzeina w dawce 1500mg/kg w paszy powodowały niewielki spadek aktywności UGT w niektórych tkankach. Aktywność GST w wątrobie była zredukowana pod wpływem genisteiny u samic, natomiast wzrosła w nerkach pod wpływem zarówno genisteiny jak i daidzeiny. Najsilniejsze zmiany w tych organach obserwowano w okresie od 3 do 5 tego dnia doświadczenia. Obserwowano również, że samce wykazują wyższą aktywność UGT i GST niż samice [Froyen i wsp., 2009].

W niniejszej pracy doktorskiej analizowano również wpływ *G. max* na aktywność N-acetylotransferaz *Nat1* i *Nat2*. Wykazano, że przyjmowanie ekstraktu tego surowca w dawce 100 mg/kg p.o. przez okres 3 dni zmniejszyło istotnie ilość transkryptu genów *Nat1* i *Nat2* względem grupy niepoddanej procedurze eksperymentalnej, odpowiednio o 30% ( $p < 0,001$ ) i 36% ( $p < 0,05$ ). Po 10 dniach obserwowano wzrost ekspresji *Nat1* o 18% i *Nat2* o

26% w stosunku do grupy kontrolnej. Wpływ genisteiny w dawce 1g dziennie na zmiany aktywności enzymów zaangażowanych w metabolizm kofeiny, w tym N-acetylotransferazy 2 u zdrowych kobiet (n=18) analizowano w badaniu zespołu Chen i wsp. (2011). W pilotażowym badaniu klinicznym po 14 dniach nie zanotowano zmian aktywności NAT2 na podstawie obserwacji ilościowych pomiarów produktów II fazy metabolizmu kofeiny w moczu badanych ochotniczek. Zmiany stwierdzono dla enzymów takich jak CYP1A2 i oksydaza ksantynowa (XO), gdzie zanotowano redukcję oraz dla indukowanej izoformy CYP2A6 [Chen i wsp., 2011].

## 5.6. Wpływ standaryzowanych ekstraktów roślinnych na poziom ekspresji czynnika Nrf2

W niniejszej pracy analizowano także wpływ standaryzowanych ekstraktów z surowców *H. perforatum*, *Camellia sinensis*, *Valeriana officinalis* oraz *Glycine max* na aktywność czynnika transkrypcyjnego Nrf2 biorącego udział w regulacji enzymów II fazy. Istotnie statystycznie zmiany obserwowano tylko w przypadku podawanego dożołądkowo preparatu z soi w dawce 100mg/kg., gdzie po 10 dniach stosowania zanotowano wzrost poziomu transkryptu Nrf2 o 46% ( $p < 0,001$ ). W przypadku pozostałych ekstraktów zauważono nieistotne zmiany na poziomie około 10%. Badania przeprowadzone przez Zhang i wsp. (2009) wskazują na udział czynnika transkrypcyjnego Nrf2 w procesie regulacji ekspresji Ugt1a. Katechiny należące do polifenolowych związków zawartych w zielonej herbacie uznawane są za główne jej składniki o właściwościach przeciwnowotworowych. Sugeruje się, że najsilniejsze właściwości antyoksydacyjne i chemoprewencyjne posiada gallusan epigalokatechiny (EGCG). W badaniach podkreślono potencjalny chemoprewencyjny charakter EGCG w patogenezie nowotworu jelita grubego (model *in vitro* i *in vivo*) polegający na proporcjonalnej do dawki EGCG indukcji czynnika Nrf2 a następnie Ugt1a [Zhang i wsp., (2009)].

W pracy na ludzkich komórkach raka okrężnicy Caco-2 i HT-29 poddanych inkubacji z EGCG badano udział białka Nrf2 w indukcji ekspresji UGT1A. Wykazano indukcyjny wpływ tego związku na mRNA i białko Nrf2. Autorzy twierdzą, że białko Nrf2 zlokalizowane jest w cytoplazmie komórek niestymulowanych a po poddaniu EGCG ulega szybkiej jądrowej akumulacji. W związku z tym uznają, że EGCG indukuje ekspresję UGT1A

poprzez mechanizm zależny od białka Nrf2 [Yang i wsp., 2006]. W pracy doktorskiej nie zanotowano istotnych zmian ekspresji Nrf2 pod wpływem standaryzowanego ekstraktu z liści zielonej herbaty. Ponadto EGCG może mieć zdolność regulacji czynnika Nrf2 i nasilenia aktywności innych enzymów II fazy biotransformacji, w tym GST. Postuluje się, że mechanizm ten może przebiegać poprzez interakcje EGCG z Keap1 oraz fosforylację reszt seroninowo-treoninowych czynnika Nrf2. W konsekwencji dochodzi do translokacji Nrf2 do jądra komórkowego oraz stymulacji ekspresji genów II fazy w wyniku oddziaływania z sekwencją ARE w regionie promotora [Zhao i wsp., 2010].

Związkom polifenolowym przypisuje się właściwości przeciwutleniające. Wykazano w linii komórkowej HepG2, że kwercetyna nasila aktywność transkrypcyjną zależną od czynnika Nrf2, gdyż zwiększa poziom mRNA i białka Nrf2 a także stabilizuje czynnik chroniąc go przed ubikwitynacją i proteosomalną degradacją. Wykazano, że jednocześnie kwercetyna znacząco zmniejsza poziom białka Keap1. W badaniach wykazano, że wyciszenie Keap1 z użyciem siRNA powoduje istotne nasilenie zależnej od Nrf2 aktywności ARE, natomiast wyciszenie w ten sam sposób Nrf2 wywołuje odwrotny efekt [Tanigawa i wsp., 2007]. Dalsze badania na ludzkich nowotworowych komórkach wątroby HepG2 wskazują, że aktywacja Nrf2 przez kwercetynę może odbywać się w sposób zależny od czasu ekspozycji (4, 18h) i dawki (5 - 50  $\mu$ M) poprzez aktywację białka p38 należącego do szlaku kinaz MAP [Granado-Serrano i wsp., 2012].

## 5.7. Podsumowanie

Zaprezentowane w niniejszej rozprawie doktorskiej wyniki badań molekularnych dotyczące analizy wpływu wyciągów roślinnych na poziom ekspresji wybranych genów kodujących enzymy II fazy metabolizmu ksenobiotyków w modelu *in vivo* poruszają niezwykle istotny aspekt współczesnej farmakoterapii i fitoterapii w zakresie oddziaływania terapeutycznego preparatów pochodzenia roślinnego na organizm. Wnikliwy przegląd dostępnych danych literaturowych pokazuje, że dotychczas przeprowadzono niewielką ilość badań z zakresu podłoża molekularnego wpływu substancji roślinnych na enzymy metabolizujące leki, w szczególności w modelu *in vivo*. Potrzeba takich badań jest jednak ogromna z uwagi na fakt wzrastającego zainteresowania preparatami roślinnymi we współczesnym społeczeństwie, stosowania ich w formie leków OTC lub suplementów diety,

co prowadzić może do wystąpienia licznych działań niepożądanych. Zaprezentowane w niniejszej rozprawie doktorskiej badania dotyczące niezwykle ważnych z punktu widzenia surowców zielarskich, takich jak ziele dziurawca (*Hyperici herba*), kozłek lekarski (*Valeriana officinalis*), zielona herbata (*Camellia sinensis*) oraz soja (*Glycine max*), stanowią wkład w rozwój współczesnej farmakoterapii przede wszystkim w zakresie oceny profilu bezpieczeństwa. Realizowany w niniejszej rozprawie doktorskiej cel badawczy dotyczący oceny zmian poziomu ekspresji genów *Nat1*, *Nat2*, *Sult1a1*, *Ugt1a1* oraz *Gstp1*, kodujących enzymy II fazy metabolizmu leków pod wpływem standaryzowanych wyciągów roślinnych (*Hypericum perforatum*, *Valeriana officinalis*, *Camellia sinensis* oraz *Glycine max*) w szurzej tkance wątrobowej z wykorzystaniem techniki *real-time* PCR oraz oceny poziomu ekspresji czynnika transkrypcyjnego *Nrf2*, biorącego udział w regulacji transkrypcji *Gstp1* i *Ugt1a1* zaowocował uzyskaniem interesujących wyników. Pozwalają one wnioskować o znaczącej roli badanych ekstraktów roślinnych w modulowaniu aktywności enzymów II fazy metabolizmu, co jest niezwykle istotne dla dalszego rozwoju fitoterapii i farmakoterapii.

Ponadto, podsumowując zebrane dane z piśmiennictwa na temat wpływu roślin zielarskich na aktywność enzymów II fazy i regulację ich ekspresji poprzez czynnik transkrypcyjny *Nrf2* można stwierdzić, iż prezentowane badania mają charakter kompleksowy a uzyskane wyniki przeprowadzonych analiz zależą od surowca, dawki oraz drogi podania, gatunku na którym prowadzone jest badanie a także czasu przyjmowania i technik przygotowania preparatu.

Warto także podkreślić, iż badania nad regulacją enzymów II fazy, ze względu na ich związek z metabolizmem leków w tym również chemioterapeutyków, prowadzone są w aspekcie podnoszenia efektywności i redukcji skutków ubocznych leczenia, dlatego możliwość manipulacji w ekspresję tych enzymów przez ekstrakty roślinne mogłaby znaleźć praktyczne zastosowanie w profilaktyce i leczeniu wielu chorób cywilizacyjnych. Ze względu na nieliczne dane z piśmiennictwa na temat wpływu preparatów roślinnych na enzymy II fazy metabolizmu leków przewidzenie interakcji leków syntetycznych i przetworów z surowców zielarskich jest wyjątkowo trudne. Z tego względu zachodzi konieczność podejmowania dalszych badań z tego zakresu.

## 6. WNIOSKI

- W badaniu *in vivo* wykazano wpływ powszechnie stosowanych substancji roślinnych na aktywność enzymów Nat1, Nat2, Sult1a1, Ugt1a1 oraz Gstp1 uczestniczących w II fazie metabolizmu leków obserwując:
  - a) redukcję ilości transkryptu Nat1 i Nat2 (po podaniu *H. perforatum*, *C. sinensis*, *V. officinalis* i *G. max*), Gstp1 (po podaniu *H. perforatum* i *C. sinensis*) oraz Sult1a1 (po podaniu *H. perforatum*) po 3 dniach stosowania ekstraktów
  - b) zwiększenie ilości mRNA Nat1 (po podaniu *G. max*), Nat2 (po podaniu *V. officinalis* i *G. max*), Gstp1 (po podaniu *V. officinalis*), Ugt1a1 (po podaniu *C. sinensis* i *G. max*) oraz Sult1a1 (po podaniu *C. sinensis*, *V. officinalis* i *G. max*) po 10 dniach stosowania ekstraktów.
  
- Uzyskane wyniki sugerują, iż Nat1 i Nat2 są bardziej wrażliwe niż pozostałe badane enzymy II fazy metabolizmu leków na stymulację substancjami naturalnymi. Wyniki badania sugerują, że podobny efekt może dotyczyć homologicznych ludzkich enzymów NAT1 i NAT2, co może być przyczyną zmian parametrów farmakokinetycznych leków będących substratami tych enzymów, zwiększając ryzyko wystąpienia działań niepożądanych związanych z obniżoną efektywnością biotransformacji.
  
- Brak korelacji pomiędzy poziomem ekspresji czynnika transkrypcyjnego Nrf2 a enzymami Gstp1 i Ugt1a1 regulowanymi przez ten czynnik sugeruje, iż na poziomie molekularnym modulacja ekspresji tych enzymów przy udziale Nrf2 ma miejsce na drodze pośredniej lub poprzez inny endogeny mechanizm regulacji.

## 7. STRESZCZENIE

Zdolność organizmu ludzkiego do biotransformacji ksenobiotyków (leków, prokancerogenów, składników diety) i ich eliminacji jest naturalnym procesem, który zwykle prowadzi do redukcji ich aktywności biologicznej. Metabolizm ksenobiotyków opiera się o biochemiczne procesy ich przemian i zachodzi w dwóch fazach przy udziale określonych enzymów. Enzymy fazy I katalizują głównie reakcje oksydacji, redukcji i hydrolizy, co prowadzi do powstania hydrofilnych metabolitów zwykle wykazujących zredukowaną aktywność biologiczną. W fazie II 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, przygotowanych do wydalenia z moczem lub żółcią. Przemiany te zachodzą przy udziale transferaz, m.in. UDP-glukuronylotransferazy (UGT), S-transferazy glutationu (GST), sulfotransferazy (SULT), metylotransferazy (MT) i N-acetylotransferazy (NAT), przy czym skuteczna biotransformacja ksenobiotyków związana jest ze skoordynowanym działaniem enzymów uczestniczących w każdej fazie metabolizmu.

Wiele substancji roślinnych o znaczeniu leczniczym lub wartościach odżywczych może wpływać na enzymy metabolizmu ksenobiotyków. Dowiedziono, że niektóre leki roślinne, powszechnie uważane za bezpieczne mogą wchodzić w interakcje z innymi lekami i zmniejszać ich skuteczność terapeutyczną. W związku z tym, aby ograniczyć liczbę niepożądanych zdarzeń związanych ze stosowaniem medycyny niekonwencjonalnej, konieczne jest podjęcie badań nad preparatami roślinnymi, oceniając ich działanie, objawy niepożądane i interakcje z lekami syntetycznymi w oparciu o modulację aktywności enzymów uczestniczących w ich detoksykacji.

Celem badań niniejszej pracy doktorskiej była ocena zmian poziomu ekspresji genów *Nat1*, *Nat2*, *Sult1a1*, *Ugt1a1* oraz *Gstp1*, kodujących enzymy II fazy metabolizmu leków pod wpływem standaryzowanych wyciągów roślinnych (*Hypericum perforatum*, *Valeriana officinalis*, *Camellia sinensis* oraz *Glycine max*) w szurzej tkance wątrobowej z wykorzystaniem techniki *real-time* PCR. Doświadczenie przeprowadzono na szczurach rasy Wistar, którym podano wyciągi roślinne przez okres 3 i 10 dni. Oceniono również poziom ekspresji czynnika transkrypcyjnego *Nrf2*, biorącego udział w regulacji transkrypcji *Gstp1* i *Ugt1a1*.



W badaniu wykazano statystycznie istotny spadek poziomu ekspresji Nat1 po 3 dniach stosowania ekstraktów z *H. perforatum* (38%,  $p = 0,001$ ), *V. officinalis* (60%,  $p < 0,001$ ) i *G. max* (30%,  $p < 0,001$ ) względem grupy kontrolnej. Zaobserwowano, że poziom ekspresji mRNA dla genu Nat2 uległ również znacznej redukcji po 3 dniach podawania ekstraktów *H. perforatum* (55%,  $p < 0,001$ ), *V. officinalis* (63%,  $p < 0,001$ ), *G. max* (26%,  $p = 0,002$ ) oraz *C. sinensis* (37%,  $p = 0,007$ ). Spadek ilości transkryptu zanotowano także dla Sult1a1 po zastosowaniu *H. perforatum* (26%,  $p = 0,001$ ) oraz Gstp1 po podaniu *H. perforatum* (26%,  $p = 0,003$ ) i *C. sinensis* (20%,  $p = 0,027$ ). W przypadku 10-dniowego podawania ekstraktów zaobserwowano wzrost poziomu ekspresji Nat1 (*G. max*, 18%,  $p = 0,105$ ), Nat2 (*V. officinalis*, 42%,  $p = 0,003$  i *G. max*, 26%,  $p = 0,007$ ), Gstp1 (*V. officinalis*, 27%,  $p = 0,044$ ), Ugt1a1 (*C. sinensis*, 20%,  $p = 0,079$  i *G. max*, 27%,  $p = 0,028$ ) oraz Sult1a1 (*C. sinensis*, 18%,  $p = 0,015$ ; *V. officinalis*, 34%,  $p < 0,001$  i *G. max*, 16%,  $p = 0,034$ ). Analizując ilość transkryptu dla czynnika transkrypcyjnego Nrf2 wykazano jedynie wzrost o 46% ( $p < 0,001$ ) pod wpływem *G. max* po 10 dniach jego stosowania.

Uzyskane wyniki sugerują, iż standaryzowane ekstrakty roślinne mogą modulować aktywność enzymów II fazy metabolizmu, a tym samym uczestniczyć w klinicznie znaczących interakcjach z lekami syntetycznymi będącymi ich substratami. Stwierdza się także, iż Nat1 i Nat2 są bardziej wrażliwe na stymulację preparatami roślinnymi niż pozostałe badane enzymy II fazy metabolizmu leków. Ponadto, w oparciu o otrzymane wyniki badań postuluje się, iż ekspresja enzymów Gstp1 i Ugt1a1 przy udziale Nrf2 ma miejsce na drodze pośredniej lub poprzez inny endogenny mechanizm regulacji.

## 8. SUMMARY

The ability of the human body to biotransformation of xenobiotics (drugs, procancerogens, dietary ingredients) and their elimination is a natural process, which usually leads to a reduction in their biological activity. The metabolism of xenobiotics is based on the biochemical processes of transformation and occurs in two phases (phase I and phase II) with the participation of specific enzymes. Phase I enzymes catalyze reactions of oxidation, reduction and hydrolysis which leads to the formation of hydrophilic metabolites showing reduced biological activity. Phase II biotransformation reactions are carried out by acetylation, methylation, glucuronidation or sulfation which usually leads to the formation of inactive compounds, better soluble in water, prepared to elimination through the urine or the bile. These changes take place with the participation of transferases including UDP-glucuronosyltransferase (UGT), glutathione S-transferase (GST), sulfotransferase (SULT) methyltransferase (MT) and N-acetyltransferase (NAT). The effect on the biotransformation of xenobiotics is associated with a coordinated action of the enzymes involved in the metabolism of each phase.

Many herbal substances of therapeutic or nutrition importance can affect the enzymes of xenobiotic metabolism. Some herbal medicines, generally regarded as safe may interact with other medications and reduce their therapeutic efficacy. Therefore, to reduce the number of side effects associated with the use of alternative medicine, it is necessary to take the study of plant preparations to assess their effects, side effects and interactions of synthetic drugs based on modulation of the activity of enzymes involved in detoxification.

The purpose of study was to evaluate changes in gene expression of Nat1, Nat2, Sult1a1, Ugt1a1 and Gstp1, encoding phase II enzymes of drug metabolism under the influence of standardized herbal extracts (*Hypericum perforatum*, *Valeriana officinalis*, *Camellia sinensis* and *Glycine max*) in rat liver tissue using real-time PCR techniques. The experiment was performed on Wistar rats dosed with herbal extracts for 3 and 10 days. There was also assessed the level of expression of the Nrf2 transcription factor which is involved in transcriptional regulation of Gstp1 and Ugt1a1.

The study showed a statistically significant decrease in the level of Nat1 gene expression after 3 days of treatment of *H. perforatum* extracts (38%,  $p = 0.001$ ), *V. officinalis* (60%,  $p < 0.001$ ), and *G. max* (30%,  $p < 0.001$ ) relative to the control group. It was observed that the expression level of mRNA for Nat2 gene has also a significant

reduction after 3 days of administration of *H. perforatum* extracts (55%,  $p < 0.001$ ); *V. officinalis* (63%,  $p < 0.001$ ), *G. max* (26%,  $p = 0.002$ ) and *C. sinensis* (37%,  $p = 0.007$ ). Decrease in the amount of transcript was observed also for the Sult1a1 gene after use of *H. perforatum* (26%,  $p = 0.001$ ) and for Gstp1 after administration of *H. perforatum* (26%,  $p = 0.003$ ) and *C. sinensis* (20%,  $p = 0.027$ ). In the case of 10-day extracts administration it was shown an increase in the level of Nat1 expression (*G. max*, 18%,  $p = 0.105$ ), Nat2 (*V. officinalis*, 42%,  $p = 0.003$  and *G. max*, 26%,  $p = 0.007$ ), Gstp1 (*V. officinalis*, 27%,  $p = 0.044$ ), Ugt1a1 (*C. sinensis*, 20%,  $p = 0.079$ , and *G. max*, 27%,  $p = 0.028$ ) and Sult1a1 (*C. sinensis*, 18%,  $p = 0.015$ ; *V. officinalis*, 34%,  $p < 0.001$  and *G. max*, 16%,  $p = 0.034$ ). Analyzing the amount of transcript for the transcription factor Nrf2 it was shown only a 46% increase ( $p < 0.001$ ) by the *G. max* after 10 days of application.

These results suggest that the standardized extracts can modulate the activity of the phase II drug metabolizing enzymes and thus participate in a clinically significant interaction with synthetic drugs which are their substrates. It is noted that Nat1 and Nat2 genes are more sensitive to stimulation by herbal extracts than other studied phase II enzymes of drug metabolism. Furthermore, based on the obtained results it is postulated that expression of GSTP1 and UGT1A1 enzyme with the participation of Nrf2 takes place in an indirect manner, or by other endogenous regulatory mechanism.

## 9. LITERATURA

1. Alkharfy KM, Frye RF. Effect of valerian, valerian/hops extracts, and valerenic acid on glucuronidation in vitro. *Xenobiotica*. 2007 Feb;37(2):113-23.
2. Anderson GD, Rosito G, Mohustsy MA, Elmer GW. Drug interaction potential of soy extract and Panax ginseng. *J Clin Pharmacol*. 2003; 43: 643-648.
3. Ando Y, Ueoka H, Sugiyama T, Ichiki M., Shimokata K., Hasegawa Y. Polymorphisms of UDP-glucuronosyltransferase and pharmacokinetics of irinotecan. *Ther Drug Monit*, 2002;24:111-116
4. Appelt LC, Reicks MM. Soy feeding induces phase II enzymes in rat tissues. *Nutr Cancer*. 1997;28(3):270-5.
5. Appelt LC, Reicks MM. Soy induces phase II enzymes but does not inhibit dimethylbenz[a]anthracene-induced carcinogenesis in female rats. *J Nutr*. 1999; 129(10):1820-6.
6. 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.
7. Bachmann KA, Lewis JD, Fuller MA, Bonfiglio MF. *The Drug Interactions Handbook – The New Standard for Drug and Herbal Interactions*. 2<sup>nd</sup> edition, Lexi-Comp, Inc, Hudson, Ohio 2004.
8. Badyal DK, Dadhick AP. Cytochrome P450 and drug interactions. *Indian J Pharmacol*. 2001; 33: 248-259.
9. Bagdonaite E, Janulis V, Ivanauskas L, Labokas J. Between species diversity of *Hypericum perforatum* and *H. maculatum* by the content of bioactive compounds. *Nat Prod Commun*. 2012; 7(2): 199-200.
10. Bladt S, Wagner H. MAO- Hemmung durch Fraktionen und Inhaltsstoffe von *Hypericum* Extrakt. *Nervenheilkunde*. 1993; 12: 349-52.
11. 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.
12. Bon S, Hartmann K, Kubn M. Johanniskraut: Ein Enzyminduktor? *Schweizer Apothekezeitung*. 1999; 16: 535.
13. Breidenbach Y, Hoffmann MW, Becher T, Schlitt H, Klempnauer J. Drug interaction of St. John's wort with cyclosporin. *Lancet*. 2000; 355: 1912.

14. Buck, M, Chojkier, M. Signal transduction in the liver: C/EBPbeta modulates cell proliferation and survival. *Hepatology* 2003; 37: 731-738.
15. 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.
16. Butcher NJ, Tetlow NL, Cheung C, Broadhurst GM, Minchin RF. Induction of human arylamine N-acetyltransferase type I by androgens in human prostate cancer cells. *Cancer Res* 2007; 67(1):85–92.
17. 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.
18. 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.
19. Cai Q, Wei H. Effect of dietary genistein on antioxidant enzyme activities in SENCAR mice. *Nutr Cancer.* 1996;25(1):1-7.
20. Chanas SA, Jiang Q, McMahon M, McWalter GK, McLellan LI, Elcombe CR, Henderson CJ, Wolf CR, Moffat GJ, Itoh K, Yamamoto M, Hayes JD. Loss of the Nrf2 transcription factor causes a marked reduction in constitutive and inducible expression of the glutathione S-transferase *Gsta1*, *Gsta2*, *Gstm1*, *Gstm2*, *Gstm3* and *Gstm4* genes in the livers of male and female mice. *Biochem. J* 2002; 365: 405–416
21. Chen GW, Chung JG, Hsieh CL, Lin JG. Effects of the garlic components diallyl sulfide and diallyl disulfide on arylamine N-acetyltransferase activity in human colon tumour cells. *Ford Chem Toxicol* 1998; 36(9–10):761–770.
22. Chen Y, Huang C, Zhou T, and Chen G. Genistein induction of human sulfotransferases in HepG2 and Caco-2 cells. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2008; 103(6): 553–559.
23. Chen Y, Xiao CQ, He YJ, Chen BL, Wang G, Zhou G, Zhang W, Tan ZR, Cao S, Wang LP, Zhou HH. Genistein alters caffeine exposure in healthy female volunteers. *Eur J Clin Pharmacol.* 2011;67(4):347-53.
24. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987;162(1):156-9.
25. Chou F.P., Chu Y.C., Hsu J.D., Chiang H.C., Wang C.J.: Specific induction of glutathione S-transferase GSTM2 subunit expression by epigallocatechin gallate in rat liver. *Biochem. Pharmacol.*, 2000; 60:643–650.

26. 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.
27. Coffman BL, King CD, Rios GR, Tephly TR. The glucuronidation of opioids, other xenobiotics, and androgens by human UGT2B7Y(268) and UGT2B7H(268). *Drug Metab Dispos* 1998; 26(1):73–77.
28. Cole B., Ketterer B. The role of glutathionetransferases in chemical carcinogenesis. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 1999; 25: 47-70.
29. Court MH, Hazarika S, Krishnaswamy S, Finel M, Williams JA. Novel polymorphic human UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 2A3: Cloning, functional characterization of enzyme variants, comparative tissue expression, and gene induction. *Mol Pharmacol* 2008; 74(3):744-754.
30. Dabrowski MJ, Maeda D, Zebala J, Lu WD, Mahajan TJ, Kavanagh WM. Glutathione S-transferase P1-1 expression modulates sensitivity of human kidney 283 cells to photodynamic therapy with hypericin. *Arch Biochem Biophys.* 2006; 449: 94-103.
31. Dajani R, Hood AM, Coughtrie MW. A single amino acid, glu146, governs the substrate specificity of a human dopamine sulfotransferase, SULT1A3. *Mol Pharmacol* 1998; 54(6):942–948.
32. Dasgupta A, Hovanetz M, Olsen M, Wells A, Actor JK *Arch Pathol Lab Med.* Drug-herb interaction: effect of St John's wort on bioavailability and metabolism of procainamide in mice. 2007 Jul;131(7):1094-8.
33. De Santi C, Pietrabissa A, Mosca F, Rane A, Pacifici GM. Inhibition of phenol sulfotransferase (SULT1A1) by quercetin in human adult and foetal livers. *Xenobiotica.* 2002;32(5):363-8.
34. 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.
35. 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.
36. 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.
37. 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.
38. Feng WY. Metabolism of green tea catechins: an overview. *Curr Drug Metab.* 2006;7(7):755-809.
  39. Forman BM, Tzamelis I, Choi HS, Chen J, Simha D, Seol W, Evans RE, Moore DD. Androstane metabolites bind to and deactivate the nuclear receptor CAR- $\beta$ . *Nature.* 1998; 395: 612-615.
  40. Foti RS, Wahlstrom JL. The role of dietary supplements in cytochrome P450-mediated drug. *Interactions Bol. Latinoam. Caribe Plant Med Aromaticas.* 2008; 7(2): 66-84.
  41. Froyen EB, Reeves JL, Mitchell AE, Steinberg FM. Regulation of phase II enzymes by genistein and daidzein in male and female Swiss Webster mice. *J Med Food.* 2009;12(6):1227-37.
  42. Gajewska B, Usarek E, Kaźmierczak B, Kukwa W, Kukwa A, Barańczyk-Kuźma A. Ekspresja izoenzymów transferazy S-glutationowej w płaskonabłonkowym raku języka i dna jamy ustnej. *Pol. Merk. Lek.,* 2007, XXIII, 135, 196.
  43. Gallagher E.P., Gardner J.L., Barber D.S. Several glutathione S-transferase isozymes that protect against injury are expressed in human liver mitochondria. *Biochem. Pharmacol.* 2006;71: 1619-1628.
  44. Gamage N, Barnett A, Hempel N, Duggleby RG, Windmill KF, Martin JL, McManus ME. Human sulfotransferases and their role in chemical metabolism. *Toxicol Sci* 2006; 90(1):5-22
  45. 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.
  46. Glatt H, Meinel W. Pharmacogenetics of soluble sulfotransferases (SULTs). *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2004;369 (1):55-68.
  47. Gonzalez FJ, Tukey RH. Drug metabolism. In Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. Edited by Brunton LL, Lazo JS, Parker KL. Eleventh edition New York, McGraw-Hill: Medical Publishing Division. 2006; 71-91.
  48. Granado-Serrano AB, María Angeles Martín, Laura Bravo, Luis Goya, Sonia Ramos Quercetin modulates Nrf2 and glutathione-related defenses in HepG2 cells: Involvement of p38 *Chemico-Biological Interactions* 2012;195(2):154–164
  49. Gupta S, Saha B, Giri AK. Comparative antimutagenic and anticlastogenic effects of green tea and black tea: a review. *Mutat Res.* 2002;512(1):37-65.

50. 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.
51. Harris RM, Wood DM, Bottomley L, Blagg S, Owen K, Hughes PJ, Waring RH, Kirk CJ. Phytoestrogens Are Potent Inhibitors of Estrogen Sulfation: Implications for Breast Cancer Risk and Treatment *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism April 1, 2004;89(4): 1779-1787.*
52. Hein DW. Molecular genetics and function of NAT1 and NAT2:role in aromatic amine metabolism and carcinogenesis. *Mutat Res* 2002;506-507:65-77.
53. 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.
54. 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.
55. 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.
56. Hempel N, Gamage N, Martin JL, McManus ME. Human cytosolic sulfotransferase SULT1A1. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39(4):685-9.
57. Hokaiwado N, Takeshita F, Naiki-Ito A, Asamoto M, Ochiya T, Shirai T. Glutathione S-transferase pi mediates proliferation of androgen- independent prostate cancer cells. *Carcinogenesis* 2008;29(6):1134-1138.
58. Holtzclaw WD, Dinkova-Kostova AT, Talalay P. Protection against electrophile and oxidative stress by induction of phase 2 genes: the quest for the elusive sensor that responds to inducers. *Adv. Enzyme Regul.*, 2004; 44: 335–367.
59. Ishii Y, Nurrochmad A, Yamada H. Modulation of UDP-glucuronosyltransferase activity by endogenous compounds. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2010;25(2):134-48.
60. Iyer L, Das S, Janisch L, et al. UGT1A1\*28 polymorphism as a determinant of irinotecan disposition and toxicity. *Pharmacogenomics J*. 2002; 2:43-47.
61. IyerL, Hall D, Das S, et al. Phenotype-genotype correlation of in vitro SN38 (active metabolite of irinotecan) and bilirubin glucuronidation in human liver tissue with UGT1A1 promoter polymorphism. *Clin. Pharmacol. Ther*, 1999;65:576-582.



62. Jakovljevic V, Popovic M, Mimica-Dukic N, Sabo A, Gvozdenovic L. Pharmacodynamic study of *Hypericum perforatum* L. *Phytomedicine*. 2000; 7: 449-53.
63. Jancova P, Anzenbacher P, Anzenbacherova E. Phase II drug metabolizing enzymes. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2010; 154(2):103–116.
64. Jansen PL. Diagnosis and management of Crigler-Najjar syndrome. *Eur J Pediatr* 1999; 158:89-94.
65. 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.
66. 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.
67. Kang KW, Cho IJ, Lee CH, Kim SG. Essential role of phosphatidylinositol 3-kinase dependent CCAAT/enhancer binding protein beta activation in the induction of glutathione S-transferase by oltipraz. *J. Natl. Cancer Inst*. 2003; 95: 53-66.
68. Kawamoto Y, Nakamura Y, Naito Y, Torii Y, Kumagai T, Osawa T, Ohigashi H, Satoh K, Imagawa M, Uchida K. Cyclopentenone prostaglandins as potential inducers of phase II detoxification enzymes 15-deoxy d-12,14-prostaglandin j2-induced expression of glutathione s-transferases. *The Journal of Biological Chemistry* 2000; 275:11291-11299.
69. Kawamura A, Graham J, Mushtaq A, Tsiftoglou SA, Vath GM, Hanna PE, Wagner CR, Sim E. Eucaryotic arylamine N-acetyltransferase. Investigation of substrate specificity by highthroughput screening. *Biochem Pharmacol* 2005; 69(2):347-359.
70. 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.
71. 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.
72. Kitahara A, Satoh K, Nishimura K, Ishikawa T, Ruike K, Sato K, Tsuda H, Ito N. Changes in molecular forms of rat hepatic glutathione S-transferase during chemical hepatocarcinogenesis. *Cancer Research* 1984; 44:2698-2703.

73. Kłodowska-Duda GA., Samelska JA., Opala GM. Polimorfizm N-acetylotransferazy 2 a patogeneza chorób nowotworowych. *Wiadomości Lekarskie* 2005, LVIII, 3-4.
74. Köhle C., Bock K.W. Activation of coupled Ah receptor and Nrf2 gene batteries by dietary phytochemicals in relation to chemoprevention. *Biochem Pharmacol*, 2006; 72: 795–805
75. Krajka-Kuźniak V. Indukcja enzymów II fazy jako strategia chemioprewencji nowotworów i innych schorzeń degeneracyjnych. *Postępy Hig Med Dosw.* 2007; 61: 627-638.
76. Kukongviriyapan V, Phromsopha N, Tassaneeyakul W, Kukongviriyapan U, Sripa B, Hahnvajjanawong V, Bhudhisawasdi V. Inhibitory effects of polyphenolic compounds on human arylamine N-acetyltransferase 1 and 2. *Xenobiotica*. 2006;36(1):15-28.
77. Kukongviriyapan V, Phromsopha N, Tassaneeyakul W, Kukongviriyapan U, Sripa B, Hahnvajjanawong V, Bhudhisawasdi V. Inhibitory effects of polyphenolic compounds on human arylamine N-acetyltransferase 1 and 2. *Xenobiotica* 2006; 36(1):15–28.
78. Kwak MK, Wakabayashi N, Kensler TW. Chemoprevention through the Keap1-Nrf2 signaling pathway by phase 2 enzyme inducers. *Mutat. Res.* 2004; 555: 133–148.
79. Lam TK, Rotunno M, Lubin JH, Wacholder S, Consonni D, Pesatori AC, Bertazzi PA, Chanock SJ, Burdette L, Goldstein AM, Tucker MA, Caporaso NE, Subar AF and Landi MT. Dietary quercetin, quercetin-gene interaction, metabolic gene expression in lung tissue and lung cancer risk. *Carcinogenesis* 2010;31(4): 634–642.
80. Lamer-Zarawska E, Kowal-Gierczak B, Niedworok J. *Fitoterapia i leki roślinne*. Wydawnictwo lekarskie PZWL, Warszawa 2007.
81. Landi S. Mammalian class theta GST and differential susceptibility to carcinogens: a review. *Mutat. Res.* 2000; 463: 247–283.
82. Lepri SR, Luiz RC, Zanelatto LC, da Silva PB, Sartori D, Ribeiro LR, Chemoprotective activity of the isoflavones, genistein and daidzein on mutagenicity induced by direct and indirect mutagens in cultured HTC cells. *Mantovani MS Cytotechnology*. 2012 Jun 30.
83. Lin JG, Chen GW, Su CC, Hung CF, Yang CC, Lee JH, Chung JG. Effects of garlic components diallyl sulfide and diallyl disulfide on arylamine N-acetyltransferase activity and 2-aminofluorene-DNA adducts in human promyelocytic leukemia cells. *Am J Chin Med* 2002; 30(2–3):315–325.
84. Lindsay J, Wang LL, Li Y, Zhou SF. Structure, function and polymorphism of human cytosolic sulfotransferases. *Curr Drug Metab* 2008; 9(2):99-105.
85. 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.

86. Lutz W, Tarkowski M, Nowakowska E. Polimorfizm genetyczny S-Transferaz Glutationowych jako czynnik predysponujący do wystąpienia alergii skórnej. *Medycyna Pracy*, 2001; 52; 1; 45—51.
87. Mackenzie PI, Rogers A, Treloar J, Jorgensen BR, Miners JO, Meech R. Identification of UDP glycosyltransferase 3A1 as a UDP N-acetylglucosaminyltransferase. *J Biol Chem* 2008; 283(52):36205-36210.
88. 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.
89. 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.
90. Maliakal PP, Coville PF, Wanwimolruk S. Tea consumption modulates hepatic drug metabolizing enzymes in Wistar rats. *J Pharm Pharmacol*. 2001; 53: 569-577.
91. Maliakal PP, Wanwimolruk S. Effect of herbal teas on hepatic drug metabolizing enzymes in rats. *J Pharm Pharmacol*. 2001; 53: 1323-1329.
92. McKay DL, Blumberg JB: The role of tea in human health: An update. *J Am Coll Nutr* 21:1-13, 2002.
93. Mehanaa EE, Raheim A, Mekib, Fazili KM. Ameliorated effects of green tea extract on lead induced liver toxicity in rats *Experimental and Toxicologic Pathology* 2012; 64: 291-295.
94. Mesía-Vela S, Kauffman FC. Inhibition of rat liver sulfotransferases SULT1A1 and SULT2A1 and glucuronosyltransferase by dietary flavonoids.. *Xenobiotica*. 2003;33(12):1211-20.
95. Miners JO, Knight KM, Houston JB, Mackenzie PI. In vitro-in vivo correlation for drugs and other compounds eliminated by glucuronidation in humans; pitfalls and promises. *Biochem Pharm* 2006; 71(11):1531-1539.
96. Mirkov S, Komoroski BJ, Ramírez J, Graber AY, Ratain MJ, Strom SC, Innocenti F. Effects of green tea compounds on irinotecan metabolism. *Drug Metab Dispos*. 2007;35(2):228-33.
97. Mohamed MF, Tseng T, Frye RF. Inhibitory effects of commonly used herbal extracts on UGT1A1 enzyme activity. *Xenobiotica*. 2010;40(10):663-9.
98. Mohamed ME, Frye RF. Effects of herbal supplements on drug glucuronidation. Review of clinical, animal, and in vitro studies. *Planta Med*. 2011; 77(4):311-21.

99. 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.
100. 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.
101. 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.
102. 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.
103. Mrozikiewicz PM. Wyciąg z dziurawca zwyczajnego (*Hypericum perforatum*) – interakcje farmakologiczne. *Postępy Fitoterapii*. 2001; 7: 12-16.
104. Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Schafer-Korting M: *Farmakologia i toksykologia*. Wydawnictwo Medyczne Urban & Partner, Wrocław, 2004.
105. Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Ruth P, Schafer-Korting M. *Farmakologia i toksykologia podręcznik*. MedPharm Polska, 2010.
106. Netsch MI, Gutmann H, Schmidlin CB, Aydogan C, Drewe J. Induction of CYP1A by green tea extract in human intestinal cell lines. *Planta Med*. 2006;72:514–20.
107. Nishimuta H, Ohtani H, Tsujimoto M, Ogura K, Hiratsuka A, Sawada Y. Inhibitory effects of various beverages on human recombinant sulfotransferase isoforms SULT1A1 and SULT1A3. *Biopharm Drug Dispos*. 2007;28(9):491-500.
108. 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.
109. Oakley AJ. Glutathione transferases: New functions. *Curr Opin Struct Biol*. 2005; 15: 716-723.
110. Okai Y, Higashi-Okai K. Potent suppressive activity of nonpolyphenolic fraction of green tea (*Camellia sinensis*) against genotoxin-induced umu C gene expression in *Salmonella typhimurium* (TA 1535/pSK 1002), tumor promoter-dependent ornithine decarboxylase induction of BALB/c 3T3 fibroblast cells, and chemically induced mouse skin tumorigenesis. *Teratog Carcinog Mutagen*. 1997-1998;17(6):305-12.
111. PDR [Physicians Desk Reference] for Herbal Medicines, 4th Edition, 2007.

112. Pichard – Garcia L, Pascussi JM, Maurel P. Carotenoids activate PXR and are inducers of CYP2B6 and CYP3A4 in human hepatocytes in primary culture (abstract). 13<sup>th</sup> International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations. 2000; 195.
113. Podbielkowski Z., Sudnik-Wójcikowska B. Słownik roślin użytkowych. Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne. Warszawa 2003; 432-33.
114. 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.
115. Pritchett LE, Atherton KM, Mutch E, Ford D. Glucuronidation of the soybean isoflavones genistein and daidzein by human liver is related to levels of UGT1A1 and UGT1A9 activity and alters isoflavone response in the MCF-7 human breast cancer cell line. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 2008; 19(11): 739-745.
116. Radomska-Pandya A, Pokrovskaya ID, Xu J, Little JM, Jude AR, Kurten RC, Czernik PJ. Nuclear UDP-glucuronosyltransferases: identification of UGT2B7 and UGT1A6 in human liver nuclear membranes. *Arch Biochem Biophys* 2002; 399:37-48.
117. Rauchschalbe SK, Zuhlsdorf MT, Schuhly U, Kuhlmann J. Predicting the risk of sporadic elevated bilirubin levels and diagnosis Gilbert's syndrome by genotyping UGT1A1\*28 promoter polymorphism. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2002;40:233-240.
118. Rietveld A, Wiseman S: Antioxidant effects of tea: Evidence from human clinical trials. *J Nutr* 133:3275–3284, 2003.
119. Ritter JK. Roles of glucuronidation and UDP-glucuronosyltransferases in xenobiotic bioactivation reactions. *Chem Biol Interact.* 2000; 129(1-2):171-93.
120. 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.
121. Rotger M, Taffe P, Bleiber G, et al. Gilbert syndrome and the development of antiretroviral therapy- associated hyperbilirubinemia. *J Infect Dis* 2005;192:1381-1386.
122. 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 androstenol: a molecular basis for inverse agonism. *Mol Cell.* 2004; 16: 907-917.
123. Sheehan D, Meade G, Foley VM, Dowd CA. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzymes superfamily. *Biochem J.* 2001; 360: 1-16.

124. Shibayama Y, Ikeda R, Motoya T, Yamada K. St. John's Wort (*Hypericum perforatum*) induces overexpression of multidrug resistance protein 2 (MRP2) in rats: a 30-day ingestion study. *Food Chem Toxicol.* 2004 Jun;42(6):995-1002.
125. Singh M, Mendez E, Rao AR, Kale RK. Chemomodulatory potential of *Glycine max* against murine skin and cervical papillomagenesis. *Indian J Exp Biol.* 2011;49(11):864-70.
126. Sneitz N, Court MH, Zhang X, Laajanen K, Yee KK, Dalton P, Ding X, Finel M. Human UDP-glucuronosyltransferase UGT2A2: cDNA construction, expression, and functional characterization in comparison with UGT2A1 and UGT2A3. *Pharmacogenet Genomics* 2009 19(12):923-34.
127. 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.
128. Sprott KM, Chumley MJ, Hanson JM, Dobrowsky RT. Decreased activity and enhanced nuclear export of CCAAT-enhancer-binding protein beta during inhibition of adipogenesis by ceramide. *Biochem. J.* 2002; 365: 181-191.
129. Srinivasan P, Suchalatha S, Babu PV, Devi RS, Narayan S, Sabitha KE, Shyamala Devi CS. Chemopreventive and therapeutic modulation of green tea polyphenols on drug metabolizing enzymes in 4-Nitroquinoline 1-oxide induced oral cancer. *Chem Biol Interact.* 2008;172(3):224-34.
130. Strzelecka H, Kowalski J. *Encyklopedia zielarstwa i ziołolecznictwa.* Wydawnictwo Naukowe PWN. Warszawa 2000;520-21.
131. 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.
132. Sugatani J, Kojima H, Ueda A. The Phenobarbital response enhancer module in the human bilirubin UDP-glucuronosyltransferase UGT1A1 gene and regulation by the nuclear receptor CAR. *Hepatology* 2001; 33:1232-1238.
133. Sugioka Y, Fujii-Kuriyama Y, Kitagawa T, Muramatsu M. Changes in polypeptide pattern of rat liver cells during chemical hepatocarcinogenesis. *Cancer Research* 1985; 45:365-378.
134. 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.
135. Surh YJ. Bioactivation of benzylic and allylic alcohols via sulfoconjugation. *Chem Biol Interact* 1998; 109(1-3):221-235.

136. Talalay P., Dinkova-Kostova T., Holtzclaw D.W. Importance of phase 2 gene regulation in protection against electrophile and reactive oxygen toxicity and carcinogenesis. *Adv. Enzyme Regul.* 2003;43: 121-134.
137. Tan XL, Shi M, Tang H, Han W, and Spivack SD. Candidate Dietary Phytochemicals Modulate Expression of Phase II Enzymes GSTP1 and NQO1 in Human Lung Cells. *J Nutr.* 2010;140(8): 1404–1410.
138. 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.
139. Tobin PJ, Beale P, Noney L, Liddell S, Rivory LP, Clarke S. A pilot study on the safety of combining chrysin, a non-absorbable inducer of UGT1A1, and irinotecan (CPT-11) to treat metastatic colorectal cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2006;57:309-316.
140. Tukey RH, Strassburg CP. Human UDP-glucuronosyltransferases: metabolism, expression, and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2000;40:581-616.
141. Tuna G, Erkmen GK, Dalmizrak O, Dogan A, Ogun IH, Ozer N. Inhibition characteristics of hypericin on rat small intestine glutathione-S-transferases. *Chemico-Biological Interactions* 2010; 188(1): 59-65.
142. Tzameli 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.
143. Vaidyanathan JB, Walle T. Glucuronidation and sulfation of the tea flavonoid (-)-epicatechin by the human and rat enzymes. *Drug Metab Dispos.* 2002;30(8):897-903.
144. Varnam AH, Sutherland JP: *Beverages: Technology, Chemistry and Microbiology.* London: Chapman & Hall, 1994.
145. Wells PG, Mackenzie PI, Chowdhury JR, Guillemette C, Gregory PA, Ishii Y, Hansen AJ, Kessler FK, Kim PM, Chowdhury NR, Ritter JK. Glucuronidation and the UDP-glucuronosyltransferases in health and disease. *Drug Metab Dispos* 2004; 32(3):281-290.
146. Wenk M, Todesco L, Krähenbühl S. Effect of St John's wort on the activities of CYP1A2, CYP3A4, CYP2D6, N-acetyltransferase 2, and xanthine oxidase in healthy males and females. *Br J Clin Pharmacol.* 2004;57(4):495-499.
147. 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.
148. Wiegand H, Boesch-Saadatmandi C, Regos I, Treutter D, Wolfram S, Rimbach G. Effects of quercetin and catechin on hepatic glutathione-S transferase (GST), NAD(P)H quinone oxidoreductase 1 (NQO1), and antioxidant enzyme activity levels in rats. *Nutr Cancer.* 2009;61(5):717-22.

149. Wiegand H, Wagner AE, Boesch-Saadatmandi CH, Kruse HP, Kulling S, Rimbach G. Effect of Dietary Genistein on Phase II and Antioxidant Enzymes in Rat Liver. *Cancer Genomics and Proteomics* 2009; 6(2): 85-92.
150. Wynn GH, Oesterheld JR, Cozza KL, Armstrong SC, *Clinical Manual of Drug Interaction Principles for Medical Practice*, Washington, DC London, England 2009; 3:23-41
151. 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.
152. Yamamoto T, Juneja LR, Chu DC, et al. *Chemistry and Application of Green Tea*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 1997.
153. Yan Y, Cook J, McQuillan J, Zhang G, Hitzman CJ, Wang Y, Wiedmann TS, You M. Chemopreventive effect of aerosolized polyphenon E on lung tumorigenesis in A/J mice. *Neoplasia*. 2007;9:401-5.
154. Yang XY, Zhao WP, Li YQ, Sun ZY, Zhang Y, Guo YT, Yuan JH, Zhu Q, Wang M. The role of NF-E2-related factor 2 in the induction of uridine 5'-diphosphate-glucuronosyltransferase 1A and its isoforms by epigallocatechin gallate in colon cancer cells. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2006;86(2):82-7.
155. Yang Y, Cheng JZ, Singhal SS, Saini M, Pandya U, Awasthi S, Awasthi YC. Role of glutathione S-transferase in protection against lipid peroxidation. Overexpression of hGSTA2-2 in K562 cells protects against hydrogen peroxide-induced apoptosis and inhibits JNK and caspase 3 activation. *J Biol Chem*, 2001; 276: 19220-19230.
156. Yang YM, Noh K, Han CY, Kim SG. Transactivation of genes encoding for phase II enzymes and phase III transporters by phytochemical antioxidants. *Molecules* 2010; 15, 6332-6348.
157. Yu X, Hensler T. Nrf2 as a target for cancer chemoprevention. *Mutat. Res*. 2005; 591: 93-102.
158. Zabost A, Zwolska Z, Augustynowicz-Kopeć E. Genotyp i fenotyp acetylacji u chorych na gruźlicę. *Postępy Nauk Medycznych* 10/2011, 831-835.
159. Zanden JJ, Hamman OB, Iersel ML.P.S, Boeren S, Cnubben NHP, Bello ML, Vervoort J, Bladeren PJ, Rietjens IMCM. Inhibition of human glutathione S-transferase P1-1 by the flavonoid quercetin *Chemico-Biological Interactions* 2003;145(2); 139-148.
160. Zaremba M. Lekooporność w nowotworach wieku dziecięcego. Część I – białka związane z lekoopornością. *Onkol Pol*. 2005; 8: 57-61.
161. Zhang Z, Yang X, Yuan J, Sun Z, Li Y. Modulation of NRF2 and UGT1A expression by epigallocatechin-3-gallate in colon cancer cells and BALB/c mice. *Chin Med J* 2009;122(14):1660-1665.



162. Zhao CR, Gao ZH, Qu XJ. Nrf2-ARE signaling pathway and natural products for cancer chemioprevention. *Cancer Epidemiology* 2010; 34: 523-533.
163. Zucker SD, Qin X, Rouster SD, Yu F, Green RM, Keshavan P, Feinberg J, Sherman KE. Mechanism of indinavir-induced hyperbilirubinemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:12671-12676.

## SPIS RYCIN I TABEL

Rycina 1. Fazy metabolizmu leku.....	10
Rycina 2. Reakcja sprzęgania z kwasem glukuronowym.....	12
Rycina 3. Reakcja sprzęgania z kwasem siarkowym .....	16
Rycina 4. Reakcja sprzęgania z glutationem .....	18
Rycina 5. Reakcja acetylacji przy udziale N-acetylotransferazy.....	21
Rycina 6. Aktywacja czynników transkrypcyjnych, które prowadzą do indukcji enzymów II fazy metabolizmu. ....	27
Rycina 7. Rozdział elektroforetyczny amplikonów GAPDH, Nat1, Nat2, Sult1a1, Ugt1a1 i Nrf2 reakcji PCR w czasie rzeczywistym w 1,5% żelu agarozowym.....	51
Rycina 8. Wyznaczanie temperatury topnienia produktu genu GAPDH w reakcji PCR w czasie rzeczywistym (A). Amplifikacja produktu dla genu GAPDH w czasie rzeczywistym przy malejącym stężeniu cDNA w reakcji oraz krzywa wzorcowa dla GAPDH (B).....	52
Rycina 9. Wyznaczanie temperatury topnienia produktu genu Nat1 w reakcji PCR w czasie rzeczywistym (A). Amplifikacja produktu dla genu Nat1 w czasie rzeczywistym przy malejącym stężeniu cDNA w reakcji oraz krzywa wzorcowa dla Nat1 (B) .....	53
Rycina 10. Wyznaczanie temperatury topnienia produktu genu Nat2 w reakcji PCR w czasie rzeczywistym (A). Amplifikacja produktu dla genu Nat2 w czasie rzeczywistym przy malejącym stężeniu cDNA w reakcji oraz krzywa wzorcowa dla Nat2 (B) .....	53
Rycina 11. Wyznaczanie temperatury topnienia produktu genu Sult1a1 w reakcji PCR w czasie rzeczywistym (A). Amplifikacja produktu dla genu Sult1a1 w czasie rzeczywistym przy malejącym stężeniu cDNA w reakcji oraz krzywa wzorcowa dla Sult1a1(B) .....	54
Rycina 12. Wyznaczanie temperatury topnienia produktu genu Ugt1a1 w reakcji PCR w czasie rzeczywistym (A). Amplifikacja produktu dla genu Ugt1a1 w czasie rzeczywistym przy malejącym stężeniu cDNA w reakcji oraz krzywa wzorcowa dla Ugt1a1 (B) .....	55
Rycina 13. Wyznaczanie temperatury topnienia produktu genu Gstp1 w reakcji PCR w czasie rzeczywistym (A). Amplifikacja produktu dla genu Gstp1 w czasie rzeczywistym przy malejącym stężeniu cDNA w reakcji oraz krzywa wzorcowa dla Gstp1(B) .....	55
Rycina 14. Wyznaczanie temperatury topnienia produktu genu Nrf2 w reakcji PCR w czasie rzeczywistym (A). Amplifikacja produktu dla genu Nrf2 w czasie rzeczywistym przy malejącym stężeniu cDNA w reakcji oraz krzywa wzorcowa dla czynnika Nrf2 (B) .....	56
Rycina 15. Ocena wpływu ekstraktu z surowca <i>H. perforatum</i> na poziom transkrypty genów Nat1, Nat2, Sult1a1, Ugt1a1, Gstp1 i Nrf2 z wykorzystaniem reakcji <i>real-time</i> PCR w tkance wątrobowej szczurów rasy Wistar po 3 i 10 dniach podawania p.o. ....	57
Rycina 16. Ocena wpływu ekstraktu z surowca <i>C. sinensis</i> na poziom transkrypty genów Nat1, Nat2, Sult1a1, Ugt1a1, Gstp1 i Nrf2 z wykorzystaniem reakcji <i>real-time</i> PCR w tkance wątrobowej	

szczurów rasy Wistar po 3 i 10 dniach podawania p.o. ....	58
Rycina 17. Ocena wpływu ekstraktu z surowca <i>V. officinalis</i> na poziom transkryptu genów Nat1, Nat2, Sult1a1, Ugt1a1, Gstp1 i Nrf2 z wykorzystaniem reakcji <i>real-time</i> PCR w tkance wątrobowej szczurów rasy Wistar po 3 i 10 dniach podawania p.o. ....	60
Rycina 18. Ocena wpływu ekstraktu z surowca <i>G. max</i> na poziom transkryptu genów Nat1, Nat2, Sult1a1, Ugt1a1, Gstp1 i Nrf2 z wykorzystaniem reakcji <i>real-time</i> PCR w tkance wątrobowej szczurów rasy Wistar po 3 i 10 dniach podawania p.o. ....	62
Tabela 1. Enzymy II fazy metabolizmu ksenobiotyków .....	11
Tabela 2. UDP-glukuronylotransferazy i przykładowe substraty wraz z istotnymi klinicznie defektami genetycznymi .....	15
Tabela 3. Leki metabolizowane przez N-acetylotransferazy.....	22
Tabela 4. Regulacja aktywności enzymów II fazy z udziałem wybranego receptora .....	24
Tabela 5. Wpływ wybranych preparatów pochodzenia roślinnego na enzymy UGT .....	29
Tabela 6. Wybrane przykłady działania zielonej herbaty na aktywność enzymów CYP450 .....	32
Tabela 7. Wybrane przykłady działania soi zwyczajnej lub jej aktywnych składników na aktywność enzymów CYP .....	34
Tabela 8. Wybrane przykłady działania ekstraktu z dziurawca zwyczajnego na aktywność enzymów CYP .....	36
Tabela 9. Charakterystyka surowców roślinnych użytych w doświadczeniu, dawkowanie ekstraktów i ich standaryzacja .....	41
Tabela 10. Sekwencje starterów użytych do reakcji PCR w czasie rzeczywistym .....	46
Tabela 11. Warunki reakcji PCR w czasie rzeczywistym .....	49
Tabela 12. Wpływ standaryzowanego ekstraktu <i>Hypericum perforatum</i> na poziom ekspresji badanych genów w zależności od czasu podawania. ....	58
Tabela 13. Wpływ standaryzowanego ekstraktu <i>Camellia sinensis</i> na poziom ekspresji badanych genów w zależności od czasu podawania .....	59
Tabela 14. Wpływ standaryzowanego ekstraktu <i>Valeriana officinalis</i> na poziom ekspresji badanych genów w zależności od czasu podawania .....	60
Tabela 15. Wpływ standaryzowanego ekstraktu <i>Glycine max</i> na poziom ekspresji badanych genów w zależności od czasu podawania .....	62