

Wpływ standaryzowanego ekstraktu sojowego (*Glycine max*) na poziom ekspresji enzymów CYP3A i receptora pregnanu X w modelu *in vivo*

The influence of a standardized soybean extract (*Glycine max*) on the expression level of CYP3A enzymes and pregnane X receptor in *in vivo* model

Bogacz Anna^{1,2}, Mrozikiewicz Przemysław M.^{1,2}, Bartkowiak-Wieczorek Joanna^{1,2}, Czerny Bogusław^{2,3}, Karasiewicz Monika², Kujawski Radosław², Mikołajczak Przemysław L.^{2,4}, Seremak-Mrozikiewicz Agnieszka⁵, Edmund Grześkowiak¹, Bobkiewicz-Kozłowska Teresa⁴

¹ Pracownia Farmakogenetyki Doświadczalnej, Katedra i Zakład Farmacji Klinicznej i Biofarmacji, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

² Zakład Farmakologii i Biologii Doświadczalnej, Instytut Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich w Poznaniu

³ Zakład Farmakologii Ogólnej i Farmakoekonomiki, Wydział Nauk o Zdrowiu, Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

⁴ Katedra i Zakład Farmakologii, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

⁵ Katedra Perinatologii i Ginekologii, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Streszczenie

Cel pracy: Fitoestrogeny sojowe, takie jak genisteina i daidzeina, stanowią popularną alternatywę dla kobiet w leczeniu symptomów menopauzy. Izoflawony te są również powszechnie stosowane w tradycyjnej medycynie w zapobieganiu i leczeniu osteoporozy, chorób sercowo-naczyniowych oraz nowotworowych. Pomimo tak powszechnego stosowania preparatów sojowych jako żywności funkcjonalnej i suplementów diety, dane dotyczące bezpieczeństwa jak również występowania interakcji pomiędzy preparatami roślinnymi a lekami syntetycznymi, zwłaszcza z lekami przeciwnowotworowymi są bardzo ograniczone. Z tego względu, celem badań było określenie wpływu ekstraktu sojowego na poziom ekspresji genów CYP3A i PXR z zastosowaniem techniki real-time PCR (RT-PCR).

Materiały i metody: Szczurom rasy Wistar podawano standaryzowany ekstrakt sojowy (100mg/kg, p.o.) przez 3 i 10 dni. Całkowity RNA izolowany z tkanki wątrobowej przepisano na cDNA. Poziom ekspresji mRNA CYP3A1/2 i PXR analizowano za pomocą ilościowego real-time PCR z zastosowaniem barwnika SYBR Green I.

Wyniki: Uzyskane wyniki wykazały, że ekstrakt sojowy zawierający 37% izoflawonów powodował znaczny spadek poziomu ekspresji CYP3A1 o blisko 35% ($p < 0,05$) zarówno po 3 jak i 10 dniach w porównaniu do grupy kontrolnej. Brak istotnych różnic zanotowano dla enzymu CYP3A2 i receptora jądrowego PXR.

Adres do korespondencji:

Anna Bogacz
Pracownia Farmakogenetyki Doświadczalnej, Katedra i Zakład Farmacji Klinicznej i Biofarmacji,
Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego
61-861 Poznań, ul. św. Marii Magdaleny 14
tel: +48 61 66 87 837, fax: +48 61 66 87 855
e-mail: aniabogacz23@o2.pl

Otrzymano: 19.08.2010
Zaakceptowano do druku: 02.11.2010

Wnioski: Wyniki badania sugerują, że ekstrakt sojowy może obniżać ekspresję CYP3A1 (ludzki homolog CYP3A4) i uczestniczyć w klinicznie znaczących interakcjach z lekami metabolizowanymi przez enzym CYP3A4. Ponadto, postuluje się, iż ekspresja genów CYP3A1 i CYP3A2 (ludzki homolog CYP3A5) może być regulowana pośrednio poprzez czynnik transkrypcyjny PXR.

Słowa kluczowe: **enzymy CYP / izoflawony sojowe / indukcja / inhibicja /
/ interakcje / poziom ekspresji /**

Abstract

Objective: Soybean phytoestrogens, such as genistein and daidzein, have become a popular alternative for women undergoing the treatment of menopause symptoms. These isoflavones are also commonly used in traditional medicine in the prevention and treatment of osteoporosis, cardiovascular diseases and cancer. Despite the widespread use of soybean preparations as functional foods and dietary supplements, data regarding the safety as well as interactions between herbal medicines and synthetic drugs, especially with antineoplastic agents, remain scarce. Therefore, the aim of the present study was to determine the influence of soybean extract on the expression levels of CYP3A and PXR genes using real-time PCR (RT-PCR).

Materials and methods: Male Wistar rats were given a standardized soybean extract (100mg/kg p.o.) for 3 and 10 days. Total RNA isolated from the liver tissue was transcribed into cDNA. The level of CYP3A1/2 and PXR mRNAs expression was analyzed by real-time quantitative PCR using SYBR Green I dye.

Results: Our findings showed that soybean extract containing 37% isoflavones resulted in a significant decrease of CYP3A1 expression level by almost 35% ($p < 0.05$), both after 3 and 10 days, when compared with the control group. No statistically significant differences were noted for CYP3A2 enzyme and the PXR nuclear factor.

Conclusions: These results suggest that soybean extract can decrease the CYP3A1 (homolog to human CYP3A4) expression and may participate in clinically significant interactions with drugs metabolized by CYP3A4 enzyme. Moreover, it is postulated that gene expression of CYP3A1 and CYP3A2 (homolog to human CYP3A5) can be regulated indirectly by the PXR transcription factor.

Key words: **CYP enzymes / soybean isoflavones / induction / inhibition /
/ interactions / expression level /**

Wstęp

Soja jest bogatym źródłem fitoestrogenów ze względu na obecność genisteiny, jak i daidzeiny, które imitują działanie żeńskich hormonów płciowych. Izoflawony te wykazują właściwości estrogenne, co ma istotne znaczenie w profilaktyce osteoporozy i w terapii zaburzeń związanych z okresem menopauzy, stanowiąc w tym alternatywę dla hormonalnej terapii zastępczej (HTZ) [1, 2]. Fakt ten tłumaczy się dużym powinowactwem fitoestrogenów sojowych, zwłaszcza genisteiny do receptorów estrogenowych, uważając je za naturalne selektywne modulatory tych receptorów o znaczeniu medycznym, które to mają na celu nie tylko zniwelowanie bardzo dokuczliwych objawów wieku menopauzalnego i pomenopauzalnego, ale przede wszystkim zapobieganie skutkom szybkiego narastania zmian i dolegliwości wynikających z niedoboru tego hormonu [2, 3].

Z badań epidemiologicznych wynika, iż stosowana regularna dieta sojowa w krajach azjatyckich skutkuje wielokrotnie niższą zapadalnością na nowotwory, szczególnie hormonozależne oraz niższym poziomem ryzyka wystąpienia osteoporozy i chorób układu krążenia [4-7]. Obecnie wiadomo, że korzystny wpływ izoflawonów sojowych na organizm przejawia się obniżeniem we krwi poziomu całkowitego cholesterolu, frakcji lipoprotein o niskiej gęstości (LDL) oraz trójglicerydów, natomiast wzrostem stężenia frakcji HDL, co wiąże się z hamowaniem rozwoju arteriosklerozy i zakrzepicy [9, 10]. Ponadto, należy podkreślić fakt, iż soja może wywierać hamujący efekt na wzrost komórek raka piersi jak również nasilać działanie tamoksifenu – leku stosowanego w leczeniu tego nowotworu.

Jednakże doniesienia te są kontrowersyjne, ponieważ inne badania postulują, że związek zawarty w soi – genisteina, która działa podobnie do estrogenów może przyspieszać wzrost komórek raka piersi i powodować wzrost ryzyka interakcji z tamoksifem oraz innymi lekami przeciwnowotworowymi, prowadząc do wystąpienia działań niepożądanych [11]. Z tego względu sugeruje się unikanie przyjmowania preparatów sojowych zwłaszcza z hormonalną terapią zastępczą (HZT) oraz z tamoksifem i innymi lekami stosowanymi w leczeniu raka piersi.

W związku z powyższym, istotne znaczenie w przewidywaniu interakcji pomiędzy preparatami sojowymi a lekami syntetycznymi ma ocena potencjalnej inhibicji bądź indukcji CYP w warunkach *in vivo* wywołana stosowaniem tego typu produktów funkcjonujących na rynku w połączeniu z klasyczną farmakoterapią. Wynika to z faktu, iż postuluje się, że soja jak również izolowane z niej daidzeina i genisteina mogą hamować aktywność różnych izoform CYP, w tym z podrodziny CYP3A, a tym samym mieć istotny wpływ na bezpieczeństwo i skuteczność farmakoterapii.

Enzymy z nadrodziny cytochromu P450 (CYP) są hemoproteinami, które odgrywają ważną rolę w biotransformacji leków stosowanych klinicznie oraz innych ksenobiotyków [12]. Podrodziny CYP2C, CYP2D i CYP3A odpowiedzialne są głównie za biotransformację leków, natomiast podrodziny CYP1A, CYP2A i CYP2E katalizują metaboliczną aktywację wielu substancji o charakterze protoksyn oraz prokancerogenów do ich końcowych, reaktywnych metabolitów, które mogą inicjować chemiczną kancerogenezę. CYP3A4 jest najbardziej aktywną izoformą

cytochromu P450 biorącą udział w biotransformacji ponad 50% leków stosowanych klinicznie. Enzym ten ulega silnej ekspresji w wątrobie oraz jelicie cienkim, gdzie mają miejsce głównie procesy detoksykacji leków [12, 13]. Na uwagę w metabolizmie farmaceutyków zasługuje także enzym CYP3A5 z podrodziny CYP3A, który to wykazuje specyficzność substratową wysoce podobną względem CYP3A4, przy czym zdolność katalityczna tej izoformy może być czasami niższa [14, 15].

Powszechnym mechanizmem modulacji ekspresji powyższych izoform CYP jest regulacja na poziomie transkrypcji genu zachodząca przez receptory jądrowe (NR - *nuclear receptor*), które to mogą być modulowane nie tylko poprzez substancje endogenne, ale również egzogenne będące ligandami dla tych czynników transkrypcyjnych [16]. Jednym z takich czynników transkrypcyjnych biorącym udział w regulacji ekspresji izoform CYP3A jest sierocy receptor pregnanu X (PXR). Uczestniczy on również w indukcji CYP2B i wybranych transporterów leków (MRP1) oraz enzymów II fazy metabolizmu leków (SULT, UTG) [17-19]. Rezultaty ostatnich prac wskazują, iż PXR uczestniczy także w transkrypcji izoform CYP2C8 oraz CYP2C9 [20]. Receptor pregnanu X podobnie jak CYP3A4, ulega głównie ekspresji w wątrobie i jelitach, gdzie mają miejsce procesy detoksykacji [17-19]. Wykazuje homologię do receptorów jądrowych pod względem obecności funkcjonalnych domen. Ligandami tego receptora są zróżnicowane strukturalnie egzogenne i endogenne związki chemiczne, takie jak: hormony steroidowe i metabolity steroidów (progesteron, estrogen, korytykosteron, 5 β -pregnan i androstanol), leki syntetyczne (ryfampicyna, ritonawir, deksametazon, klotrimazol, paklitaksel, tamoksifen), oraz składniki diety m.in. kumestrol i karotenoidy [18, 21, 22].

Wykazano także, że hiperforyna – składnik *St. John's wort* – ziołowego preparatu na depresję jest silnym aktywatorem tego receptora [23]. Jednakże należy podkreślić, iż dotychczas istnieje niewiele doniesień na temat potencjalnych interakcji preparatów roślinnych w tym sojowych z lekami syntetycznymi, dlatego w tym celu podejmowane są badania mające wyjaśnić tego typu interakcje na podłożu molekularnym, co pozwoli na zwiększenie skuteczności i bezpieczeństwa przyjmowanych leków syntetycznych jednocześnie z preparatami sojowymi.

Cel pracy

Celem pracy było określenie wpływu standaryzowanego ekstraktu sojowego na poziom ekspresji CYP3A1 i CYP3A2 oraz receptora pregnanu X (PXR) biorącego udział w regulacji transkrypcji tych genów w warunkach *in vivo*.

W badaniu ze względu na wysoką homologię sekwencyjną wykorzystano model zwierzęcy, w którym izoformy szczurze CYP3A1 i CYP3A2 odpowiednio odpowiadają ludzkim izoformom CYP3A4 i CYP3A5.

Materiały i metody

Przebieg doświadczenia z wykorzystaniem modelu zwierzęcego

Standaryzowany ekstrakt sojowy o zawartości 37% izoflawonów w przeliczeniu na genisteinę otrzymano z Pierre Fabre Sante (Francja).

Badania *in vivo* przeprowadzono na szczurach rasy Wistar (samce) o masie ciała 220-350g, które zakupiono z Hodowli Zwierząt Laboratoryjnych w Brwinowie.

Zwierzęta przetrzymywano w Katedrze i Zakładzie Farmakologii Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, w plastikowych klatkach, w warunkach standardowych, tj. w pomieszczeniach o temperaturze około 20°C, wilgotności 60%, z 12-godzinnym cyklem oświetleniowym. Szczury karmiono standardową paszą laboratoryjną (Labofeed B – Wytwornia Pasz i Koncentratów, Kcynia) i pojmowały wodę *ad libitum*. Po okresie dwóch tygodni kwarantanny, zwierzęta podzielono losowo na dwie grupy liczące 10 sztuk.

Grupie badanej podawano przez 3 i 10 dni standaryzowany ekstrakt sojowy w dawce 100mg/kg p.o., natomiast grupę kontrolną karmiono standardową dietą. Po upływie czasu podawania preparatu sojowego, zwierzęta poddano dekapitacji, a następnie pobrano prawe płaty wątroby, które umieszczono w ciekłym azocie. Materiał biologiczny w postaci tkanki wątrobowej właściwie zabezpieczono w -80°C i odpowiednio oznaczono, dla wykonania ewentualnych powtórzeń analiz i możliwości uniknięcia popełnienia błędu laboratoryjnego na pierwszych etapach badań molekularnych.

Eksperyment na szczurach rasy Wistar przeprowadzono zgodnie z ustawą o ochronie zwierząt z dnia 21 sierpnia 1997 r. (Dz. Ust. Nr 111, poz. 724 z dn. 23.09.1997 r.), za zgodą Lokalnej Komisji Etycznej nr 43/2005.

Izolacja RNA i synteza cDNA

Izolację całkowitego RNA z pobranego materiału przeprowadzono z użyciem odczynnika TriPure Isolation Reagent (Roche) według zmodyfikowanej metody Chomczyńskiego i Sacchi. Próbkę RNA rozpuszczono w sterylnej wodzie traktowanej DEPC, a następnie przechowywano w -80°C. Ilość i jakość wyizolowanego RNA oceniono poprzez pomiar spektrometryczny i rozdział elektroforetyczny w żelu agarozowym. Reakcję odwrotnej transkrypcji przeprowadzono przy użyciu zestawu SuperScript™ III First-Strand Synthesis System (Invitrogen, USA) z 2 μ g całkowitego RNA z użyciem oligo(dT)₂₀. Otrzymany cDNA wykorzystano jako matrycę do reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (*real-time PCR*).

Real-time PCR

Dla oszacowania zmian w poziomie ekspresji badanych genów CYP3A1, CYP3A2 i PXR wykorzystano reakcję łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (rt-PCR) z użyciem specyficznych par starterów (TIB Molbiol) komplementarnych do fragmentu kodującego, pozwalające na uzyskanie specyficznego produktu reakcji wyłącznie z cDNA [24].

W celu amplifikacji genu PXR wykorzystano startery o następującej sekwencji: PXR-F: 5'- TCC ACT GCA TGC TGA AGA AG -3' i PXR-R: 5'- AAC CTG TGT GCA GGA TAG GG -3'.

Reakcję PCR w czasie rzeczywistym prowadzono w szklanych kapilarach, z wykorzystaniem cDNA pozyskanego w reakcji odwrotnej transkrypcji oraz zestawu Fast Start DNA Master Sybr Green I (Roche Diagnostic).

Do amplifikacji wykorzystano aparat LightCycler real-time PCR detection system (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), natomiast oprogramowanie LightCycler3 Run Version 5.32 i LightCycler Data Analysis Version 3.5.28 pozwoliło na analizowanie uzyskanych wyników oraz porównanie względnych różnic ilości początkowej matrycy.

Poziom analizowanych transkryptów standaryzowano względem genu referencyjnego – GAPDH (dehydrogenaza gliceroaldehydofosforanowa), należącego do rodziny *housekeeping gene*, którego poziom ekspresji jest stały w warunkach eksperymentu. Reakcję dla genu PXR prowadzono w 35 cyklach w warunkach: 95°C 8s, 55°C 8s, 72°C 8s, natomiast dla CYP3A1, CYP3A2 i GAPDH warunki termiczne reakcji zamieszczono w publikacji Mrozikiewicz i wsp. [24].

Ilość transkryptu wyznaczano z krzywej wzorcowej, którą sporządzono poprzez wykorzystanie rozcieńczeń cDNA uzyskanego po odwrotnej transkrypcji mRNA. Uzyskane wyniki pochodzące z co najmniej dwóch niezależnych powtórzeń eksperymentu standaryzowano wobec genu referencyjnego GAPDH, po czym przedstawiono w postaci wykresów jako wartość względną w odniesieniu do grupy kontrolnej.

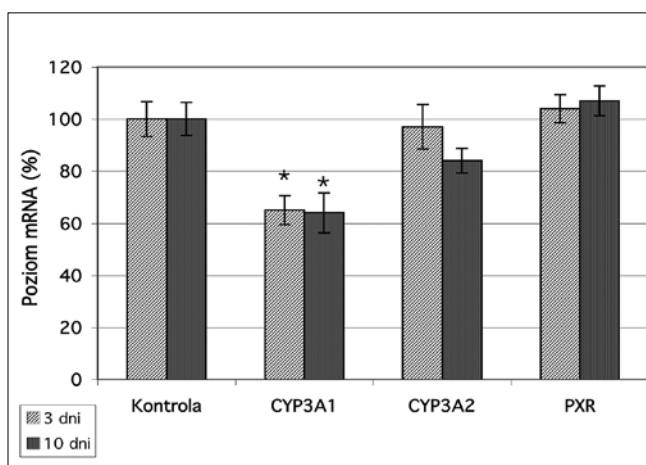
Analiza statystyczna

W celu przeprowadzenia analizy statystycznej uzyskanych w niniejszej pracy wyników reakcji PCR w czasie rzeczywistym wykorzystano program Microsoft Excel, w którym obliczono średnie wartości dla poszczególnych prób, odchylenie standardowe oraz współczynnik SEM. Uzyskane wyniki oznaczeń ilościowych mRNA w badanych próbach normalizowano względem standardu wewnętrznego, czyli mRNA genu referencyjnego GAPDH.

Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu SPSS 17.0 PL for Windows, gdzie za pomocą programu statystycznego wykorzystującego jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA dokonano obliczeń poziomu istotności. Wartość $p < 0,05$ przyjęto za statystycznie istotną.

Wyniki

Na podstawie uzyskanych wyników wykazano znamienne statystycznie redukcję stężenia cDNA CYP3A1 (ludzki homolog CYP3A4) o 35% w stosunku do grupy kontrolnej, przy czym efekt ten utrzymywał się po wydłużeniu doświadczenia, a spadek ilości transkryptu tego genu wyniósł odpowiednio 36% ($p < 0,05$). (Rycina 1).



Rycina 1. Wpływ standaryzowanego ekstraktu sojowego na poziom mRNA CYP3A1/2 i PXR w tkance wątrobowej po 3 i 10 dniach stosowania. Grupy kontrolne określono jako 100%. Dane przedstawiono jako wartość średnią \pm SEM dla każdej grupy równej 10 szczurów. (* $p < 0,05$ porównano z grupą kontrolną).

W przypadku CYP3A2 (ludzki homolog CYP3A5) zaobserwowano brak istotnych zmian w ilości transkryptu tego genu po 3 dniach stosowania ekstraktu, natomiast po 10 dniach podawania preparatu sojowego uzyskano efekt redukcji ekspresji CYP3A2 na poziomie blisko 13% ($p = 0,174$). Jednocześnie wykazano, że stosowanie ekstraktu sojowego odpowiednio przez 3 i 10 dni nie wywołuje znaczących zmian w ilości transkryptu PXR, względem próby niepoddanej procedurze eksperymentalnej. Wyniki z analizy poziomu ekspresji badanych genów pod wpływem standaryzowanego ekstraktu sojowego przedstawiono w tabeli I.

Tabela I. Wpływ ekstraktu *Glycine max* (100mg/kg, p.o.) na poziom ekspresji genów CYP3A1/2 i PXR.

GEN	CZAS PODAWANIA	ŚREDNIA \pm SEM (grupa badana)	P*
CYP3A1	3 dni	65,11 \pm 5,64	0,021
	10 dni	64,09 \pm 7,72	< 0,001
CYP3A2	3 dni	96,18 \pm 8,58	0,784
	10 dni	87,51 \pm 9,82	0,174
PXR	3 dni	104,56 \pm 5,36	0,009
	10 dni	107,83 \pm 5,68	0,962

* Wartość $p < 0,05$ przyjęto za statystycznie istotną (jednoczynnikowa ANOVA, $n = 10$).

Grupy kontrolne karmione standardową dietą zostały określone jako 100%.

Dyskusja

Problem interakcji nabiera szczególnego znaczenia w dobie narastania popularności leku roślinnego i jego łącznego przyjmowania z lekami syntetycznymi, ponieważ preparaty roślinne zawierają kompleks związków farmakologicznie aktywnych, które mogą modulować aktywność enzymów cytochromu P450, odpowiedzialnych głównie za metabolizm leków, będących ich substratami. Indukcja bądź inhibicja izoform CYP poprzez izoflawony sojowe może mieć potencjalny wpływ na skuteczność i bezpieczeństwo leków syntetycznych stosowanych zwłaszcza w HTZ w łagodzeniu symptomów menopauzy oraz w leczeniu raka piersi tamksifenem bądź innymi lekami przeciwnowotworowymi. W związku z czym, badania w tym zakresie są niezmiernie ważne, w celu zrozumienia molekularnych mechanizmów interakcji pomiędzy preparatami roślinnymi a lekami syntetycznymi, co pomoże uniknąć niepożądanych działań w wyniku ich łącznego stosowania jak również pozwolą na optymalizację terapii.

W przedstawionej pracy analizowano działanie standaryzowanego ekstraktu sojowego na aktywność izoenzymów CYP3A1 i CYP3A2 oraz czynnika transkrypcyjnego PXR odpowiedzialnego za regulację ich ekspresji.

Na podstawie uzyskanych wyników wykazano brak znaczących zmian w ilości transkryptu cDNA CYP3D2 (ludzki homolog CYP3A5) i czynnika PXR zarówno po 3 jak i 10 dniach stosowania ekstraktu.

W przypadku CYP3A1 zaobserwowano znamienne statystycznie redukcję stężenia cDNA sugerując, że modulacja ilości transkryptu izoformy CYP3A1 (ludzki homolog CYP3A4) może zostać uznana za przejaw zmian aktywności badanego enzymu. Stąd redukcja ilości mRNA CYP3A4 w ludzkich komórkach wątroby może wiązać się z obniżoną efektywnością biotransformacji leków poprzez wydłużenie ich biologicznego czasu półtrwania, zmniejszeniem klirensu, co niesie ryzyko wystąpienia działań niepożądanych.

Podobny rezultat badań odnośnie CYP3A1 analizowanego w niniejszej pracy uzyskał zespół Laurenzana i wsp. W doświadczeniu tym na szczurach rodzaju męskiego wykazano, że stosowanie genisteiny w dawce 200mg/kg wywołało znaczący spadek poziomu ekspresji CYP3A i CYP2C [25]. W innym eksperymencie zaobserwowano, że zarówno genisteina jak i ekwol hamowały CYP1A i CYP2E1 w ludzkich oraz mysich mikrosomach [26]. W badaniu *in vitro* przeprowadzonym przez zespół Anderson i wsp. zastosowano odpowiednio leki syntetyczne będące substratami określonych enzymów CYP w celu oszacowania wpływu ekstraktu sojowego na ich metabolizm [27]. W oparciu o uzyskane wyniki wykazali, że hydrolizowany ekstrakt sojowy w ludzkich mikrosomach wątrobowych hamował aktywność CYP1A2 (fenacetyna), CYP2A6 (kumaryna), CYP2D6 (deksrometorfan), CYP2C9 (warfaryna) oraz CYP3A4 (testosteron), przy czym niehydrolizowany ekstrakt sojowy powodował słaby efekt inhibicji CYP1A2, CYP2A6 i CYP2D6 oraz wykazywał tendencje w aktywacji CYP3A4.

Podobny rezultat badań w modelu *in vitro* uzyskał zespół badawczy Foster i wsp., który również analizował wpływ soi oraz związków aktywnych w niej zawartych na aktywność katalityczną enzymów CYP450 [28]. Na podstawie uzyskanych wyników wykazano hamowanie CYP3A4, CYP2C9, CYP2C19 i CYP2D6 po zastosowaniu różnych preparatów sojowych, jak również zaobserwowano efekt inhibicji CYP3A4 oraz CYP3A7 po podaniu samej genisteiny [28]. Ponadto wykazano również, że stosowanie ekstraktu sojowego zawierającego 50mg izoflawonów przez 14 dni u zdrowych ochotników nie wpłynęło istotnie na stosunek metabolitu do leku (6-β-OH-kortyzol/kortyzol), sugerując brak wpływu na aktywność CYP3A4 [27]. W innym badaniu prowadzonym w modelu *in vitro* obserwowano subterapeutyczne wartości INR w przypadku łącznego stosowania mleka sojowego i warfaryny, co mogło wskazywać na potencjalną indukcję enzymu niż jego inhibicję [29].

W doświadczeniu prezentowanym przez zespół Ronis i wsp. wykazano natomiast u małych szczurów bezpośrednio po urodzeniu wzrost poziomu ekspresji CYP3A1 i CYP3A2 w wątrobie po podaniu izolatu białka sojowego (65mg izoflawonów/kg na dzień) [30]. Uzyskany wynik trudno jednak było wyjaśnić ze względu, iż molekularny mechanizm podkreślający wpływ powyższego izolatu na ekspresję CYP3A nie został dotychczas poznany. Ponadto indukcję CYP3A4 uzyskano także w modelu *in vitro* w komórkach *hepatoma* po zastosowaniu odpowiednio ekstraktu izoflawonowego, genisteiny i daidzeiny [31]. W innym badaniu wykazano natomiast, że genisteina stanowi substrat dla podrodziny CYP3A i może indukować swój własny metabolizm [32, 33].

W modelu *in vivo* przeprowadzonym przez zespół Kishida i wsp. badano wpływ fermentowanego ekstraktu sojowego zawierającego głównie 155mg/g genisteiny i 127mg/g daidzeiny na

ekspresję szczurzych izoform, takich jak: CYP1A1/2, CYP2B1/2, CYP2C11, CYP2E1, CYP3A1/2 oraz CYP4A1 [34]. Na podstawie uzyskanych wyników wykazano, że dieta sojowa (0-300mg izoflawonów/kg) powodowała brak indukcyjnego wpływu na poziom transkrypcji analizowanych enzymów CYP450. Podobne wyniki analiz otrzymał zespół badawczy Helsby i wsp., który wykazał brak u myszy wpływu genisteiny i ekwolu (40mg/kg, i.p.) na aktywność i zawartość białka CYP1A1/2, CYP3A1 i CYP2E1 [35]. W późniejszym eksperymencie natomiast zaobserwowano, że izoflawony sojowe oraz jego metabolity obniżały aktywność i poziom białka CYP1A2, przy czym spadek ten nie był wystarczający, żeby wyjaśnić właściwości chemoprewencyjne izoflawonów sojowych [26]. Ponadto wykazano, że genisteina i daidzeina stosowane w dawce 200mg/kg redukowały u myszy stosunek 16alfa-OH estronu do 2-OH estronu, nie powodując wzrostu zawartości CYP w mikrosomach wątroby. Wybrane rezultaty doświadczeń dotyczących wpływu ekstraktu *Glycine max* i aktywnych substancji na aktywność enzymów CYP450 przedstawiono w tabeli II.

W przypadku czynnika transkrypcyjnego PXR istnieje kilka doniesień odnośnie wpływu izoflawonów sojowych na poziom ekspresji analizowanego czynnika transkrypcyjnego, uczestniczącego głównie w regulacji CYP3A4. W badaniu przeprowadzonym przez Li i wsp. analizowano wpływ genisteiny, daidzeiny i ekwolu na aktywność ludzkiego i mysiego PXR w modelu *in vitro* z wykorzystaniem pierwotnej hodowli hepatocytów i komórek opartych na przejściowej transfekcji oraz w modelu *in vivo* u myszy [36]. W analizie przejściowej transfekcji wykazano, że genisteina i daidzeina aktywują dziki PXR u myszy, ale nie formę zmutowaną. W przypadku ludzkiego PXR zanotowano natomiast, że ekwol stanowi silniejszy aktywator tego receptora niż genisteina i daidzeina. Ponadto wykazano, że metabolit daidzeiny – ekwol w hepatocytach ludzkich powodował podwyższenie ilości transkryptu CYP3A4 oraz wzrost ekspresji immunoreaktywnego białka. Uzyskane wyniki powyższego badania wskazywały więc na różnicę w aktywacji PXR poprzez izoflawony sojowe i ekwol wynikającą ze specyficzności gatunkowej.

W innym doświadczeniu na komórkach HepG2 prezentowanym przez zespół Liu i wsp. badano wpływ pięciu wyselekcjonowanych związków fitochemicznych na działanie PXR [37]. Na podstawie wyników wykazano, że izoflawony sojowe, luteina i kurkumina stymulowały transkrypcję CYP3A4 poprzez receptor pregnanu X w zależności od stosowanej dawki, natomiast izoramnetyna i rutyna nie miały wpływu na aktywność tego receptora.

Opierając się o prezentowane wyniki badań można wnioskować o potencjalnym mechanizmie regulacji CYP3A4 poprzez izoflawony sojowe na aktywność PXR, mimo iż w niniejszej pracy nie wykazano istotnych zmian w poziomie jego ekspresji. Jednakże istotny jest fakt, iż postuluje się o możliwej pośredniej regulacji PXR poprzez receptor glukokortykoidowy lub inny endogenny mechanizm regulacji jego aktywności, który dotychczas nie został jeszcze poznany. W związku z czym wymagane są dalsze badania w tym kierunku, w celu dokładniejszego określenia wpływu związków aktywnych zawartych w preparatach sojowych na regulację transkrypcji CYP3A4 i CYP3A5 i dostarczenia informacji pozwalających na zwiększenie bezpieczeństwa stosowania preparatów roślinnych i suplementów diety w połączeniu z klasyczną farmakoterapią.

Tabela II. Wpływ *Glycine max* i jej aktywnych substancji na aktywność enzymów CYP.

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

Wnioski

Wyniki przedstawione w niniejszej pracy sugerują, że podobny efekt może dotyczyć homologicznych ludzkich izoform CYP3A4 i CYP3A5, co może być przyczyną zmian parametrów farmakokinetycznych leków będących substratami tych izoform, zwiększając ryzyko wystąpienia działań niepożądanych związanych z obniżoną efektywnością biotransformacji. Ponadto, brak korelacji pomiędzy poziomem ekspresji czynnika transkrypcyjnego PXR a CYP3A1 (ludzki homolog CYP3A4) i CYP3A2 (ludzki homolog CYP3A5) sugeruje, iż na poziomie molekularnym modulacja ekspresji tych izoform przy udziale PXR ma miejsce na drodze pośredniej poprzez receptor glukokortykoidowy lub poprzez inny endogenny mechanizm regulacji.

Niniejsze rezultaty wymagają dalszych badań w tym kierunku w celu zrozumienia molekularnych mechanizmów interakcji pomiędzy preparatami roślinnymi a lekami syntetycznymi, co pozwoli wyeliminować lub zminimalizować ryzyko wystąpienia działań niepożądanych w wyniku stosowania terapii skojarzonych. Ma to istotne znaczenie kliniczne zarówno dla bezpieczeństwa farmakoterapii, jak również dla zwiększenia efektywności terapeutycznej stosowanych leków.

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

Piśmiennictwo

- Potter S, Baum J, Teng H, [et al.]. Soy protein and isoflavones: their effects on blood lipids and bone density in postmenopausal women. *Am J Clin Nutr.* 1998, 68, 1375-1379.
- Dennison E, Yoshimura N, Hashimoto T, [et al.]. Bone loss in Great Britain and Japan: a comparative longitudinal study. *Bone.* 1998, 23, 379-382.
- Drews K, Seremak-Mrozikiewicz A, Puk E, [et al.]. Efficacy of standardized isoflavones extract (Soyfen) (52-104 mg/24h) in moderate and medium-severe climacteric syndrome. *Ginekol Pol.* 2007, 78, 307-311.
- Messina M. Legumes and soybeans: overview of their nutritional profiles and health effects. *Ann J Clin Nutr.* 1999, 70, Suppl 3, 439-450.
- Kurzer M, Xu X. Dietary phytoestrogens. *Annu Rev Nutr.* 1997, 17, 353-381.
- Messina M, Loprinzi C. Soy for breast cancer survivors: a critical review of the literature. *J Nutr.* 2001, 131, 3095-3108.
- Persky V, Van Horn L. Epidemiology of soy and cancer: perspectives and directions. *J Nutr.* 1995, 125, Suppl 3, 709-712.
- Uesugi T, Toda T, Tsuji K, [et al.]. Comparative study on reduction of bone loss and lipid metabolism abnormality in ovariectomized rats by soy isoflavones, daidzin, genistin, and glycitin. *Biol Pharm Bull.* 2001, 24, 368-372.
- Knight D, Howes J, Eden J. The effect of Promensil, an isoflavone extract, on menopausal symptoms. *Climacteric.* 1999, 2, 79-84.
- Anderson J, Johnstone B, Cook-Newell M, [et al.]. Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids. *N Engl J Med.* 1995, 333, 276-282.
- Kohlert-Schupp C, McLachlan A, Rich C, [et al.]. Herb-drug interactions: Herbs in menopause. *Complementary Medicine.* 2005, 4, 50-56.
- Guengerich F. Effects of nutritive factors on metabolic processes involving bioactivation and detoxication of chemicals. *Ann Rev Nutr.* 1984, 4, 207-231.
- Ma M, Woo M, McLeod H. Genetic basis of drug metabolism. *Am J Health Syst Pharm.* 2002, 59, 2061-2069.
- Wrighton S, Brian W, Sari M, [et al.]. Studies on the expression and metabolic capabilities of human liver cytochrome P450III A5 (HLp3). *Mol Pharmacol.* 1990, 38, 207-213.
- Williams J, Ring B, Cantrell V, [et al.]. Comparative metabolic capabilities of CYP3A4, CYP3A5, and CYP3A7. *Drug Metab Dispos.* 2002, 30, 883-891.

16. Pavak P, Dvorak Z. Xenobiotic-induced transcriptional regulation of xenobiotic metabolizing enzymes of the cytochrome P450 superfamily in human extrahepatic tissues. *Curr Drug Metab.* 2008, 9, 129-143.
17. Bertilsson G, Heidrich J, Svensson K, [et al.]. Identification of a human nuclear receptor defines a new signaling pathway for CYP3A induction. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998, 95, 12208-12213.
18. Blumberg B, Sabbagh W, Juguilon H, [et al.]. SXR, a novel steroid and xenobiotic-sensing nuclear receptor. *Genes Dev.* 1998, 12, 3195-3205.
19. Lehmann J, McKee D, Watson M, [et al.]. The human orphan nuclear receptor PXR is activated by compounds that regulate CYP3A4 gene expression and cause drug interactions. *J Clin Invest.* 1998, 102, 1016-1023.
20. Pascussi J, Gerbal-Chaloin S, Pichard-Garcia L, [et al.]. Interleukin-6 negatively regulates the expression of pregnane X receptor and constitutively activated receptor in primary human hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000, 274, 707-713.
21. Moore L, Parks D, Jones S, [et al.]. Orphan nuclear receptors constitutive androstane receptor and pregnane X receptor share xenobiotic and steroid ligands. *J Biol Chem.* 2000, 275, 15122-27.
22. Pichard-Garcia L, Pascussi J, Maurel P. Carotenoids activate PXR and are inducers of CYP2B6 and CYP3A4 in human hepatocytes in primary culture (abstract). *13th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations.* 2000, 195.
23. Moore L, Goodwin B, Jones S, [et al.]. St. John's wort induces hepatic drug metabolism through activation of the pregnane X receptor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000, 97, 7500-7502.
24. Mrozkiewicz P, Bogacz A, Karasiewicz M, [et al.]. The effect of standardized Echinacea purpurea extract on rat cytochrome P450 expression level. *Phytomedicine.* 2010, 17, 830-833.
25. Laurenzana E, Weis C, Bryant C, [et al.]. Effect of dietary administration of genistein, nonylphenol or ethinyl estradiol on hepatic testosterone metabolism, cytochrome P-450 enzymes, and estrogen receptor alpha expression. *Food Chem Toxicol.* 2002, 40, 53-63.
26. Helsby N, Chipman J, Gescher A, [et al.]. 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.
27. Anderson G, Rosito G, Mohustsy M, [et al.]. Drug interaction potential of soy extract and Panax ginseng. *J Clin Pharmacol.* 2003, 43, 643-648.
28. Foster B, Vandenhoek S, Hana J, [et al.]. In vitro inhibition of human cytochrome P450-mediated metabolism of marker substrates by natural products. *Phytomedicine.* 2003, 10, 334-342.
29. Cambria-Kiely J. Effect of soy milk on warfarin efficacy. *Ann Pharmacother.* 2002, 36, 1893-1896.
30. Ronis M, Chen Y, Jo C, [et al.]. 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.
31. Li Y, Shay N. Isoflavone-drug interactions in HepG2 cells and human hepatocytes. *FASEB J.* 2004, 18, A851.
32. Jager W, Sartori M, Herzog W, [et al.]. Genistein metabolism in liver microsomes of Wistar and mutant TR(-) rats. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol.* 1998, 100, 105-116.
33. Roberts-Kirchoff E, Crowley J, Hollenberg P, [et al.]. Metabolism of genistein by rat and human cytochrome P450s. *Chem Res Toxicol.* 1999, 12, 610-616.
34. Kishida T, Nagamoto M, Ohtsu Y, [et al.]. 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.
35. Helsby N, Williams J, Kerr D, [et al.]. The isoflavones equol and genistein do not induce xenobiotic-metabolizing enzymes in mouse and in human cells. *Xenobiotica.* 1997, 27, 587-596.
36. Li Y, Ross-Viola J, Shay N, [et al.]. Human CYP3A4 and murine CYP3A11 are regulated by equol and genistein via the pregnane X receptor in a species-specific manner. *J Nutr.* 2009, 139, 898-904.
37. Liu D, Yang M, Zhu H, [et al.]. Human pregnane X receptor-mediated transcriptional regulation of cytochrome P450 3A4 by some phytochemicals. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 2006, 35, 8-13.

Klinika Ginekologii Operacyjnej i Onkologicznej
I Katedra Ginekologii i Położnictwa
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
oraz
Centrum Medyczne "Być kobietą ..."

mają zaszczyt zaprosić na

Kurs uroginekologiczny

UTRASONOGRAFIA UROGINEKOLOGICZNA (ang. pelvic floor sonography)

NOWOCZESNA PESSAROTERAPIA

27 listopada 2010 (sobota)
Łódź

Zaproszony wykładowca z Niemiec: Chefarzt dr med. J. Kociszewski

Ausbildungsklinik für rekonstruktive
Beckenboden-Chirurgie; Qualifikation AGUB III,
Schulungszentrum für urogynäkologische Sonographie,
Zertifiziertes Kontinenzzentrum Hagen - Witten

Tematyka kursu:

- usg miednicy mniejszej z wykorzystaniem głównicy przezpochowej 2D:

- diagnostyka przed terapią zachowawczą i operacyjną
- planowanie zabiegu z wykorzystaniem badania usg
- diagnostyka po nieudanych zabiegach w zakresie przyczyn niepowodzeń i powikłań

- praktyczne aspekty nowoczesnej pessaroterapii stosowanej tylko na dzień: indywidualny dobór rodzaju i rozmiaru, jak uczyć pacjentki zakładania i wyjmowania

Szczegółowe informacje:

www.uroginekologia.info.pl

Zgłoszenia uczestnictwa:

uroginekologia@gmail.com
(ograniczona liczba miejsc!)

W imieniu Komitetu Organizacyjnego:
prof. dr hab. med. J. Suzin

Koordynator:

dr n. med. Edyta Właźlak

tel. 0- 502 626 675

dr n. med. Grzegorz Surkont

tel. 0- 501 587 964