



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

**Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών
του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας
ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ**

Τσιουτσιουλίτη Αθανασία

**«ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗΣ ΜΕΝΤΑΣ (*MENTHA PIPERITA* L.) ΣΤΗΝ
ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΞΕΝΟΒΙΟΤΙΚΩΝ CYP1A2, CYP2A6, XO,
NAT2 ΚΑΙ UGT1A1/1A6 ΣΕ ΥΓΙΕΙΣ ΕΘΕΛΟΝΤΕΣ»**

ΛΑΡΙΣΑ 2016

«Εκτίμηση της επίδρασης της κατανάλωσης μέντας (*Mentha piperita* L.) στην δραστικότητα των ενζύμων μεταβολισμού των ξενοβιοτικών CYP1A2, CYP2A6, XO, NAT2 και UGT1A1/1A6 σε υγιείς εθελοντές»

Effect of *Mentha piperita* L. consumption on the detoxication enzyme activities of CYP1A2, CYP2A6, XO, NAT2 και UGT1A1/1A6 in healthy volunteers

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Ασπροδίνη Ευτυχία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (Επιβλέπουσα)

Κουρέτας Δημήτριος, Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών οργανισμών – Τοξικολογίας, Τμήμα
Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Παππάς Ιωάννης, Αναπληρωτής Καθηγητής Φαρμακολογίας, Τμήμα Κτηνιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής Ε. Ασπροδίνη, Δ. Κουρέτα και Ι. Παππά. Ιδιαίτέρως, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Η. Μπέγα για την συνεχή καθοδήγησή του κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής εργασίας. Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στους φίλους και στην οικογένειά μου για τη ακατάπαυστη υποστήριξη και συμπαράστασή τους.

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή.....	10
1.1. Φλαβονοειδή	11
1.2. Κυτόχρωμα P450	17
1.3. Οξειδάση της ξανθίνης	22
1.4. N-ακετυλοτρανσφεράση-2	23
1.5. UGT.....	24
1.6 Επίδραση φυσικών προϊόντων και φλαβονοειδών στα ένζυμα του μεταβολισμού των ξενοβιοτικών.....	26
1.7 Σκοπός	31
2. Υλικά και μέθοδοι	32
2.1. Εθελοντές και πειραματικό πρωτόκολλο	32
2.2. Αναλυτική μέθοδος	34
Αντιδραστήρια και χημικές ουσίες.....	34
Συσκευές χρωματογραφίας	35
Χρωματογραφικές συνθήκες	35
Προετοιμασία πρότυπων διαλυμάτων	36
Επεξεργασία των δειγμάτων ούρων	37
Επεξεργασία των δειγμάτων σιέλου	37
Επεξεργασία των δειγμάτων ούρων για τον προσδιορισμό της ελεύθερης παρακεταμόλης ..	38
Επεξεργασία των δειγμάτων ούρων για τον προσδιορισμό ολικής παρακεταμόλης	38
2.3. Ποιοτικός έλεγχος.....	39
Γραμμικότητα των καμπυλών βαθμονόμησης των μεταβολιτών της καφεΐνης σε ούρα.....	39
Γραμμικότητα των καμπυλών βαθμονόμησης των μεταβολιτών της καφεΐνης στο σίελο	39
Γραμμικότητα της καμπύλης βαθμονόμησης της παρακεταμόλης στα ούρα.....	39
Ακρίβεια και επαναληψιμότητα	40
2.4 Στατιστική ανάλυση	42
3. Αποτελέσματα	43
3.1 CYP1A2	48

3.2	<i>CYP2A6</i>	50
3.3	<i>XO</i>	51
3.4	<i>NAT2</i>	52
3.5	<i>UGT1A1/1A6</i>	53
4.	Συζήτηση	54
	<i>CYP1A2</i>	55
	<i>CYP2A6</i>	58
	<i>XO</i>	60
	<i>NAT2</i>	60
	<i>UGT1A1/1A6</i>	62
5.	Συμπέρασμα.....	64
6.	Βιβλιογραφία	65

Περίληψη

Εισαγωγή: Η μέντα (*Mentha x Piperita* L.) είναι από τα πιο διαδεδομένα βότανα γνωστή για τις αρωματικές και φαρμακευτικές της ιδιότητες. Τα φύλλα της μέντας χρησιμοποιούνται παραδοσιακά με θεραπευτικές ενδείξεις για τη συμπτωματική θεραπεία των διαταραχών του πεπτικού συστήματος. Προηγούμενες *in vitro* και *in vivo* μελέτες έχουν δείξει ότι υδατικά εκχυλίσματα διαφόρων βοτάνων επηρεάζουν τη δραστηριότητα των ενζύμων της Φάσης I και Φάσης II του μεταβολισμού των ξενοβιοτικών. Ωστόσο, δεν υπάρχει αντίστοιχη *in vivo* μελέτη για την επίδραση της μέντας στη δραστηριότητα των ενζύμων αυτών στον άνθρωπο. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η διερεύνηση της επίδρασης του αφεψήματος μέντας στην δραστηριότητα των ενζύμων CYP1A2, CYP2A6, XO, NAT2 και UGT1A1/1A6 με την χρήση της καφεΐνης και της παρακεταμόλης ως φαρμάκων-δεικτών.

Μέθοδοι: Στη μελέτη συμμετείχαν 9 υγιείς εθελοντές οι οποίοι απείχαν από φάρμακα και τροφές που επιδρούν στα ανωτέρω ένζυμα για 9 ημέρες, στις 6 εκ των οποίων κατανάλωσαν 4gr μέντας ημερησίως υπό τη μορφή αφεψήματος. Οι εθελοντές έλαβαν καφεΐνη, ως φάρμακο-δείκτη της δραστηριότητας των CYP1A2, CYP2A6, XO και NAT2, και παρακεταμόλη, ως φάρμακο-δείκτη της δραστηριότητας του UGT1A1/1A6. Δείγματα ούρων και σιέλου συλλέχθηκαν αμέσως πριν και μετά την περίοδο κατανάλωσης της μέντας. Οι συγκεντρώσεις των μεταβολιτών της καφεΐνης στα ούρα και τον σίελο και της παρακεταμόλης στα ούρα προσδιορίστηκαν με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC). Η δραστηριότητα των ενζύμων CYP1A2, CYP2A6, XO και NAT2 προσδιορίστηκε μέσω των αντίστοιχων μεταβολικών λόγων της καφεΐνης, ενώ των UGT1A1/1A6 μέσω του ποσοστού της συζευγμένης παρακεταμόλης.

Αποτελέσματα: Οι μέσες τιμές των μεταβολικών λόγων της καφεΐνης για το CYP1A2 στα ούρα και τον σίελο παρουσίασε μη στατιστικώς σημαντική μείωση μετά την κατανάλωση της μέντας ($3,166 \pm 1,075$ έναντι $2,927 \pm 0,757$; $0,564 \pm 0,120$, έναντι $0,501 \pm 0,119$, αντίστοιχα, $p > 0,05$). Η μέση τιμή του μεταβολικού λόγου της καφεΐνης για το CYP2A6 στα ούρα δεν παρουσίασε στατιστικώς σημαντική μεταβολή μετά την κατανάλωση της μέντας ($0,483 \pm 0,101$ έναντι $0,501 \pm 0,090$, $p > 0,05$). Παρομοίως, η μέση τιμή του μεταβολικού λόγου της καφεΐνης για την XO στα ούρα δεν παρουσίασε στατιστικώς σημαντική μεταβολή μετά την κατανάλωση της μέντας ($0,564 \pm 0,064$ έναντι $0,564 \pm 0,063$, $p > 0,05$). Αντίθετα, η μέση τιμή του μεταβολικού λόγου της καφεΐνης για την NAT2 στα ούρα παρουσίασε στατιστικώς

σημαντική μείωση μετά την κατανάλωση της μέντας ($0,153 \pm 0,131$, έναντι $0,140 \pm 0,125$, $p=0,004$). Η μέση τιμή του δείκτη δραστηριότητας των UGT1A1/1A6, κλάσμα συζευγμένη/ολική παρακεταμόλη στα ούρα, δεν παρουσίασε στατιστικώς σημαντική μεταβολή, πριν και μετά την κατανάλωση της μέντας ($0,831 \pm 0,137$, έναντι $0,847 \pm 0,101$, $p>0,05$).

Συμπέρασμα: Η τακτική κατανάλωση αφεψήματος μέντας φαίνεται να αναστέλλει την δραστηριότητα των CYP1A2 και NAT2, την τελευταία εκ των οποίων σε σημαντικό βαθμό, ενώ, δεν φαίνεται να αλληλεπιδρά με τα ένζυμα CYP2A6, XO και UGT1A1/1A6. Η αναστολή αυτή είναι πιθανόν να είναι σημαντική σε άτομα που εκτίθενται σε περιβαλλοντικά προκαρκινογόνα, ενώ εγείρει και την απαίτηση για αυξημένη εγρήγορση σε περίπτωση συγχορήγησης φαρμάκων τα οποία είναι υποστρώματα για το CYP1A2 ή αποβάλλονται μέσω ακετυλίωσης.

Λέξεις κλειδιά: CYP1A2, CYP2A6, Οξειδάση της ξανθίνης, NAT2, μέντα, χημειοπροστασία, ξενοβιοτικά, αποτοξίνωση

Abstract

Introduction: Peppermint (*Mentha x Piperita* L.) is one of the most popular herb known for its aromatic and medicinal properties. Peppermint leaves are traditionally used for the symptomatic treatment of digestive disorders. Previous *in vitro* and *in vivo* studies have shown that water extracts of various herbs affect the functionality of Phase I and Phase II enzymes of xenobiotic metabolism. However, there is no equivalent *in vivo* study of the effect of peppermint on the functionality of these enzymes in humans. The purpose of the present study was to investigate the effect of peppermint decoction on the functionality of CYP1A2, CYP2A6, XO, NAT2 and UGT1A1/1A6 enzymes by the use of caffeine and paracetamol as probe-drugs.

Methods: The study included 9 healthy volunteers who abstained from drugs and foods that affect the above-mentioned enzymes for 9 days; on days 4th-9th, volunteers consumed 4gr of peppermint decoction daily. The volunteers were administered caffeine as probe-drug for CYP1A2, CYP2A6, XO and NAT2 functionality and paracetamol as a probe-drug for UGT1A1/1A6 functionality. Urine and saliva samples were collected immediately before and after the 6-day peppermint consumption period. The concentration of caffeine metabolites in urine and saliva as well as paracetamol in urine were determined by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). CYP1A2, CYP2A6, XO and NAT2 functionality was determined by the metabolic ratios of caffeine, while the UGT1A1/1A6 functionality using the rate of conjugate paracetamol.

Results: The average value of caffeine metabolic ratios for CYP1A2 in urine and saliva exhibited a non-statistically significant reduction after the consumption of peppermint (urine: 3.166 ± 1.075 vs 2.927 ± 0.757 ; saliva: 0.564 ± 0.120 vs 0.501 ± 0.119 ; $p > 0.05$). The average value of caffeine metabolic ratio for CYP2A6 in urine exhibited no statistically significant change after the consumption of peppermint (0.483 ± 0.101 vs 0.501 ± 0.090 ; $p > 0.05$). Similarly, the average value of caffeine metabolic ratio for XO in urine exhibited no statistically significant change after the consumption of peppermint (0.564 ± 0.064 compared to 0.564 ± 0.063 ; $p > 0.05$). Conversely, the average value of caffeine metabolic ratio for NAT2 in urine exhibited a statistically significant reduction after the consumption of peppermint (0.153 ± 0.131 vs 0.140 ± 0.125 ; $p = 0.004$). The average value of functionality marker of UGT1A1/1A6, namely, the ratio of conjugated/total paracetamol in urine, exhibited no

statistically significant change after the consumption of peppermint (0.831 ± 0.137 vs 0.847 ± 0.101 ; $p > 0.05$).

Conclusion: Regular consumption of peppermint decoction is not likely to result in clinically significant interaction with the enzymes of the xenobiotics and detoxification metabolism CYP2A6, XO and UGT1A1/1A6 and appears to inhibit the activity of CYP1A2 and NAT2, the latter at statistically significant degree. This effect is likely to be important to individuals exposed to environmental procarcinogens and raises the demand for increased vigilance in case of concomitant use of drugs that are substrates for CYP1A2 or eliminated through acetylation.

Key words: CYP1A2, CYP2A6, Xanthine oxidase, NAT2, peppermint, chemoprevention, xenobiotics, detoxification

1. Εισαγωγή

Στις μέρες μας ένα μεγάλο ποσοστό του παγκόσμιου πληθυσμού βασίζει τις πρωταρχικές ανάγκες της υγείας του σε εγχώρια ή παραδοσιακά φάρμακα με το μεγαλύτερο μέρος της θεραπείας να περιλαμβάνει τη χρήση φυτικών εκχυλισμάτων, συχνά σε υδατικά διαλύματα. Στις φυτικές τροφές που χρησιμοποιούνται ως φάρμακα, μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι θεραπείες με βότανα. Η προετοιμασία για τη χρήση των φαρμάκων, που περιλαμβάνει συνήθως εμπότιση και θέρμανση ακατέργαστου φυτικού υλικού, κυριάρχησε για αιώνες. Ακόμα και σήμερα οι πάροχοι υγείας στην Ευρώπη και στην Ασία συνταγογραφούν αφεψήματα βοτάνων. Ωστόσο, τέτοιες εφαρμογές βασίζονται κυρίως στη λαογραφία και την παραδοσιακή ιατρική, παρά σε τεκμηριωμένες έρευνες. Η μέντα (*Mentha x piperita* L.), την οποία μελετήσαμε, ανήκει στα πιο διαδεδομένα αφεψήματα που παρασκευάζονται ως μονήρες συστατικό και όχι σε συνδυασμό με άλλα βότανα (McKay and Blumberg, 2006).

Η μέντα (*Mentha x piperita* L.) είναι πολυετές γηγενές φυτό της Ευρώπης το οποίο καλλιεργείται σε πολλά μέρη του κόσμου. Οι αρχαίοι Έλληνες, Αιγύπτιοι και Ρωμαίοι το γνώριζαν ως καρύκευμα των τροφών και ως φάρμακο. Είναι πρωτίστως γνωστό για τις γευστικές και αρωματικές του ιδιότητες και τα φύλλα της μέντας (φρέσκα ή αποξηραμένα) και το αιθέριο έλαιο, το οποίο εξάγεται από τα φύλλα, χρησιμοποιούνται σε πολλά τρόφιμα, σε καλλυντικά και σε φαρμακευτικά προϊόντα.

Η μέντα είναι ευρέως γνωστή για την ανακούφιση των διαταραχών της πέψης χρησιμοποιούμενη για δύο, τουλάχιστον, αιώνες. Σύμφωνα με βιβλιογραφικές αναφορές, την ESCOP (The European Scientific Cooperative on Phytotherapy) και διάφορους επιστημονικούς φορείς από χώρες όπως το Βέλγιο, την Γαλλία και την Γερμανία οι θεραπευτικές της ενδείξεις περιλαμβάνουν την συμπτωματική αντιμετώπιση της δυσπεψίας, του φουσκώματος, των ερυγών, της επιγαστρικής διάτασης, της γαστρίτιδας, της εντερίτιδας, της ρινικής συμφόρησης, ενώ στην Βρετανική Επιτομή των Βοτάνων (British Herb Compendium) αναφέρεται και ως χολεκκριτικό, και σπασμολυτικό. Στην λαϊκή ιατρική χρησιμοποιείται ως εμμηναγωγό, αντισκωληκικό, ως επιταχυντής της γαλακτόρροιας και ως καταπαρύντικό. Επίσης, χρησιμοποιείται για την θεραπεία της βρογχίτιδας, της βακτηριακής δυσεντερίας, του διαβήτη, της διάρροιας, της δυσμηνόρροιας, του πυρετού της υπέρτασης, του ίκτερου, της ναυτίας και των μολύνσεων της ουροφόρου οδού.

Σε διάφορες *in vitro* μελέτες έχει αποδειχθεί η αντιοξειδωτική της ικανότητα, καθώς και η αντικαρκινική, η αντιβακτηριακή και η αντιμυκητιασική της δράση. Σε μελέτες ζωικών μοντέλων έχει αναδειχθεί η χαλαρωτική δράση της στο γαστρεντερικό σύστημα και η προστατευτική της δράση στην καρκινογένεση. Σε μελέτες σε ανθρώπους έχει δειχθεί η ευεργετική της δράση στο σύνδρομο του ευερέθιστου εντέρου καθώς και στην δυσπεψία και τον κοιλιακό πόνο (McKay and Blumberg, 2006; European Medicines Agency, 2008).

Τα κύρια πτητικά συστατικά στο αιθέριο έλαιο της μέντας είναι η μενθόλη (33-60%), η μενθόνη (15-32%), η ισομενθόνη (2-8%), η ευκαλυπτόλη (5-13%) κ.ά. Τα φύλλα περιέχουν 1,2-3,9% αιθέριο έλαιο, ενώ το έγχυμα (infusion) των φρέσκων φύλλων περιέχει 21% του αρχικού ελαίου. Τα φρέσκα φύλλα περιέχουν β-καροτένιο, χλωροφύλλες, α- και γ-τοκοφερόλες και ασκορβικό οξύ. Τα κύρια μέταλλα στα αποξηραμένα φύλλα είναι το κάλιο, το ασβέστιο, το μαγνήσιο και το νάτριο και σε μικρότερα ποσά σιδήρου, μαγγανίου, ψευδαργύρου, και χαλκού. Το συνολικό περιεχόμενο σε πολυφαινόλες στα φύλλα είναι 19-23% με τα φλαβονοειδή να ανέρχονται στο 12%. Αυτά περιλαμβάνουν την εριοκιτρίνη και το ροσμαρινικό οξύ, των οποίων η συνολική περιεκτικότητα είναι 59-67%, την 7-Ο-ρουτενοσίδη της λουτεολίνης (7-12%), την εσπεριδίνη (6-10%) και μικρότερα ποσά από απιγκενίνη και άλλα φλαβονοειδή. Το 75% περίπου των πολυφαινολών των φύλλων εκχυλίζονται στο έγχυμα μέντας (Dorman et al., 2003; McKay and Blumberg, 2006; Fecka and Turek, 2007). Στην συνέχεια θα αναφερθούν οι κυριότερες ιδιότητες των φλαβονοειδών τα οποία αποτελούν βασικά συστατικά της μέντας.

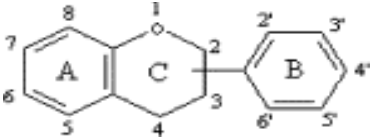
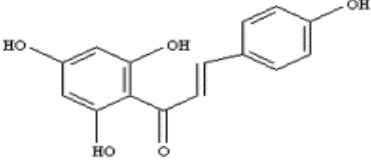
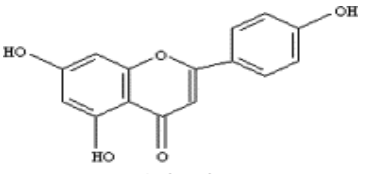
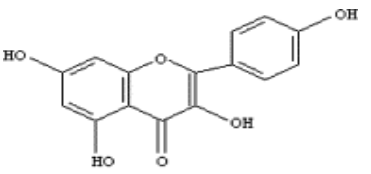
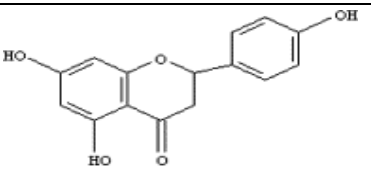
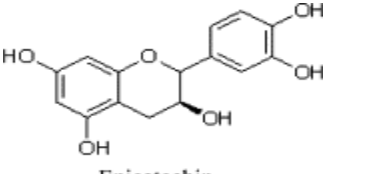
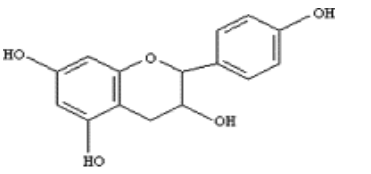
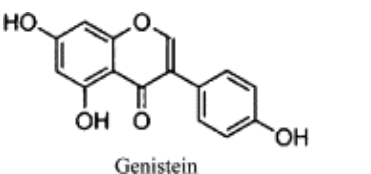
1.1. Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή είναι μέλος μιας οικογένειας πολυφαινολικών ενώσεων που απαντώνται στην φύση και αντιπροσωπεύουν μία από τις επικρατούσες τάξεις ενώσεων στα λαχανικά, στα φρούτα, στους ξηρούς καρπούς και σε αναψυκτικά και ροφήματα όπως ο καφές, το τσάι, το κόκκινο κρασί όπως και σε θεραπευτικά βότανα. Έχουν ταυτοποιηθεί περισσότερες από 8.000 ενώσεις οι οποίες έχουν την δομή του φλαβονοειδούς οι οποίες προκύπτουν από τους διάφορους συνδυασμούς των πολλαπλών υδροξυλομάδων και μεθοξυλομάδων στον βασικό σκελετό. Οι τάξεις των φλαβονοειδών περιλαμβάνουν τις χαλκόνες, τις φλαβόνες, τις φλαβονόλες, τις φλαβανόνες, τις φλαβανόλες, τις ανθοκυανίνες και τις ισοφλαβόνες (Πίνακας 1, Moon et al., 2006).

Τα φλαβονοειδή ανακαλύφθηκαν τη δεκαετία του 1930 από τον Albert Szent-Gyorgyi (βραβείο Νόμπελ) ως ενώσεις με ιδιαίτερη αντιοξειδωτική ικανότητα. Η ικανότητά τους να δεσμεύουν ρίζες υδροξυλίου, ανιόντα ριζών σουπεροξειδίου, υπεροξειδικές ρίζες λιπιδίων υπογραμμίζουν αρκετές από τις θετικές επιδράσεις των φλαβονοειδών στον οργανισμό, οι οποίες είναι σημαντικές στην πρόληψη ασθενειών που σχετίζονται με την οξειδωτική βλάβη που προκαλείται σε μεμβράνες, πρωτεΐνες και DNA. Επιπλέον, τα φλαβονοειδή εμφανίζουν υψηλής εξειδίκευσης αλληλεπίδραση με ρυθμιστικά ένζυμα και υποδοχείς στους οργανισμούς. Μερικά φλαβονοειδή αποτελούν ισχυρούς καταστολείς στη βιοσύνθεση των προσταγλανδινών. Αυτό οφείλεται στην καταστολή της λειτουργίας ενζύμων-κλειδιών όπως η λιποξυγενάση, φωσφολιπάση και η κυκλοξυγενάση. Μια άλλη κατηγορία ενζύμων που επηρεάζονται από τα φλαβονοειδή είναι οι πρωτεϊνικές κινάσες. Στην περίπτωση αυτή τα φλαβονοειδή αναστέλλουν αυτά τα ένζυμα με το να ανταγωνίζονται το ATP στις θέσεις σύνδεσής του. Αυτά τα μοντέλα αναστολής παρέχουν μια ικανοποιητική εξήγηση όσον αφορά τη μοριακή βάση της αντιφλεγμονώδους επίδρασης των φλαβονοειδών. Έτσι, τα φλαβονοειδή μπορούν δυνητικά να χρησιμοποιηθούν ως χημειοπροστατευτικά συμπληρώματα διατροφής για τη μείωση εμφάνισης στεφανιαίας νόσου, ηπατικών ασθενειών όπως επίσης και κάποιων ειδών καρκίνου.

Ενώσεις με δομή φλαβονοειδών έχει βρεθεί να έχουν κυτταροτοξική δράση. Έτσι, έχουν αναγνωριστεί αρκετοί μηχανισμοί με τους οποίους τα φλαβονοειδή παίζουν σημαντικό ρόλο στην κυτταροτοξικότητα. Η αντικαρκινική ικανότητα πολλών φλαβονοειδών όπως πινοστρομπίνη, κουερσετίνη, μυρισετίνη, μορίνη αποδίδεται στην ικανότητα να αναστέλλουν τις τοποϊσομεράσες I και II. Τα φλαβονοειδή μπορούν, επίσης, να επιβραδύνουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό με το να συνδέονται στον υποδοχέα οιστρογόνων. Εναλλακτικά, τα φλαβονοειδή μπορούν να επηρεάζουν καρκινικά κύτταρα με το να ενεργοποιούν τη διαδικασία της απόπτωσης. Τα φλαβονοειδή αποτελούν επίσης δυνητικούς αναστολείς μιτογόνων σηματοδοτικών μονοπατιών με το να επηρεάζουν τη δραστηριότητα πληθώρας κινάσων. Μερικά φλαβονοειδή παρουσιάζουν αντιϊκή και αντιβακτηριακή ικανότητα. Η κουερσετίνη αποτελεί έναν ικανοποιητικό αναστολέα της αντίστροφης μεταγραφάσης και της πρωτεάσης του HIV1.

Πίνακας 1: Οι χημικές δομές και οι κύριες διατροφικές πηγές των κυριότερων υποομάδων των φλαβονοειδών.

	Δομή	Παράδειγμα	Κύριες πηγές
Βασική δομή των φλαβονοειδών			
Χαλκόνη	 Chalcone	Ξανθοχουμόλη	Λυκίσκος, μπύρα
Φλαβόνη	 Apigenin	Ακασετίνη Απιγενίνη Χρυσίνη Διοσμετίνη Λουτεολίνη	Μαϊδανός, θυμάρι, σέλινο, μέλι, πρόπολη
Φλαβονόλη	 Kaempferol	Γκαλαγκίνη Κεμπφερόλη Μορίνη Κουερσετίνη	Κρεμμύδια, μπρόκολα, μήλα, κεράσια
Φλαβανόνη	 Naringenin	Εριοδικτυόλη Εσπερετίνη Ναρινγενίνη	Κίτρο
Φλαβανόλη	 Epicatechin	Κατεχίνη Επικατεχίνη Προανθοκυανιδίνες	Κακάο, πράσινο τσάι, κόκκινο κρασί,
Ανθοκυανίνη	 Cyanidin	Κυανιδίνες	Κεράσια, σταφύλια, κόκκινο λάχανο, βατόμουρο
Ισοφλαβόνη	 Genistein	Βιοκανίνη Α Γκενιστεΐνη Διατζεΐνη Εκουόλη	Κόκκινο τριφύλλι, αλφάλφα, μπιζέλια, σόγια

Βιοδιαθεσιμότητα των φλαβονοειδών

Τα φλαβονοειδή εμφανίζονται συνήθως αποθηκευμένα στους ιστούς των φυτών κυρίως με την μορφή της σύζευξης με σάκχαρα στον C2 (χαλκόνες), στον C3 (φλαβονόλες, ανθοκυανιδίνες και φλαβαν-3-όλες), και στον C7 (φλαβανόνες, φλαβόνες, και ισοφλαβόνες). Τα πιο κοινά συζευγμένα σάκχαρα είναι η γλυκόζη, η γαλακτόζη, η ραμνόζη, η ξυλόζη, η ρουτινόζη, η αραβινοπυρανόζη και η αραβινοφουρανόζη. Κατά την συλλογή των καρπών, του φυτού ή των σπόρων τα φλαβονοειδή έχουν, συνήθως, καλή σταθερότητα σε αυτήν την συζευγμένη μορφή και διατηρούνται σε υψηλή συγκέντρωση στις τροφές και στα ροφήματα.

Μετά την λήψη τους, το τμήμα του σακχάρου των φλαβονοειδών αποσπάται από τον φαινολικό κορμό στο λεπτό έντερο και τα φλαβονοειδή απορροφώνται στο σημείο εκείνο. Διάφορα ένζυμα, όπως η β-γλυκοσιδάση, υδρολύουν τα γλυκοζυλιωμένα φλαβονοειδή και οι αγλυκόνες εισέρχονται στα επιθηλιακά κύτταρα με παθητική διάχυση. Τα φλαβονοειδή που είναι συζευγμένα με την ραμνόζη πρέπει να φτάσουν στο κόλον (παχύ έντερο) και να υδρολυθούν από τις α-ραμνοσιδάσες, οι οποίες εκκρίνονται από την μικροβιακή χλωρίδα, έτσι ώστε να μπορέσουν να απορροφηθούν. Μετά την απορρόφησή τους, οι αγλυκόνες υπόκεινται σε κάποιου βαθμού μεταβολισμό φάσης II στα κύτταρα του εντέρου, όπως μεθυλίωση, σουλφούρωση και γλυκουρονιδίωση. Τα προϊόντα αυτά εισέρχονται κατόπιν στο αίμα μέσω της πυλαίας φλέβας και φτάνουν στο ήπαρ όπου μπορεί να υποστούν περαιτέρω μεταβολισμό φάσης II (σύζευξη) και να μεταφερθούν πάλι στο αίμα μέχρις ότου να απεκκριθούν στα ούρα. Κάποια προϊόντα σύζευξης στο ήπαρ εκκρίνονται έπειτα, ως συστατικά της χολής, στο έντερο (εντεροηπατική κυκλοφορία) και οι ασύζευκτες ενώσεις αναγεννώνται από τα μικροβιακά ένζυμα του εντέρου πριν απορροφηθούν εκ νέου. Οι μεταβολίτες που δεν απορροφώνται αποβάλλονται από τα κόπρανα. Όλοι αυτοί οι μηχανισμοί σύζευξης είναι πολύ αποτελεσματικοί με αποτέλεσμα οι ασύζευκτες ενώσεις να είναι γενικώς απύσες ή παρούσες σε χαμηλές συγκεντρώσεις στο πλάσμα μετά από μία διατροφική δοσολογία.

Οι φλαβονόλες, ειδικότερα, μετά τον μεταβολισμό τους στις αντίστοιχες αγλυκόνες αποδομούνται εκτενώς από άλλα μικρόβια του παχέος εντέρου (microbiota) δημιουργώντας απλούστερες φαινολικές ενώσεις, μετά την διάσπαση του φαινολικού δακτυλίου C. Κατόπιν, οι δύο εναπομείναντες δακτύλιοι υδροξυλιώνονται και δημιουργούνται διάφορες φαινολικές ενώσεις που απορροφώνται τελικά στο παχύ έντερο.

Οι φλαβανόνες (π.χ. εσπεριτίνη, ναριγκενίνη) φαίνεται ότι είναι περισσότερο βιοδιαθέσιμες από άλλα φλαβονοειδή όπως οι φλαβονόλες και οι φλαβαν-3-όλες. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι αυτές οι ενώσεις αποδομούνται λιγότερο από τα μικρόβια του παχέος εντέρου και, κατά συνέπεια, είναι περισσότερο διαθέσιμες για απορρόφηση. Ο λόγος μπορεί να είναι η παρουσία τους στα τρόφιμα ως ρουτινοσίδες και νεοεσπεριδοσίδες οι οποίες φαίνεται ότι είναι ανθεκτικές σε μερικά είδη μικροβίων του παχέος εντέρου.

Όλες, σχεδόν, οι ισοφλαβόνες (νταϊτζεΐνη, γκενιστεΐνη και φορμονονετίνη) υφίστανται ως γλυκοσίδες και συνεπώς δεν απορροφώνται κατά μήκος των κυττάρων του εντέρου εξαιτίας της υψηλής πολικότητας και του μοριακού τους βάρους. Η βιοδιαθεσιμότητά τους απαιτεί την μετατροπή των γλυκοσίδων σε βιοδραστικές αγλυκόνες μέσω της δράσης των εντερικών β-γλυκοσιδασών που προέρχονται από τα βακτήρια του λεπτού εντέρου. Κατόπιν, οι αγλυκόνες αυτές εισέρχονται στην περιφερειακή κυκλοφορία (Marin et al., 2015).

Μηχανισμοί δράσης φλαβονοειδών

Ανάλογα με την συγκέντρωσή τους, τα φλαβονοειδή εμφανίζουν διαφορετικές βιολογικές δραστηριότητες. Ο μηχανισμός της δράσης τους εμπλέκει τον υποδοχέα AhR (Arylhydrocarbon Receptor, υποδοχέας αρωματικών υδρογονανθράκων) ο οποίος είναι μεταγραφικός παράγοντας που ενεργοποιείται από προσδέτη. Σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις λειτουργούν ως ανταγωνιστές του υποδοχέα AhR συνδεδεμένα με τον υποδοχέα χωρίς ενεργοποίηση κάποιου μεταγραφικού παράγοντα. Σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, τα ίδια φλαβονοειδή, μπορεί να λειτουργήσουν ως αγωνιστές του υποδοχέα AhR τροποποιώντας την έκφραση γονιδίων. Για παράδειγμα, η κουερσετίνη, ένα από τα πιο άφθονα, στη φύση, φλαβονοειδή, συνδέεται ως ανταγωνιστής του υποδοχέα AhR και αναστέλλει την μεταγραφή του mRNA και την πρωτεϊνική έκφραση του CYP1A1 η οποία επάγεται από τον πολυκυκλικό αρωματικό υδρογονάνθρακα βενζο(α)πυρενίο. Η αναστολή αυτή έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της βλάβης του DNA από την πρόσδεση του ενεργοποιημένου από το CYP1A1 βενζο(α)πυρενίου (Kana et al., 1999).

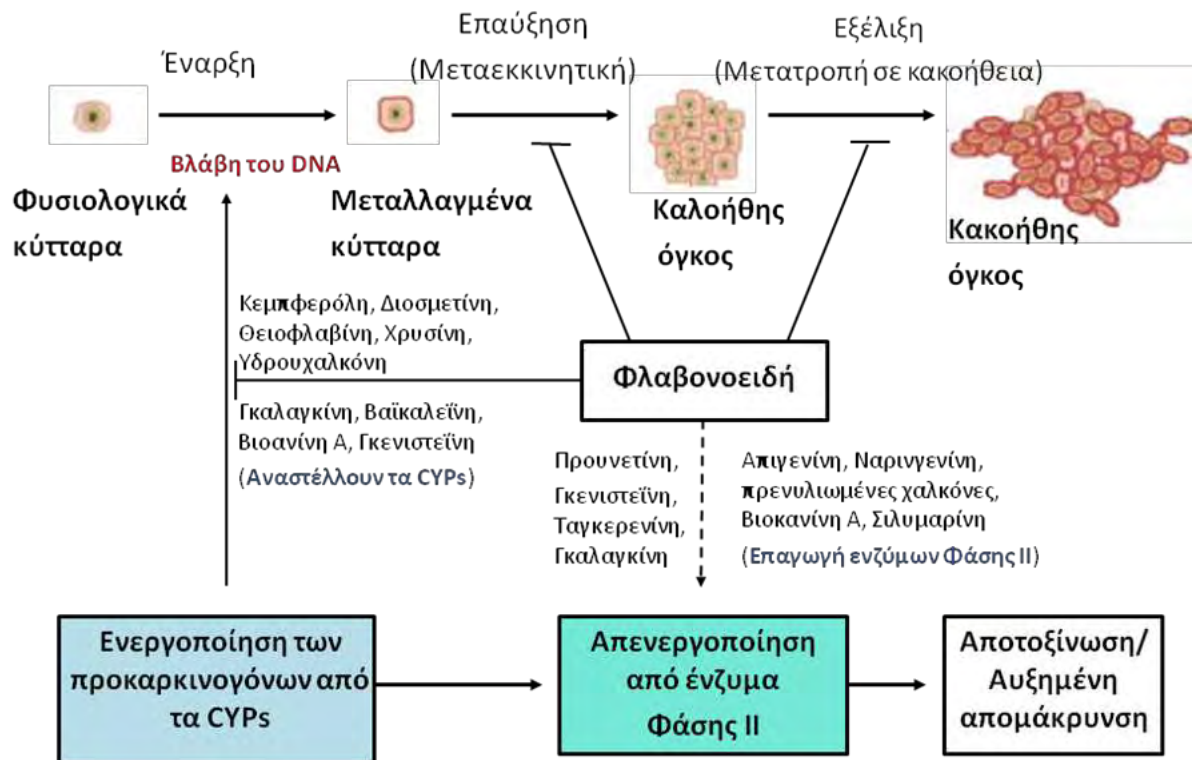
Από πειράματα με κυτταρικές σειρές και με μοντέλα χημικώς επαγόμενης καρκινογένεσης έχουν συσσωρευτεί αποδεικτικά στοιχεία για τις χημειοπροστατευτικές ιδιότητες των φλαβονοειδών. Τα φλαβονοειδή θεωρείται ότι εμπλέκονται στην προστασία από κακοήγη ογκογένεση μέσω της μείωσης του σχηματισμού των καρκινογόνων ουσιών.

Στην διαδικασία αυτή, η αναστολή των ενζύμων της φάσης I του μεταβολισμού, όπως τα μέλη της οικογένειας CYP1, παίζει πιθανότατα τον πιο σημαντικό ρόλο. Παρόλο που συγκεκριμένα φλαβονοειδή (η διοσμίνη, η διοσμετίνη, η γκαλαγκίνη) είναι αγωνιστές του υποδοχέα AhR, αυξάνοντας έτσι την έκφραση του CYP1 και κατά συνέπεια την δυνατότητα ενεργοποίησης των καρκινογόνων, την ίδια στιγμή, οι ενώσεις αυτές αναστέλλουν ισχυρά τη δραστηριότητα των εκφρασμένων ενζύμων. Έχειδειχθεί, για παράδειγμα, ότι τα ανθρώπινα ένζυμα CYP1A1 και CYP1A2 έχουν την δυνατότητα να ενεργοποιήσουν τις ετεροκυκλικές αρωματικές αμίνες των τροφών IQ, MeIQ, MeIQx, DiMeIQx και PhIP. Το CYP1A2 είναι κατά μία τάξη μεγέθους πιο αποτελεσματικό από το CYP1A1 στην ενεργοποίηση των ετεροκυκλικών αμινών προς μεταλλαξιογόνες ενώσεις. Η αναστολή του CYP1A2 από τα φλαβονοειδή έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της μεταλλαξιογένεσης η οποία προκαλείται από αυτές τις ετεροκυκλικές αμίνες (Edenharder et al., 1993; Hodek et al., 2002). Προαπαιτούμενο για την πρόσδεση των φλαβονοειδών στο CYP1A2 είναι η παρουσία πολλαπλών υδροξυλομάδων, κατά προτίμηση 2 στις θέσεις 5- και 7- του μορίου των φλαβονών και μία επιπλέον υδροξυλομάδα στην θέση C2' των φλαβονολών (Kim et al., 2005).

Εκτός από τα ένζυμα της οικογένειας CYP1A, τα φλαβονοειδή επηρεάζουν την έκφραση και την δραστηριότητα και άλλων ενζύμων της υπεροικογένειας του συστήματος P450 όπως τα CYP1B1 (Roberts et al., 2004), CYP2E1 (Zuber et al., 2002), CYP3A4 (Foster et al., 2003), CYP19 (Le Bail et al., 1998) και ενζύμων της φάσης II του μεταβολισμού των ξενοβιοτικών όπως τα UGT1A1 (Williams et al., 2002), GST (Kohno et al., 2002), SULT (Harris et al., 2004), QR (Miranda et al., 2000). Κατά συνέπεια, οι χημειοπροστατευτικές στρατηγικές μπορεί να περιλαμβάνουν την αναστολή των διαφόρων σταδίων της μεταβολικής ενεργοποίησης των προκαρκινογόνων, συνήθως από τα ένζυμα της φάσης I καθώς και επαγωγή των ενζύμων της φάσης II του μεταβολισμού των φαρμάκων (Chen and Kong, 2004, Σχήμα 1).

Παρά το γεγονός ότι τα φλαβονοειδή παρουσιάζουν πολλαπλές επωφελείς επιδράσεις για τον οργανισμό, η κατανάλωση αυτών των ενώσεων (που συχνά χρησιμοποιούνται ως συμπληρώματα διατροφής) πρέπει να μελετηθεί περαιτέρω με μεγάλη προσοχή καθώς αποτελούν ξενοβιοτικές ουσίες, η δράση των οποίων εμπλέκεται σε πολλές κυτταρικές λειτουργίες στο οργανισμό. Αν και δεν έχουν βρεθεί σημαντικές παρενέργειες αυτών των ουσιών, μερικές από αυτές μπορεί να είναι σημαντικές. Έχει βρεθεί ότι μερικά φλαβονοειδή παρουσιάζουν μεταλλαξιογόνες και/ή προοξειδωτικές επιδράσεις. Έτσι, για να απαντηθεί

το ερώτημα εάν τα φλαβονοειδή είναι ασφαλή για χορήγηση στον άνθρωπο θα πρέπει να πραγματοποιηθούν αρκετές ακόμα μελέτες σε ζώα και μακροχρόνιες κλινικές δοκιμές (Hodek et al., 2002).



Σχήμα 1: Προτεινόμενος μηχανισμός για την καταστολή της καρκινογένεσης από τα φλαβονοειδή μέσω αναστολής των ενζύμων της φάσης I ή/και επαγωγής των ενζύμων της φάσης II του μεταβολισμού (Moon et al., 2006, τροποποιημένη).

Στην παρούσα εργασία η έρευνα εστιάστηκε στην μελέτη της *in vitro* επίδρασης του αφεψήματος της μέντας στην δραστικότητα των ανθρώπινων ενζύμων του μεταβολισμού των ξеноβιοτικών CYP1A2, CYP2A6, οξειδάση της ξανθίνης (XO), NAT2 και UGT1A1/1A6. Στην συνέχεια θα αναφερθούν μερικά γενικά στοιχεία για τα ανωτέρω ένζυμα.

1.2. Κυτόχρωμα P450

Το κυτόχρωμα P450 (CYP) είναι μία υπεροικογένεια αιμοπρωτεϊνών, η οποία αποτελεί το τελευταίο συστατικό μιας αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων τα οποία προέρχονται από το NADPH. Η υπεροικογένεια αυτή των ενζύμων είναι υπεύθυνη για τις οξειδωτικές αντιδράσεις της φάσης I του μεταβολισμού ενός μεγάλου φάσματος δομικών

διαφορετικών υποστρωμάτων και για την κατάλυση πολλών σημαντικών ενδογενών βιοχημικών διεργασιών στα θηλαστικά (Smith et al., 1998). Το CYP εντοπίζεται στις μεμβράνες του Λείου Ενδοπλασματικού Δικτύου (Λ.Ε.Δ.) και τα υποστρώματά του είναι λιποδιαλυτές ενώσεις οι οποίες διαπερνούν το Λ.Ε.Δ. και εγκλωβίζονται σ' αυτό λόγω της λιποειδικής φύσης των μεμβρανών του. Μερικές από τις αντιδράσεις που καταλύει το σύστημα αυτό είναι απαραίτητες για τη ζωή, όπως η μετατροπή της χοληστερόλης σε κορτικοειδή και φυλετικές ορμόνες, η ω-υδροξυλίωση των λιπαρών οξέων, η βιοσύνθεση των χολικών οξέων καθώς και η βιοσύνθεση των προσταγλανδινών (Parke and Ioannides, 1981). Άλλες πάλι αντιδράσεις του ιδίου συστήματος είναι σημαντικές για την αποτοξίνωση από ξένες προς τον οργανισμό ουσίες (ξеноβιοτικές ενώσεις) και για το μεταβολισμό πολλών φαρμάκων. Το σύστημα P450, όμως, ευθύνεται και για την *in vivo* χημική ενεργοποίηση μερικών από τα πιο ισχυρά καρκινογόνα (Olson, 1997).

Η υπεροικογένεια αυτή των αιμοπρωτεϊνών προέρχεται από, τουλάχιστον, 18 διακριτές οικογένειες γονιδίων P450 οι οποίες κωδικοποιούν για 60 τουλάχιστον κυτοχρώματα P450 τα οποία είναι γνωστό ότι εκφράζονται στους ανθρώπινους ιστούς. Οι 3 πρώτες οικογένειες (CYP1-3) εμπλέκονται, γενικώς, στον μεταβολισμό εξωγενών υποστρωμάτων, όπως είναι τα φάρμακα, ενώ οι οικογένειες CYP με μεγαλύτερους αριθμούς εμπλέκονται, συνήθως, στον μεταβολισμό ενδογενών υποστρωμάτων. Τα ένζυμα CYP ευθύνονται για το 75-80% του μεταβολισμού της φάσης I και για το 65-70% της κάθαρσης των φαρμάκων που χρησιμοποιούνται στην κλινική πράξη (Sim and Ingelman-Sundberg, 2010).

Η οικογένεια του ανθρώπινου κυτοχρώματος CYP1 αποτελείται από τα δομικώς σχετιζόμενα κυτοχρώματα CYP1A1, CYP1A2 και CYP1B1 τα οποία παρουσιάζουν ιστοειδική βασική (constitutive) έκφραση καθώς και ιστοειδική επαγωγιμότητα. Η αλληλουχία των αμινοξέων του CYP1A1 και του CYP1B1 παρουσιάζει ομοιότητα 72% και 40% με το CYP1A2, αντίστοιχα. Παρόλο που το CYP1A1 και το CYP1A2 έχουν ευρύτερη εξειδίκευση υποστρωμάτων σε σχέση με το CYP1B1, τα 3 αυτά ένζυμα παρουσιάζουν σημαντικές αλληλεπικαλύψεις στη δράση τους (Landi et al., 1999). Το CYP1A2 απαντάται μόνο στο ήπαρ, το CYP1A1 στους πνεύμονες, στο λάρυγγα, στα νεφρά, στα λεμφοκύτταρα και στον πλακούντα και το CYP1B1 στα νεφρά, στον προστάτη, στις ωοθήκες και στην μήτρα (Landi et al., 1999). Το CYP1A2 είναι ένα από τα πιο άφθονα ισόενζυμα του CYP στο ήπαρ σε ποσοστό υψηλότερο του 10% του συνολικού περιεχομένου σε CYP (Pelkonen et al., 2008).

CYP1A2

Το CYP1A2 ενεργοποιεί προκαρκινογόνα συστατικά των τροφών και του περιβάλλοντος προς καρκινογόνες ενώσεις όπως τις αρωματικές αμίνες και τις νιτροζαμίνες των αζωχρωμάτων και του καπνού των τσιγάρων, τις N-ετεροκυκλικές αμίνες οι οποίες απαντώνται στο κρέας που ψήνεται σε υψηλές θερμοκρασίες, τους πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες (PAH) οι οποίοι περιέχονται στο πετρέλαιο, στο κάρβουνο, στα αέρια των εξατμίσεων, στον καπνό του τσιγάρου, στα κρέατα που ψήνονται στα κάρβουνα (Shimada et al., 1994; Sinha et al., 1994) και την αφλατοξίνη B1 (Gallagher et al., 1994). Επίσης είναι το κύριο ένζυμο που εμπλέκεται στο μεταβολισμό φαρμάκων όπως η καφεΐνη (Kot and Daniel, 2008), η θεοφυλλίνη, η τακρίνη, η ροπιβακαΐνη, η κλοζαπίνη, η φλουταμίδη, η μελατονίνη, η ολανζαπίνη και η τριαμετέρηνη (Faber et al., 2005). Επιπρόσθετα, συμμετέχει στον μεταβολισμό της 17-β-οιστραδιόλης προς 2-OH και 4-OH μεταβολίτες (Yamazaki et al., 1998). Η λειτουργία του CYP1A2 επάγεται και αναστέλλεται από διάφορους περιβαλλοντικούς και χημικούς παράγοντες, ενώ φαινοτυπικές μελέτες έχουν προτείνει ότι η λειτουργικότητά του ρυθμίζεται από δύο, τουλάχιστον, μηχανισμούς: έναν ο οποίος ελέγχει τα βασικά (constitutive) επίπεδα έκφρασης και έναν δεύτερο ο οποίος ρυθμίζει την επαγωγιμότητα (Butler et al., 1992; Sinha et al., 1994; Lang et al., 1994; Nakajima et al., 1994; Sachse et al., 1999).

Η επαγωγή του CYP1A2 είναι κυρίως μεταγραφική και εξαρτάται από τον υποδοχέα αρωματικών υδρογονανθράκων, AhR (Aryl hydrocarbon Receptor), όπως επίσης και άλλους άγνωστους παράγοντες. Η διαδικασία αυτή ξεκινά με τη σύνδεση ενός κατάλληλου επαγωγικού παράγοντα στον υποδοχέα AhR μέσα στο κυτταρόπλασμα και μετατόπιση του ενεργοποιημένου υποδοχέα μέσα στον πυρήνα όπου σχηματίζει διμερές με την πρωτεΐνη πυρηνικής μετατόπισης αρωματικών υδρογονανθράκων (ARNT). Στην συνέχεια, το διμερές AhR-ARNT αλληλεπιδρά με έναν ενισχυτή αποκρινόμενο στα ξενοβιοτικά (xenobiotic-response element) στην 5' περιοχή με συνέπεια την αυξημένη μεταγραφή του γονιδίου του CYP1A2, την σύνθεση του κατάλληλου m-RNA και την *de novo* σύνθεση της πρωτεΐνης του CYP1A2 (Okey et al., 2005). Η επαγωγή μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την μείωση των φαρμακολογικών δράσεων η οποία προκαλείται από αυξημένο μεταβολισμό των φαρμάκων, ή να δημιουργήσει ανεπιθύμητη ανισορροπία μεταξύ τοξικότητας και αποτοξίνωσης. Πράγματι, δεν είναι αποσαφηνισμένο εάν η ενεργοποίηση της οδού του υποδοχέα AhR συμβάλλει στην αύξηση του κινδύνου από την ενεργοποίηση των

προκαρκινογόνων ή παρουσιάζει όφελος μέσω μιας πιο ταχείας αποβολής εν δυνάμει επικίνδυνων χημικών ουσιών (Lin and Lu, 1998).

Η επαγωγή του CYP1A2 έχει παρατηρηθεί ως συνέπεια του καπνίσματος (Begas et al., 2007), της κατανάλωσης κρέατος ψημένου στα κάρβουνα ή μαγειρεμένου σε υψηλές θερμοκρασίες (Sinha et al., 1999), της κατανάλωσης σταυρανθών λαχανικών όπως τα μπρόκολα, τα λαχανάκια Βρυξελλών και τα λάχανα τα οποία περιέχουν την ουσία ινδολ-3-καρβινόλη (Vistisen et al., 1991; Vistisen et al., 1992), της χρήσης φαρμάκων όπως είναι η ομεπραζόλη, η φαινυτοΐνη και η ριφαμπικίνη, καθώς και της περιβαλλοντικής έκθεσης σε πολυβρωμιωμένα διφαινύλια (Landi et al., 1999). *In vivo* αναστολείς του CYP1A2 είναι η α-ναφθοφλαβόνη (Landi et al., 1999) και διάφορα φάρμακα όπως η φλουβοξαμίνη (Rasmussen et al., 1998), η σιμετιδίνη (Loi et al., 1993), η βεραπαμίλη (Fuhr et al., 1992a), και οι κινολόνες (Fuhr et al., 1992b). Επιπλέον, η δραστικότητα του CYP1A2 αναστέλλεται από τον χυμό του γκρέϊπ-φρούτ (Fuhr and Kummert, 1995), το αλκοόλ (Le Marchand et al., 1997), τα αντισυλληπτικά (Kalow and Tang, 1993) και την θεραπεία υποκατάστασης με οιστρογόνα (Pollock et al., 1999). Η αναστολή αυτή είναι αντιστρεπτή και είναι αποτέλεσμα συναγωνισμού για την ενεργό περιοχή του ενζύμου. Μειωμένη δραστικότητα του CYP1A2 έχει, επίσης, διαπιστωθεί σε άτομα με ηπατική νόσο (Lelouet et al., 2001) και κατά την διάρκεια της εγκυμοσύνης (Tsutsumi et al., 2001), ενώ διαφορούμενες είναι οι απόψεις για την επίδραση του φύλου (Carrillo and Benitez, 1994; Relling et al., 1992) και της ηλικίας (Bebia et al., 2004; Parkinson et al., 2004).

Η λειτουργικότητα του CYP1A2 παρουσιάζει μεγάλες διαφορές μεταξύ των ατόμων, αλλά δεν έχει βρεθεί κάποια συσχέτιση μεταξύ του γονότυπου του ανθρώπινου CYP1A2 και του μεταβολικού φαινοτύπου του ενζύμου αυτού (Jiang et al., 2006). Παρόλο που έχουν περιγραφεί περισσότερα από 40 σημεία πολυμορφισμού εντός και πλησίον του γονιδίου στον άνθρωπο (<http://www.cypalleles.ki.se/cyp1a2.htm>; προσπελάστηκε 26/7/2016), δεν έχει βρεθεί εκείνη η διαφορά νουκλεοτιδίων που θα μπορούσε να ερμηνεύσει τη φαινοτυπική ποικιλομορφία στο γονίδιο του CYP1A2, ούτε σε εξώνια, ούτε στην περιοχή σύνδεσης εξωνίων-ιντρονίων, ούτε στην 5'-πλευρική περιοχή του γονιδίου σε Καυκάσιους και Ασιατικούς πληθυσμούς (Nakajima et al., 1994; Sachse et al., 2003). Υπάρχουν, όμως, 2 σημειακές μεταλλάξεις στο ιντρόνιο-1 και μία μετάλλαξη στην 5'-πλευρική περιοχή του γονιδίου του CYP1A2 που σχετίζονται με αυξημένη ή μειωμένη δυνατότητα επαγωγής του

CYP1A2 από επαγωγικούς ή ανασταλτικούς παράγοντες, αντίστοιχα (Nakajima et al., 1999; Sachse et al., 1999; Han et al., 2002).

Επιδημιολογικά, αυξημένη δραστικότητα του CYP1A2 έχει συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο για καρκίνο του παχέος εντέρου (Lang et al., 1994), με αυξημένο κίνδυνο καρκίνου της ουροδόχου κύστης (Tao et al., 2012), ενώ μειωμένη δραστικότητα του CYP1A2 έχει συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο του καρκίνου των όρχεων (Vistisen et al., 2004). Επιπλέον, η δραστικότητα του CYP1A2 έχει εμφανίσει θετική συσχέτιση με την μαστογραφική πυκνότητα σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες και, κατά συνέπεια, η αυξημένη δραστικότητα του ενζύμου αυτού έχει προταθεί ως παράγων κινδύνου για την ανάπτυξη καρκίνου του μαστού (Hong et al., 2004).

CYP2A6

Το κυτόχρωμα CYP2A6 είναι ένα ένζυμο της οικογενείας του γονιδίου CYP2, η οποία αποτελεί τη μεγαλύτερη οικογένεια P450 στα θηλαστικά (Pelkonen et al., 2008). Είναι ένζυμο της φάσης I του μεταβολισμού των φαρμάκων και μεταβολίζει, κατά προσέγγιση, το 3% των χρησιμοποιούμενων φαρμάκων όπως το βαλπροϊκό οξύ, την πιλοκαρπίνη, την κυκλοφωσφαμίδη, την ταμοξιφαίνη, την προποφόλη κ.ά. (Di et al., 2009). Εκφράζεται, κυρίως, στο ήπαρ σε ποσοστό 1-10% περίπου επί του συνολικού P450 (Pelkonen et al., 2000). Είναι, πρωτίστως, υπεύθυνο για τη μετατροπή της νικοτίνης σε κοτινίνη (Messina et al., 1997). Καταλύει την μεταβολική ενεργοποίηση διαφόρων προμεταλλαξιογόνων και προκαρκινογόνων όπως η αφλατοξίνη B1 και το 1,3-βουταδιένιο (Oscarson, 2001), η 3-μεθυλινδόλη (Thornton-Manning et al., 1996) και ορισμένων νιτροζαμινών του καπνού και των τροφών όπως η N-νιτροζο-διαιθυλαμίνη και η 4-(μεθυλνιτροζάμινο)-1-(3-πυριδυλ)-1-βουτανόνη (Yamazaki et al., 1992; Camus et al., 1993). Η λειτουργικότητά του επάγεται από διάφορα αντιεπιληπτικά φάρμακα όπως η φαινυτοΐνη, η καρβαμαζεπίνη και η φαινοβαρβιτάλη (Sotaniemi et al., 1995), ενώ το κάπνισμα φαίνεται να αναστέλλει το μεταβολισμό της νικοτίνης και της κουμαρίνης οι οποίες μεταβολίζονται κυρίως από το CYP2A6 (Benowitz et al., 2003). *In vitro* αναστολείς του CYP2A6 είναι το 8-μεθοξυψωραλένιο (αντιψωριασικό), η τρανυλκυπρομίνη (αντικαταθλιπτικό) και η κετοκοναζόλη (αντιμυκητιασικό), ενώ *in vivo* αναστολείς είναι το 8-μεθοξυψωραλένιο και τα φλαβονοειδή τα οποία περιέχονται στο χυμό του γκρέϊπ-φρούτ (Pelkonen et al., 2000).

Η επαγωγή του CYP2A6 διαμεσολαβείται από τον πυρηνικό υποδοχέα PXR (Pregnane X Receptor) ο οποίος, μετά την πρόσδεση του επαγωγικού παράγοντα στο κυτταρόπλασμα μετακινείται στον πυρήνα. Το σύμπλεγμα αυτό προσδένεται σε πυρηνικούς υποδοχείς RXR (Retinoid X Receptor) σχηματίζοντας ετεροδιμερή τα οποία επιστρατεύουν ενεργοποιητές, προσδένονται σε ρυθμιστικές περιοχές του γονιδίου-στόχου (PXRRE) και πυροδοτούν τον μεταγραφικό μηχανισμό (Pavek and Dvorak, 2008).

Αυξημένη έκφραση του CYP2A6 σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο καρκίνου του ήπατος σε πληθυσμούς, με συχνή έκθεση σε αφλατοξίνη (Kirby et al., 1993) και με αυξημένο κίνδυνο καρκίνου του ορθού (Nowell et al., 2002).

Το γονίδιο του CYP2A6 παρουσιάζει μεγάλο πολυμορφισμό με, κατά προσέγγιση, 40 καταγεγραμμένα αλληλόμορφα με σημαντικές διαφορές μεταξύ των φυλών στον γονότυπο. Τα αλληλόμορφο CYP2A6*4 έχει ελαττωματική λειτουργία και ευθύνεται για την αυξημένη συχνότητα (15-20%) των πτωχών μεταβολιστών μεταξύ των Ασιατών. Το αλληλόμορφο αυτό, όμως, απαντάται με συχνότητα 1% στους Καυκάσιους. Το αλληλόμορφο CYP2A6*2 κωδικοποιεί για ένα ένζυμο το οποίο είναι ανενεργό καθώς δεν μπορεί να ενσωματώσει τον δακτύλιο της αίμης. Η συχνότητα του αλληλομόρφου αυτού είναι 1-3% στους Καυκάσιους (Oscarson, 2001; Raunio and Rahnasto-Rilla, 2012). Έχει παρατηρηθεί μεγάλη ποικιλότητα στο φαινότυπο του CYP2A6 σε Καυκάσιους πληθυσμούς, όπως αυτός έχει προσδιοριστεί με τη μέτρηση των μεταβολιτών της κουμαρίνης, ενός φαρμάκου-δείκτη ειδικού για το CYP2A6, στα ούρα (Pelkonen et al., 2000). Η ποικιλότητα αυτή δεν ανταποκρίνεται επαρκώς στους πολυμορφισμούς του γονιδίου που έχουν ταυτοποιηθεί μέχρι σήμερα με συνέπεια η μέτρηση του φαινοτύπου να παραμένει σημαντικός παράγοντας για την εκτίμηση της δραστηριότητας του CYP2A6 (Nowell et al., 2002).

1.3. Οξειδάση της ξανθίνης

Η οξειδάση της ξανθίνης (XO) είναι ένα διαλυτό κυτταροπλασματικό ένζυμο το οποίο είναι υπεύθυνο για τον καταβολισμό των πουρινών καθώς καταλύει την υδροξυλίωση της υποξανθίνης προς ξανθίνη και της ξανθίνης προς ουρικό οξύ (Harrison, 2002). Εκτός από τις ανωτέρω αντιδράσεις, η XO συμμετέχει και στον μεταβολισμό φαρμάκων όπως η μερκαπτοπουρίνη, η αζαθειοπρίνη και οι μεθυλοξανθίνες (Guercioli et al., 1991).

Στα θηλαστικά, η XO συνυπάρχει με την δεϋδρογονάση της ξανθίνης (XDH) και μαζί αποτελούν τις δύο αλληλομετατρεπόμενες μορφές της οξειδοαναγωγής της ξανθίνης

(XOR). Στον άνθρωπο, το γονίδιο της XDH κωδικοποιεί ένα πολυπεπτίδιο αποτελούμενο από 1.333 αμινοξέα. Η XDH μπορεί μετα-μεταφραστικά, με οξείδωση ή πρωτεόλυση, να μετατραπεί, αντιστρεπτά ή μη αντιστρεπτά αντίστοιχα, προς XO (Levartovsky et al., 2000). Είναι φλαβοπρωτεΐνη με μολυβδένιο και σίδηρο στο ενεργό της κέντρο (Stryer, 1997) και μέγιστη δραστικότητα στο ήπαρ και στο έντερο, ενώ αφθονεί και στο αγγειακό ενδοθήλιο (Kooij A et al., 1992; Aranda et al., 2007). Η λειτουργικότητά της έχει εύρος 2-4 φορές στους ενήλικες χωρίς να είναι πολυμορφικό ένζυμο, γεγονός που ερμηνεύεται από τη συμμετοχή της XO σε αντιδράσεις καταβολισμού βασικών, για τον οργανισμό, ενδογενών ενώσεων. Πλήρης έλλειψη ενεργότητας εμφανίζεται στη σπάνια κληρονομική νόσο ξανθινουρία (Guercioli et al., 1991).

1.4. N-ακετυλοτρανσφεράση-2

Η N-ακετυλοτρανσφεράση-2 (NAT2) είναι ένα κυτταροπλασματικό ένζυμο το οποίο απαντάται στο ήπαρ και στην βλεννογόνο της νήστιδας και διακρίνεται από την NAT1 η οποία εκφράζεται σε όλους τους ιστούς. Η πρωτεϊνική αλληλουχία των δύο αυτών ενζύμων είναι ταυτόσημη κατά 81% (Atmane et al., 2003), τα γονίδιά τους, στον άνθρωπο, εντοπίζονται στο χρωμόσωμα 8 και έχουν μία κωδικοποιούσα περιοχή 870 ζευγών βάσεων χωρίς ιντρόνια (Boukounala and Sim, 2005). Μετέχουν, και τα δύο, στις αντιδράσεις της φάσης II του μεταβολισμού των φαρμάκων (σύζευξη) και καταλύουν την μεταφορά μιας ακετυλομάδας, προερχομένης από το ακετυλοσυνένζυμο-A, σε ένα άτομο αζώτου σε υποστρώματα όπως οι αρωματικές αμίνες και οι ετεροκυκλικές αμίνες και σε ένα άτομο οξυγόνου σε υποστρώματα όπως οι αρυλδροξυλαμίνες. Πιστεύεται ότι η N-ακετυλίωση αδρανοποιεί τις ενώσεις, συμβάλλοντας στην αποτοξίνωση, ενώ η O-ακετυλίωση τις ενεργοποιεί προς μεταβολίτες οι οποίοι μπορούν να επιδράσουν στο DNA και να πυροδοτήσουν την καρκινογένεση (Mitchell and Warshawsky, 2003). Η NAT2 ακετυλιώνει περισσότερα από 25 φάρμακα μερικά εκ των οποίων είναι η ισονιαζίδη (αντιφυματικό), η υδραλαζίνη (αντιυπερτασικό), η προκαϊναμίδη (αντιαρρυθμικό), η δαψόνη (αντιλεπρικό), οι σουλφοναμίδες (αντιμικροβιακό), η κλοναζεπάμη (αντιεπιληπτικό), η διπυρόνη (αντιφλεγμονώδες) και η καφεΐνη (Evans, 1989). Γενικώς, η NAT2 θεωρείται ως ένα ένζυμο μεταβολισμού των ξενοβιοτικών, ενώ η NAT1 φαίνεται να παίζει ρόλο και στο μεταβολισμό ενδογενών ενώσεων όπως είναι το φολικό οξύ (Boukounala and Sim, 2005).

Η NAT2 είναι πολυμορφικό ένζυμο και παρουσιάζει φυλετική ποικιλομορφία (Okumura et al., 1997; Gross et al., 1999) η οποία οφείλεται περισσότερο σε γενετικούς και λιγότερο σε περιβαλλοντικούς παράγοντες (Dupret and Rodrigues-Lima, 2005). Έχουν ταυτοποιηθεί 107 αλληλόμορφα της NAT2 τα οποία προκύπτουν από τον συνδυασμό 43 σημειακών μεταλλάξεων. Οι πολυμορφισμοί αυτοί εκφράζονται φαινοτυπικά με τους φαινότυπους του βραδέος, του ταχέος και πιθανώς του ενδιάμεσου μεταβολιστή (Rodriguez-Lima et al., 2008; Sim et al., 2012; http://nat.mbg.duth.gr/Human%20NAT2%20alleles_2013.htm#_Footnotes, last updated 18/4/2016; Προσπελάστηκε την 11/6/2016).

Η κλινική σημασία του πολυμορφισμού της ακετυλίωσης έχει διερευνηθεί επαρκώς. Η χορήγηση φαρμάκων των οποίων η κάθαρση εξαρτάται, σε μεγάλο βαθμό, από την ακετυλίωση μπορεί να προκαλέσει, σε βραδείς ακετυλιωτές, ανεπιθύμητες ενέργειες όπως υπόταση στην περίπτωση της υδραλαζίνης, περιφερική νευροπάθεια και ηπατοτοξικότητα στην περίπτωση της ισονιαζίδης, και συστηματικό ερυθματώδη λύκο στις περιπτώσεις της ισονιαζίδης, της προκαϊναμίδης και της υδραλαζίνης (Evans, 1989).

Επιδημιολογικά, ο φαινότυπος και ο γονότυπος του βραδέος ακετυλιωτή απαντάται με αυξημένη συχνότητα σε ασθενείς με καρκίνο της ουροδόχου κύστης, ειδικά στους καπνιστές και σ' αυτούς που εκτίθενται επαγγελματικά σε καρκινογενείς αρωματικές αμίνες (Yuan et al., 2008). Ο φαινότυπος και ο γονότυπος του ταχέος ακετυλιωτή απαντάται με αυξημένη συχνότητα σε ασθενείς με καρκίνο και αδένωμα του παχέος εντέρου και ειδικότερα σ' αυτούς που καταναλώνουν κρέας παρασκευασμένο σε υψηλές θερμοκρασίες, πιθανώς λόγω της υψηλότερης έκθεσης σε καρκινογόνα ετεροκυκλικών αμινών (Hein, 2000; Voutsinas et al., 2013).

1.5. UGT

Οι ουριδινο-5'-δισφωσφο-γλυκουρονυλτρανφεράσες (UDP-UGTs) συνιστούν υπεροικογένεια ηπατικών μικροσωματικών ενζύμων και είναι υπεύθυνες για την κατάλυση της σύζευξης του D-γλυκουρονικού οξέος με ένα μεγάλο εύρος ενδο- και ξενοβιοτικών περιλαμβανομένων και πολλών φαρμάκων. Η σύζευξη με το ουριδινο-δισφωσφογλυκουρονικό οξύ (UDPGA) μπορεί να γίνει σε υδροξυλομάδα, καρβοξυλομάδα και αμινοομάδα του υποστρώματος και οι μεταβολίτες που προκύπτουν αποκτούν αυξημένη διαλυτότητα στο νερό, σε σχέση με το υπόστρωμα. Ως αποτέλεσμα, οι μεταβολίτες εκκρίνονται ευκολότερα από την χολή και τα νεφρά. Ενώ η γλυκουρονιδίωση

έχει ως αποτέλεσμα, συνήθως, το πέρας της φαρμακολογικής δράσης ενός φαρμάκου η γλυκουρονιδίωση μπορεί, επίσης, να αποτελεί στάδιο μεταβολικής ενεργοποίησης μιας ουσίας. Ειδικότερα, αναφέρεται ότι το 6-γλυκουρονίδιο της μορφίνης είναι πολύ πιο ισχυρό αναλγητικό από την μορφίνη την ίδια όταν μεταφέρεται απευθείας στο κεντρικό νευρικό σύστημα (Fisher et al., 2000). Η υπερικογένεια των UGT στον άνθρωπο περιλαμβάνει 32 γονίδια και ψευδογονίδια τα οποία έχουν ομαδοποιηθεί στις κατηγορίες UGT1A, UGT2A, UGT2B, UGT3A και UGT8 (<http://www.genenames.org/cgi-bin/genefamilies/set/363>, προσπελάστηκε 11/7/2016). Οι ισομορφές οι υπεύθυνες για τον μεταβολισμό των ξενοβιοτικών είναι, πρωτίστως, οι UGT1A και 2B οι οποίες εντοπίζονται, κυρίως, στο ήπαρ. Διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι η γλυκουρονιδίωση μέσω UGT παίζει κρίσιμο ρόλο στην αποτοξίνωση από τις καρκινογενείς ετεροκυκλικές αμίνες οι οποίες περιέχονται σε κρέατα που έχουν μαγειρευτεί σε υψηλές θερμοκρασίες καθώς και άλλων ξενοβιοτικών (Stillwell et al., 1999; Burchell et al., 2005).

UGT1A1

Το ένζυμο UGT1A1 έχει μελετηθεί εκτενώς εξαιτίας της γενετικής του ποικιλομορφίας και της σπουδαιότητας που έχει στον μεταβολισμό της χολερυθρίνης. Η γενετική ανεπάρκεια της UGT1A1 μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την υπερχολερυθριναιμία, και την εγκεφαλοπάθεια (kernicterus). Το σύνδρομο Gilbert είναι η ήπια υπερχολερυθριναιμία η οποία προέρχεται από μία μετάλλαξη στην περιοχή του υποκινητή (promoter) του γονιδίου της UGT1A1 (Marshall, 1998; Fisher et al., 2000). Η UGT1A1 φαίνεται ότι έχει την μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα, μεταξύ άλλων ισομορφών, στην γλυκουρονιδίωση της ετεροκυκλικής αμίνης του καλοψημμένου κρέατος PhIP (2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine) (Malfatti and Felton, 2001).

UGT1A6

Η UGT1A6 παίζει σημαντικό ρόλο στην γλυκουρονιδίωση επίπεδων και μικρών αρωματικών μορίων συμπεριλαμβανομένων φαρμάκων, όπως η ακεταμινοφαίνη, και εν δυνάμει καρκινογόνων ενώσεων που σχετίζονται χημικά με τους υδροξυλιωμένους πολυκυκλικούς υδρογονάνθρακες. Επιπλέον, αναφέρεται ότι η σεροτονίνη είναι ένα ενδογενές υπόστρωμα για την UGT1A6 (King et al., 1999; Bock and Kohle, 2005). Έχειδειχθεί ότι η UGT1A6, μεταξύ άλλων ισομορφών, είναι περισσότερο ενεργή στην

αποτοξίνωση από τον πολυκυκλικό αρωματικό υδρογονάνθρακα βενζο(α)πυρένιο (Mackenzie et al., 1993).

1.6 Επίδραση φυσικών προϊόντων και φλαβονοειδών στα ένζυμα του μεταβολισμού των ξενοβιοτικών

Έχουν διεξαχθεί διάφορες *in vivo* μελέτες σε ανθρώπους και πειραματόζωα οι οποίες έχουν διερευνήσει την επίδραση διαφόρων φυσικών προϊόντων ή φλαβονοειδών δραστικών ουσιών οι οποίες προέρχονται από φυσικά προϊόντα στα ένζυμα του μεταβολισμού των ξενοβιοτικών. Ενδεικτικά, όσον αφορά αυτούσια φυσικά προϊόντα έχει μελετηθεί η επίδραση της νεραντζιάς (*citrus aurantium*), της πορφυρής εχινάκειας (*echinacea purpurea*), του γαϊδουράγκαθου (*milk thistle*) και του σάο παλμέντο (*saw palmetto*) σε ένζυμα του συστήματος P450 σε ανθρώπους (Gurley et al., 2004), βοτανικών εκχυλισμάτων μέντας (*peppermint*), χαμομηλιού (*chamomile*) και τaráξακου (*dandelion*) σε ένζυμα τις φάσης I και φάσης II του μεταβολισμού σε αρουραίους (Maliakal and Wanwimorluk 2001), της επίδρασης υδατικού διαλύματος δενδρολίβανου (*rosemary*) σε ένζυμα της φάσης I και φάσης II του μεταβολισμού σε αρουραίους (Debresac et al., 2001), του σπαθόχορτου (*St John's wort- Hypericum perforatum*) σε ένζυμα του συστήματος P450 και της NAT2 σε ανθρώπους (Wenk et al., 2004), της επίδρασης του χυμού γκρέιπ φρουτ στο CYP1A2 σε ανθρώπους (Fuhr et al., 1993) και της επίδρασης των σταυρανθών (*brassica cruciferae*) και σελινοειδών (*ariaceus*) λαχανικών στο CYP1A2, NAT2 και στην XO σε ανθρώπους (Lampe et al., 2000).

Όσον αφορά τις δραστικές ουσίες της οικογένειας των φλαβονοειδών έχει μελετηθεί στον άνθρωπο η επίδραση της κουερσετίνης στα ένζυμα CYP1A2, CYP2A6, NAT2 και XO (Chen et al., 2009; Xiao et al., 2014), της επίδρασης της πουεραρίνης στο ένζυμο CYP1A2 (Zheng et al., 2010) και της επίδρασης της γενιστεΐνης στα ένζυμα CYP1A2, CYP2A6, NAT2 και XO (Chen et al., 2011) και της επίδρασης της κουρκουμίνης και της πιπερίνης στα ένζυμα CYP3A, CYP2C9, UGT και SULT (Volak et al., 2013). Σχετικά με την μέντα, ειδικότερα, έχει διεξαχθεί μια μελέτη σε καπνιστές κατά την οποία διερευνήθηκε η επίδραση του αφεψήματος μέντας στον μεταβολισμό της νικοτίνης η οποία μεταβολίζεται από το CYP2A6 (Ghazi et al., 2011), ενώ δεν έχουν διεξαχθεί άλλες εργασίες στις οποίες να έχει διερευνηθεί η επίδραση του αφεψήματος σε άλλα ένζυμα του μεταβολισμού. Δεδομένης της έλλειψης

αλλά και του αποσπασματικού χαρακτήρα των σχετικών εργασιών, στην παρούσα εργασία έγινε προσπάθεια να διερευνηθεί η *in vivo* δραστικότητα των ενζύμων CYP1A2, CYP2A6, NAT2, XO και των ενζύμων UGT1A1/1A6 μετά από κατανάλωση αφεψήματος μέντας από υγιείς εθελοντές. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν η καφεΐνη και η παρακεταμόλη ως φάρμακα-δείκτες (probe-drugs) της ενζυμικής δραστικότητας.

Η καφεΐνη (1,3,7-τριμεθυλοξανθίνη, 137MX) έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως ως φάρμακο-δείκτης για τον *in vivo* προσδιορισμό της δραστικότητας του CYP1A2, του CYP2A6, της XO και της NAT2 σε διάφορα βιολογικά υγρά, όπως το πλάσμα, τα ούρα και ο σίελος (Ghotbi et al., 2007; Begas et al., 2007; Perera et al., 2010; Djordjevic et al., 2010; Djordjevic et al., 2012; Begas et al., 2015). Αυτό οφείλεται στην ασφάλεια που παρέχει η χρήση της στις συνήθεις δόσεις και στα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του μεταβολισμού της στον άνθρωπο. *In vivo* (Carrillo et al., 2000) και *in vitro* (Gu et al., 1992; Kot and Daniel, 2008) μελέτες έδειξαν ότι η καφεΐνη αποβάλλεται, κυρίως, μέσω N-3 απομεθυλίωσης προς 1,7-διμεθυλοξανθίνη (17MX, παραξανθίνη; Σχήμα 2). Όταν λαμβάνονται υπόψη μόνον οι μεταβολικές οδοί της απομεθυλίωσης, τότε η παραπάνω αντίδραση ευθύνεται για το 83% της πρωτογενούς απομεθυλίωσης της καφεΐνης. Η N-1 απομεθυλίωση, με προϊόν την 3,7-διμεθυλοξανθίνη (37MX, θεοβρωμίνη) και η N-7 απομεθυλίωση με προϊόν την 1,3-διμεθυλοξανθίνη (13MX, θεοφυλλίνη), ευθύνονται για το 11-12% και 4-5%, αντίστοιχα, των τριών πρωτογενών απομεθυλίσεων της καφεΐνης (Arnaud, 2011). Η ηπατική N-3 απομεθυλίωση της καφεΐνης καταλύεται, σχεδόν αποκλειστικά, από το CYP1A2 (Kot and Daniel, 2008). Επιπρόσθετα, το CYP1A2 συμμετέχει τόσο στις N-1 όσο και N-7 απομεθυλίώσεις. Κατ' αυτόν τον τρόπο, το CYP1A2 ευθύνεται για περισσότερο από το 95% του πρωτογενούς μεταβολισμού της καφεΐνης. Ένα μικρό ποσοστό των N-1 και N-7 απομεθυλίσεων δεν μπορεί να αποδοθεί στην δραστικότητα του CYP1A2 και αποδίδεται στην καταλυτική δράση των κυτοχρωμάτων CYP2E1, CYP2C8/9 και CYP3A4 (Gu et al., 1992; Kot et al., 2008).

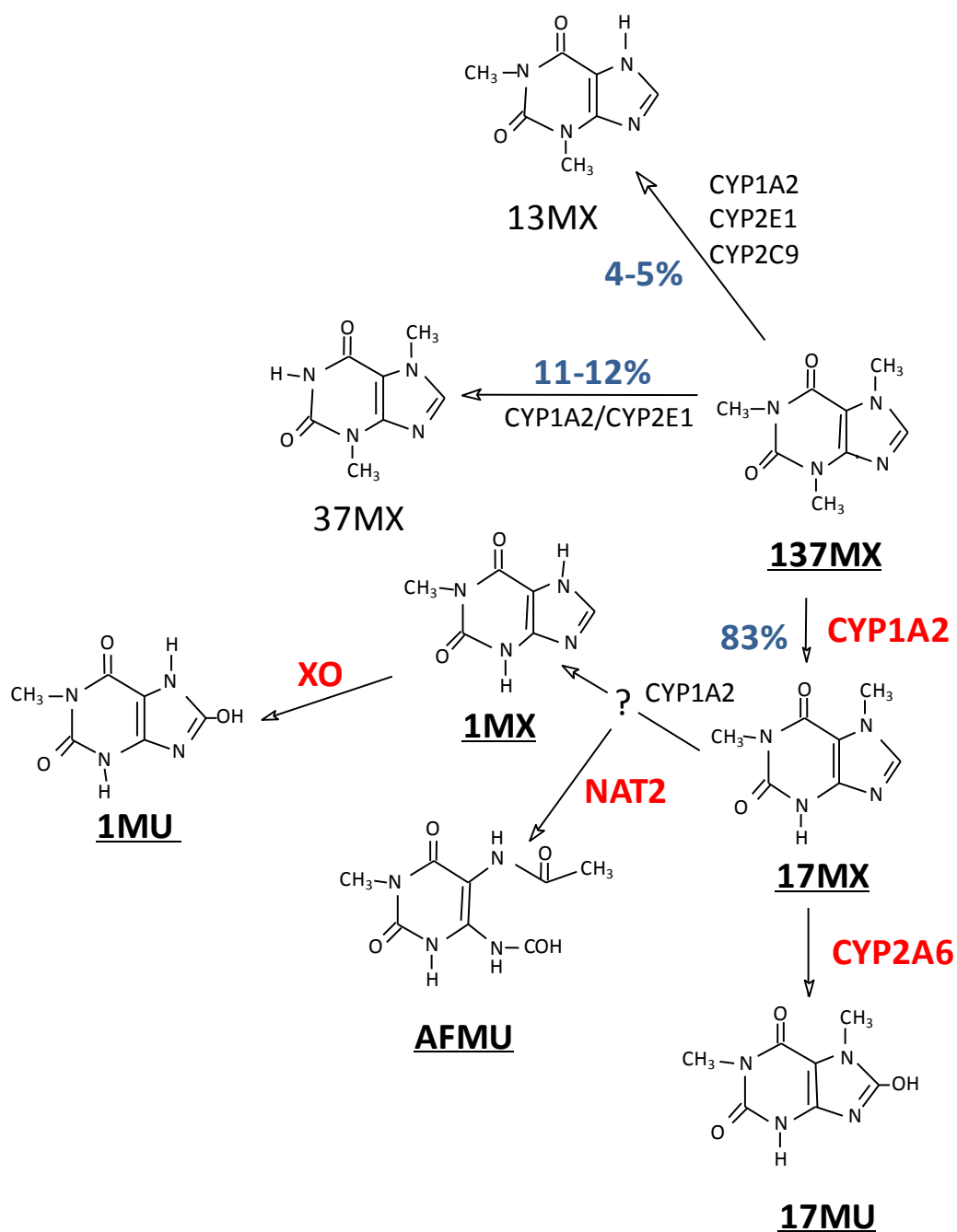
Η 17MX, στην συνέχεια, υδροξυλιώνεται προς 1,7-διμεθυλουρικό οξύ (17MU) από το CYP2A6 και από το CYP1A2 (Arnaud, 2011) και απομεθυλιώνεται προς 1-μεθυλοξανθίνη (1MX) από το CYP1A2. Έτσι, η 17MX είναι τόσο προϊόν όσο και υπόστρωμα για το ένζυμο. Η περαιτέρω διάσπαση της 1MX περιλαμβάνει την 8-υδροξυλίωσή της προς 1-μεθυλουρικό οξύ (1MU) από την οξειδάση της ξανθίνης (XO) με την συμμετοχή του CYP1A2 (Grant et al., 1986). Η 7-απομεθυλίωση της 17X συνεχίζεται μέσω του σχηματισμού ενός ασταθούς ενδιάμεσου με ανοιχτό δακτύλιο το οποίο είτε σταθεροποιείται, με ακετυλίωση, ως AFMU,

είτε σταθεροποιείται με εσωτερική επαναδιάταξη που οδηγεί προς 1X. Η ακετυλίωση αυτή συμβαίνει από το πολυμορφικό ένζυμο NAT2 (Tang et al., 1983; Lelo et al., 1989, Σχήμα 2).

Με βάση τον μεταβολισμό της καφεΐνης, έχουν προταθεί διάφοροι μεταβολικοί λόγοι (κλάσματα) των συγκεντρώσεων των μεταβολιτών, σε διάφορα βιολογικά υγρά, οι οποίοι αντανakλούν την δραστικότητα των ενζύμων που εμπλέκονται στον πρωτογενή και δευτερογενή μεταβολισμό της. Όσον αφορά το πλάσμα και τον σίελο, ο μεταβολικός λόγος 17MX/137MX αντιπροσωπεύει την δραστικότητα του CYP1A2 (Fuhr and Rost, 1994). Όσον αφορά τα ούρα, οι παρακάτω μεταβολικοί λόγοι έχουν προταθεί ως οι πλέον έγκυροι για την αποτύπωση της δραστικότητας των αντίστοιχων ενζύμων και χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία:

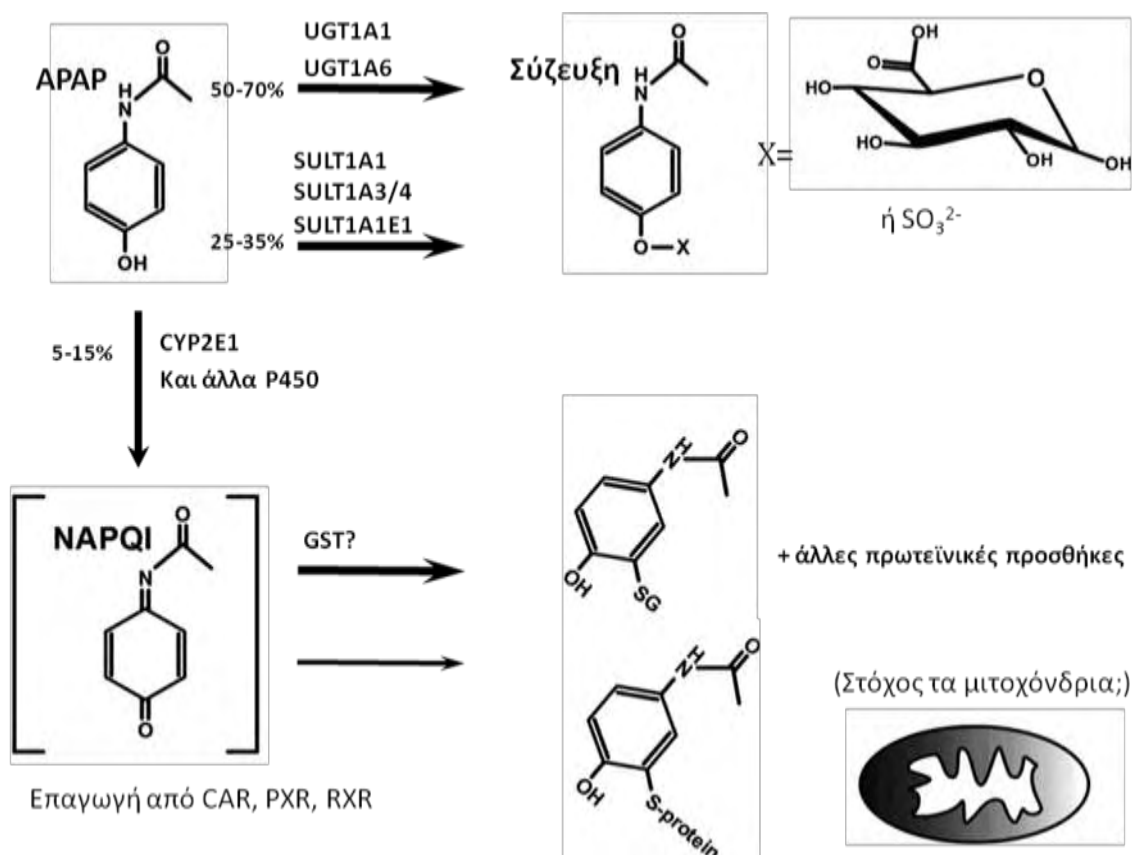
- α) $(AFMU+1MU+1MX)/17MU$ για το CYP1A2 (Campbell et al., 1987)
- β) $1MU/(1MU+1MX)$ για την XO (Carrillo and Benitez, 1994)
- γ) $17MU/17MX$ για το CYP2A6 (Nowell et al., 2002)
- δ) $AFMU/(AFMU+1MU+1MX)$ για την NAT2 (Rostami-Hodjegan et al., 1996)

Ένα άλλο, ευρέως διαδεδομένο αναλγητικό και αντιπυρετικό, φάρμακο έχει την δυνατότητα να χρησιμοποιηθεί ως φάρμακο-δείκτης για την διερεύνηση της δραστικότητας των ενζύμων UGT1A1/1A6. Συγκεκριμένα, έχει δειχθεί ότι η παρακεταμόλη (ακεταμινοφαίνη) αποβάλλεται στα ούρα ως μερκαπτουρικό οξύ ή σε σύζευξη με κυστεΐνη σε ποσοστό 5-15%. Η αποβολή αυτή οφείλεται στην μετατροπή της ακεταμινοφαΐνης σε έναν δραστικό ενδιάμεσο μεταβολίτη ο οποίος μπορεί να προσδεθεί στην γλουταθειόνη. Η μεταβολική αυτή ενεργοποίηση της ακεταμινοφαΐνης οφείλεται σε ένζυμα του συστήματος P450. Σε ένα μεγαλύτερο ποσοστό, της τάξης του 25-35%, αποβάλλεται στα ούρα μέσω σύζευξης μεθειϊκή ομάδα η οποία καταλύεται από τα ένζυμα σουλφονυλτρανφεράσες.



Σχήμα 2: Μεταβολικές οδοί της καφεΐνης στον άνθρωπο και τα ένζυμα που συμμετέχουν (Kot and Daniel, 2008; Arnaud, 2011).

Τέλος, το μεγαλύτερο ποσοστό της ακεταμινοφαίνης, της τάξης του 50-70%, αποβάλλεται στα ούρα μέσω σύζευξης με γλυκουρονικό η οποία καταλύεται από τα ένζυμα UGT1A1 και 1A6 (McGill and Jaeschke, 2013, Σχήμα 3). Με βάση την αντίδραση γλυκουρονιδίωσης, η δραστικότητα των ενζύμων UGT1A1/1A6 μπορεί να προσδιοριστεί από το ποσοστό της συζευγμένης με γλυκουρονικό παρακεταμόλης στα ούρα ατόμου που έχει λάβει παρακεταμόλη. Πράγματι, η παρακεταμόλη έχει χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν ως φάρμακο-δείκτης για τον *in vivo* προσδιορισμό της δραστικότητας των UGT (Bock et al., 1994).



Σχήμα 3: Μεταβολισμός της ακεταμινοφαίνης (APAP). Το μεγαλύτερο ποσοστό του φαρμάκου γλυκουρονιδιώνεται ή δέχεται σύζευξη μεθειϊκό από τις UDP-UGTs και τις SULTs. Ένα μικρό ποσοστό μετατρέπεται σε έναν ενεργό μεταβολίτη (NAPQI) από τα κυτοχρώματα P450. Η αποτοξίνωση από τον μεταβολίτη μπορεί να γίνει μέσω σύζευξης με γλουταθειόνη (GSH). Εναλλακτικά, ο μεταβολίτης μπορεί να αντιδράσει μεθειόλες άλλων πρωτεϊνών (McGill and Jaeschke, 2013).

1.7 Σκοπός

Δεδομένης της έλλειψης αλλά και του αποσπασματικού χαρακτήρα των εργασιών που υπάρχουν στην βιβλιογραφία σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η διερεύνηση της *in vivo* δραστηριότητας των ενζύμων CYP1A2, CYP2A6, NAT2, XO και των ενζύμων UGT1A1/1A6 μετά από κατανάλωση αφεψήματος μέντας από υγιείς εθελοντές.

Στην παρούσα εργασία η καφεΐνη και η παρακεταμόλη χρησιμοποιήθηκαν ως φάρμακα-δείκτες (probe-drugs) καθώς προσφέρουν αξιοπιστία και μπορούν να χορηγηθούν με ασφάλεια σε υγιείς εθελοντές. Επιπλέον, στην παρούσα εργασία, ο προσδιορισμός της δραστηριότητας των υπό εξέταση ενζύμων έγινε με βάση την παρουσία των φαρμάκων-δεικτών και των μεταβολιτών τους στα ούρα και τον σίελο καθιστώντας την όλη διαδικασία ανώδυνη και τελείως μη επεμβατική.

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1. Εθελοντές και πειραματικό πρωτόκολλο

Στη μελέτη συμπεριλήφθησαν 9 εθελοντές οι οποίοι κρίθηκαν υγιείς με βάση το ατομικό τους ιστορικό και πρόσφατες αιματολογικές και βιοχημικές εξετάσεις. Τα δημογραφικά στοιχεία των εθελοντών παρουσιάζονται στον Πίνακα 2. Οι εθελοντές έπρεπε να απέχουν από τη λήψη φαρμάκων για τουλάχιστον επτά (7) ημέρες αλλά και κατά τη διάρκεια του πρωτοκόλλου. Σε περίπτωση υποχρεωτικής λήψης φαρμάκων δεν θα έπρεπε να περιλαμβάνονται οι εξής δραστικές ουσίες: Παρακεταμόλη, Ομεπραζόλη, Φαινυτοΐνη, Ριφαμπικίνη, Φλουφοξαμίνη, Μεξιλετίνη, Βεραπαμίλη, Φουραφυλίνη, Ψωραλένιο, Κινολόνες, Σιμετιδίνη, Κενοκοναζόλη, Τερβιναφίνη, Μικοναζόλη, Αλλοπουρινόλη. Οι γυναίκες εθελόντριες έπρεπε να ακολουθήσουν το πρωτόκολλο στην αρχή του κύκλου μετά την έμμηνο ρύση. Συμπληρώθηκε ερωτηματολόγιο όπου αναγράφονταν τα βασικά χαρακτηριστικά τους (ηλικία, βάρος, ύψος, χρήση φαρμακευτικών σκευασμάτων) συνήθειες και τρόπος ζωής (κάπνισμα, κατανάλωση αλκοόλ, επάγγελμα, έκθεση σε χημικές ουσίες). Η συλλογή των δειγμάτων ούρων και σιέλου έγινε μετά από ενημέρωση και προφορική συγκατάθεση των ατόμων σύμφωνα με το παρακάτω πρωτόκολλο:

1. Τρεις μέρες αποχή από τροφές που επάγουν ή αναστέλλουν την δραστικότητα του CYP1A2 (λάχανο, κουνουπίδι, μήλο, κρεμμύδι, κεράσια, μπρόκολο, γκρέϊπ-φρουτ, κρέας ψητό και τηγανητό, ροφήματα από τσάι, χαμομήλι και διάφορα βότανα, μπαχαρικά και αλκοόλ). Επίσης, ζητήθηκε από τους εθελοντές να διατηρείται μια σταθερή δίαιτα κατά τη διάρκεια του πρωτοκόλλου. Οι εθελοντές απείχαν από κάθε τροφή και ποτό που περιέχουν μεθυλοξανθίνες για τουλάχιστον 12 ώρες πριν από τη δοκιμασία και κατά τη διάρκεια της ημέρας της δοκιμασίας.

2. Την τέταρτη ημέρα, το πρωί, οι εθελοντές άδειασαν τη κύστη τους και στη συνέχεια κατανάλωσαν μια κούπα (~250 ml) ψημένου και αλεσμένου ή στιγμιαίου καφέ (μέση περιεκτικότητα σε καφεΐνη ~118 mg και ~106 mg, αντίστοιχα, Barone and Roberts, 1984) και συνέχισαν την αποχή από όλα τα παραπάνω για τις επόμενες 6 ώρες.

3. Στο χρονικό σημείο των 6 ωρών μετά τη λήψη του καφέ οι εθελοντές συνέλεξαν ένα μεμονωμένο δείγμα ούρων και σιέλου σε πλαστικούς ουροσυλλέκτες. Αμέσως μετά την λήψη των ούρων έγινε ρύθμιση του pH στην τιμή 3,5 περίπου με την προσθήκη διαλύματος

HCl 6N, με σκοπό να μην διασπαστεί το AFMU (Wong et al., 2002). Δείγματα του 1 ml αποθηκεύτηκαν στους -20°C μέχρι την περαιτέρω επεξεργασία τους.

4. Αμέσως μετά τη συλλογή των δειγμάτων σιέλου και ούρων οι εθελοντές κατανάλωσαν 500mg παρακεταμόλης (Deron Αναβράζοντα Δισκία, Bristol-Myers Squibb) και συνέλεξαν μεμονωμένο δείγμα ούρων μια ώρα αργότερα. Το δείγμα αποθηκεύτηκε στους -20°C μέχρι την περαιτέρω επεξεργασία του.

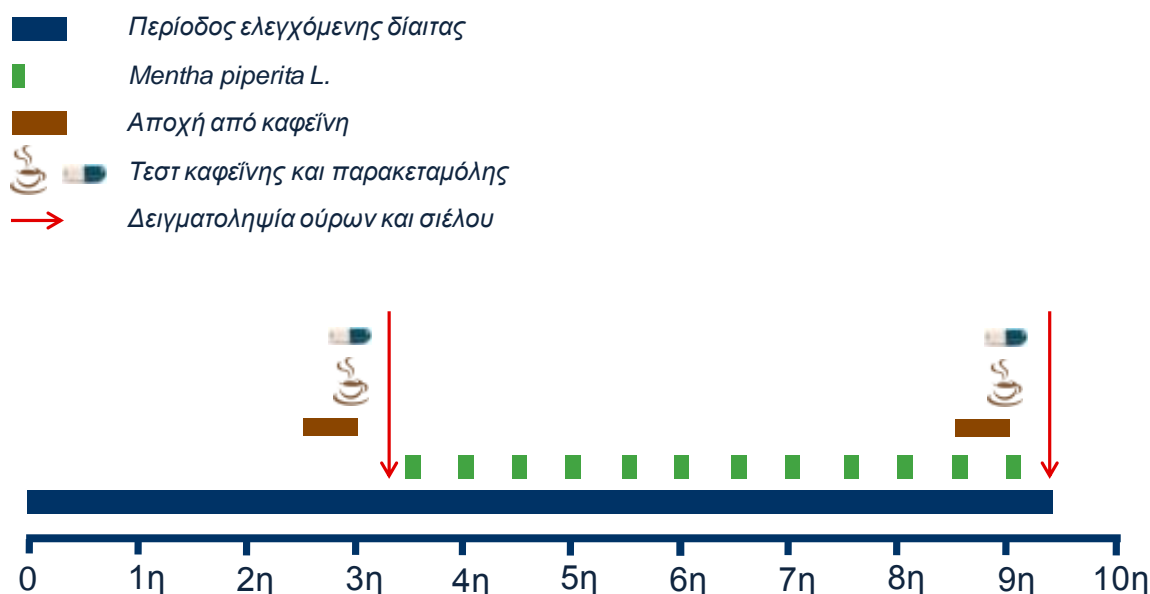
5. Το βράδυ της τέταρτης ημέρας παρασκευάστηκε και καταναλώθηκε αφέψημα μέντας με βρασμό 2 g μέντας (*mentha piperita*) σε 250 ml νερού, περίπου, για ~2'-3' και σε ηρεμία για 5'. Η λήψη του αφεψήματος συνεχίστηκε πρωί και βράδυ έως και το πρωί της δέκατης ημέρας.

6. Το πρωί της δέκατης ημέρας, οι εθελοντές άδειασαν τη κύστη τους και στη συνέχεια κατανάλωσαν μια κούπα αφεψήματος μέντας και μια κούπα καφέ. Τέλος ακολούθησαν τα βήματα (3) και (4) για τη τελική λήψη δειγμάτων (Σχήμα 4).

Κατά την παραλαβή τους τα δείγματα ούρων και σιέλου αριθμήθηκαν με ένα κωδικό αριθμό και αναλύθηκαν χωρίς να είναι γνωστά τα στοιχεία του εθελοντή.

Πίνακας 2: Δημογραφικά στοιχεία των εθελοντών.

Κωδικός	Φύλο	Ηλικία	Βάρος (kg)	Ύψος (m)	BMI	Κάπνισμα
1	Γ	26	56	1,69	19,6	ΟΧΙ
2	Α	54	105	1,85	30,6	ΟΧΙ
3	Γ	48	70	1,68	24,8	ΟΧΙ
4	Γ	42	75	1,70	25,9	ΟΧΙ
5	Α	54	80	1,78	25,2	ΟΧΙ
6	Γ	23	59	1,63	22,2	ΟΧΙ
7	Γ	23	55	1,63	20,7	ΝΑΙ
8	Α	23	85	1,70	29,4	ΟΧΙ
9	Α	26	70	1,85	20,4	ΟΧΙ
ΜΤ±Τ.Α.		35,4±13,8	77,8±16,0	1,72±0,08	24,3±3,9	



Σχήμα 4: Σχηματική αναπαράσταση του 10ήμερου πρωτοκόλλου λήψης του αφεψήματος της μέντας.

2.2. Αναλυτική μέθοδος

Αντιδραστήρια και χημικές ουσίες

Η μέντα η οποία χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία (*Mentha x Piperita* L.) ήταν υπό τη μορφή αποξηραμένων φύλλων, η προμήθειά της έγινε από την τοπική αγορά της Λάρισας και προέρχονταν από περιοχές της Κρήτης.

Η προμήθεια των προτύπων μεταβολιτών της καφεΐνης (137MX), 17MX, 1MU, 17MU, 37MX και της 4-ακεταμιδοφαινόλης, η οποία χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικό πρότυπο, έγινε από τη Sigma (Γερμανία) και της καφεΐνης από τη Fluca (Buchs, Ελβετία). Η προμήθεια του μεταβολίτη 1MX έγινε από την εταιρία TCI (Βέλγιο), της ισοπροπανόλης από τη Fisher Scientific (M. Βρετανία), του ακετονιτρίλιου και της μεθανόλης από την εταιρία Chem-Lab (Βέλγιο), του οξικού οξέος (άνυδρο) από την εταιρία Merck (Γερμανία), του θειϊκού αμμωνίου και του χλωροφορμίου έγιναν από την εταιρία CARLO ERBA (Γαλλία) και του υδροχλωρικού οξέος ($\geq 37\%$) από την εταιρία Sigma-Aldrich (Γερμανία).

Το AFMU, καθαρότητας 98%, ήταν ευγενική χορηγία του κ.W.Pfleiderer (Πανεπιστήμιο Konstanz, Γερμανία). Το ακετονιτρίλιο και η μεθανόλη ήταν βαθμού καθαρότητας HPLC, ενώ το υδροχλωρικό οξύ, το οξικό οξύ, το χλωροφόρμιο και το θειϊκό αμμώνιο ήταν

αναλυτικού βαθμού καθαρότητας. Η προμήθεια του ενζύμου β-γλυκουρονιδάση έγινε από την εταιρεία Sigma. Το ένζυμο είναι ανασυνδυασμένο από υπερέκφραση σε στέλεχος *Escherichia coli* BL21 και δεν παρουσιάζει καθόλου δραστηριότητα σουλφατάσης. Σε όλα τα στάδια της ανάλυσης χρησιμοποιήθηκε υπερκαθαρό ύδωρ, αγωγιμότητας 0,055 $\mu\text{S}/\text{cm}$.

Συσκευές χρωματογραφίας

Οι συσκευές χρωματογραφίας που χρησιμοποιήθηκαν για τη χρωματογραφική ανάλυση της καφεΐνης και των μεταβολιτών της περιελάμβαναν: αντλία υψηλής πίεσης Marathon III (Rigas Labs, Θεσσαλονίκη), ανιχνευτή υπεριώδους/ορατού FASMA 500 με μεταβλητό μήκος κύματος (Rigas Labs, Θεσσαλονίκη) και βαλβίδα εισαγωγής δείγματος Rheodyne 7125 (Rheodyne, California, ΗΠΑ) στην οποία ήταν συνδεδεμένοι βρόχοι σταθερού όγκου 20 μL και 50 μL , κατά περίπτωση. Η ανάλυση έγινε με τη χρήση χρωματογραφικής στήλης Kromasil 100 C18, διαμέτρου σωματιδίων πλήρωσης 5 μm , μήκους 250 mm και εσωτερικής διαμέτρου 4,6 mm (Macherey-Nagel, Γερμανία). Η στήλη ήταν τοποθετημένη σε θερμοστατούμενο κλίβανο. Ο αέρας που περιέχονταν στην κινητή φάση απομακρυνόταν συνεχώς μέσω της εν σειρά χρήσης ενός ηλεκτρικού απαερωτή (ERC, Ιαπωνία). Η πρόσληψη και η ανάλυση των αναλογικών /ψηφιακών δεδομένων έγινε με τη χρήση του λογισμικού προγράμματος Chrom & Spec (Ampersand Ltd, Ρωσία).

Χρωματογραφικές συνθήκες

1. Χρωματογραφικές συνθήκες για την ανάλυση των μεταβολιτών καφεΐνης στα ούρα:

Η ανάλυση των μεταβολιτών καφεΐνης στα ούρα έγινε με τη μέθοδο που περιγράφεται από τον Begas et al. (2007). Συνοπτικά:

Η κινητή φάση αποτελούταν από μίγμα 0,1% οξικού οξέος/μεθανόλης/ακετονιτριλίου σε αναλογίες όγκων 92/4/5. Η κινητή φάση διοχετευόταν με ταχύτητα 0,7 mL/min για τα πρώτα 5' της ανάλυσης και στη συνέχεια με ταχύτητα 1,1 mL/min για τα υπόλοιπα 15'. Η ανίχνευση των μεταβολιτών έγινε σε μήκος κύματος 280 nm. Η χρωματογραφική στήλη ήταν θερμοστατούμενη στους 30° C.

2. Χρωματογραφικές συνθήκες για την ανάλυση της καφεΐνης και της 17MX στο σίελο:

Η ανάλυση των μεταβολιτών καφεΐνης και 17MX στο σίελο έγινε με τη μέθοδο που περιγράφεται από τον Begas et al. (2015). Συνοπτικά:

Η κινητή φάση αποτελούταν από μίγμα 0,1% οξικού οξέος/μεθανόλης/ακετονιτριλίου σε αναλογίες όγκων 80/20/2. Η κινητή φάση διοχετευόταν με ταχύτητα 1 mL/min. Η ανίχνευση των μεταβολιτών έγινε σε μήκος κύματος 273 nm. Η χρωματογραφική στήλη ήταν θερμοστατούμενη στους 30° C.

3. Χρωματογραφικές συνθήκες για την ανάλυση της παρακεταμόλης στα ούρα:

Η κινητή φάση για την ανάλυση της παρακεταμόλης στα ούρα αποτελούταν από μίγμα 0,1% οξικού οξέος/μεθανόλης/ακετονιτριλίου σε αναλογίες όγκων 92/4/5. Η κινητή φάση διοχετευόταν με ταχύτητα 1 mL/min. Η ανίχνευση των μεταβολιτών έγινε σε μήκος κύματος 280nm. Η χρωματογραφική στήλη ήταν θερμοστατούμενη στους 30° C.

Προετοιμασία πρότυπων διαλυμάτων

Για την παρασκευή των προτύπων διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκαν οι αντίστοιχες πρότυπες ουσίες οι οποίες ζυγίστηκαν σε αναλυτικό ζυγό Gibertini (Gibertini Elettronica s.r.l. – Μιλάνο, Ιταλία) ευαισθησίας 0,1 mg και κατόπιν διαλύθηκαν στην κατάλληλη ποσότητα διαλύτη.

1. Πρότυπα διαλύματα των μεταβολιτών της καφεΐνης στα ούρα:

Παρασκευάστηκε διάλυμα 17MX συγκέντρωσης 5 mM σε υπερκαθαρό νερό, ενώ τα διαλύματα των 17MU, 1MX και 1MU, ίδιας συγκέντρωσης, σε 5 mM NaOH. Τα διαλύματα του AFMU (5 mM) και του εσωτερικού προτύπου (4-ακεταμιδοφαινόλη, 10mM) παρασκευάστηκαν σε 0,1% οξικό οξύ. Όλα τα πυκνά διαλύματα αποθηκεύτηκαν στους -20°C. Στη συνέχεια παρασκευάστηκε μίγμα των ανωτέρω μεταβολιτών σε συγκέντρωση 800 μM το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την προετοιμασία των κατάλληλων προτύπων διαλυμάτων σε ούρα υγιούς ατόμου που συλλέχθηκε μετά από αποχή 4 ημερών από μεθυλοξανθίνες.

2. Πρότυπα διαλύματα της καφεΐνης και των μεταβολιτών της στο σίελο:

Παρασκευάστηκαν διαλύματα 5mM της καφεΐνης και της 17MX σε υπερκαθαρό νερό, ενώ διάλυμα ίδιας συγκέντρωσης 37MX παρασκευάστηκε σε 5 mM NaOH. Το διάλυμα του εσωτερικού προτύπου (4-ακεταμιδοφαινόλη) σε συγκέντρωση 66 μM παρασκευάστηκε σε υπερκαθαρό νερό. Στη συνέχεια παρασκευάστηκε μίγμα των ανωτέρω μεταβολιτών σε

συγκέντρωση 200 μM το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την προετοιμασία των κατάλληλων προτύπων διαλυμάτων σε σιέλο υγιούς ατόμου που συλλέχθηκε μετά από αποχή 4 ημερών από μεθυλοξανθίνες.

Επεξεργασία των δειγμάτων ούρων

Σε δείγμα 200 μL ούρων προστέθηκαν 250 mg θειϊκού αμμωνίου με σκοπό την κατακρήμνιση των πρωτεϊνών, 200 μL διαλύματος οξικού οξέος 0,1%, 20 μL διαλύματος εσωτερικού προτύπου (4-ακεταμιδοφαινόλη, 10mM) και το δείγμα αναδεύτηκε ισχυρά. Έπειτα, έγινε προσθήκη 6mL διαλύματος χλωροφορμίου/ισοπροπανόλης, σε αναλογία όγκων 85/15, και ακολούθησε ισχυρή ανάδευση για 60". Ακολούθησε φυγοκέντρηση του κάθε δείγματος για 2' στις 5000rpm με σκοπό την διάσπαση του δημιουργηθέντος γαλακτώματος, την κατακρήμνιση του ιζήματος και τον καλύτερο διαχωρισμό των δυο φάσεων. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ο διαχωρισμός υδατικής-οργανικής φάσης με τη χρήση διαχωριστικής χοάνης και εξάτμιση της οργανικής φάσης σε ήπιο ρεύμα N_2 στους 45°C. Το στερεό υπόλειμμα επαναδιαλύθηκε σε 200 μL κινητής φάσης (0,1% οξικό οξύ/μεθανόλη/ακετονιτρίλιο, 92/4/5 v/v), αναδεύθηκε ισχυρά για 15" και φυγοκεντρήθηκε για 2' στις 5000rpm. Τέλος, 20 μL του δείγματος αυτού εισήχθηκαν στη χρωματογραφική στήλη. Τα διαλύματα βαθμονόμησης και ποιοτικού ελέγχου παρασκευάστηκαν μετά από ανάμιξη 200 μL ούρων που δεν περιείχαν μεθυλοξανθίνες με 200 μL των προτύπων μιγμάτων των 5 μεταβολιτών στις κατάλληλες συγκεντρώσεις και επεξεργάστηκαν όπως ανωτέρω.

Επεξεργασία των δειγμάτων σιέλου

Τα δείγματα του σιέλου φυγοκεντρήθηκαν για 6' στις 5000 rpm. Στη συνέχεια λήφθηκαν 200 μL από το υπερκείμενο στα οποία προστέθηκαν 250 mg θειϊκού αμμωνίου με σκοπό την κατακρήμνιση των πρωτεϊνών. Κατόπιν προστέθηκαν 100 μL διαλύματος εσωτερικού προτύπου (4-ακεταμιδοφαινόλη, 66 μM) και το δείγμα αναδεύτηκε ισχυρά. Έπειτα, έγινε προσθήκη 4 mL διαλύματος χλωροφορμίου/ισοπροπανόλης, σε αναλογία όγκων 85/15, και ακολούθησε ισχυρή ανάδευση για 60". Ακολούθησε φυγοκέντρηση του κάθε δείγματος για 2' στις 5000 rpm. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ο διαχωρισμός υδατικής-οργανικής φάσης με τη χρήση διαχωριστικής χοάνης και εξάτμιση της οργανικής φάσης σε ήπιο ρεύμα N_2 στους 45°C. Το στερεό υπόλειμμα επαναδιαλύθηκε σε 200 μL κινητής φάσης (0,1% οξικό

οξύ/μεθανόλη/ακετονιτρίλιο, 80/20/2 v/v) αναδεύθηκε ισχυρά για 15" και φυγοκεντρήθηκε για 2' στις 5000 rpm. Τέλος, 50 μL του δείγματος αυτού εγχύθηκαν στη χρωματογραφική στήλη. Τα διαλύματα βαθμονόμησης και ποιοτικού ελέγχου παρασκευάστηκαν μετά από προσθήκη πυκνών διαλυμάτων των μεταβολιτών κατάλληλης συγκέντρωσης σε 200 μL σιέλου που δεν περιείχε μεθυλοξανθίνες και επεξεργάστηκαν όπως ανωτέρω.

Επεξεργασία των δειγμάτων ούρων για τον προσδιορισμό της ελεύθερης παρακεταμόλης

Σε δείγμα 200 μL ούρων, τα οποία συλλέχτηκαν 1 ώρα μετά την κατανάλωση της παρακεταμόλης, προστέθηκαν 250 mg θειϊκού αμμωνίου με σκοπό την κατακρήμνιση των πρωτεϊνών. Στη συνέχεια προστέθηκαν 100 μL φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος συγκέντρωσης 0,1 M και pH=6,8 και το δείγμα αναδεύτηκε ισχυρά. Έπειτα, έγινε προσθήκη 5 mL διαλύματος χλωροφορμίου/ισοπροπανόλης, σε αναλογία όγκων 85/15, και ακολούθησε ισχυρή ανάδευση για 60". Ακολούθησε φυγοκέντρηση του κάθε δείγματος για 2' στις 5000 rpm με σκοπό την διάσπαση του δημιουργηθέντος γαλακτώματος, την κατακρήμνιση του ιζήματος και τον καλύτερο διαχωρισμό των δυο φάσεων. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ο διαχωρισμός υδατικής-οργανικής φάσης με τη χρήση διαχωριστικής χοάνης και εξάτμιση της οργανικής φάσης σε ήπιο ρεύμα N_2 στους 45°C. Το στερεό υπόλειμμα επαναδιαλύθηκε σε 200 μL κινητής φάσης (0,1% οξικό οξύ/μεθανόλη/ακετονιτρίλιο, 92/4/5 v/v) αναδεύθηκε ισχυρά για 15" και φυγοκεντρήθηκε για 2' στις 5000 rpm. Τέλος, 20 μL του δείγματος αυτού εγχύθηκαν στη χρωματογραφική στήλη. Τα διαλύματα βαθμονόμησης και ποιοτικού ελέγχου παρασκευάστηκαν μετά από προσθήκη πυκνού διαλύματος της παρακεταμόλης κατάλληλης συγκέντρωσης σε 200 μL ούρων που δεν περιείχαν παρακεταμόλη και επεξεργάστηκαν όπως ανωτέρω.

Επεξεργασία των δειγμάτων ούρων για τον προσδιορισμό ολικής παρακεταμόλης

Σε 300 μL ούρα, τα οποία συλλέχτηκαν 1 ώρα μετά την κατανάλωση της παρακεταμόλης, προστέθηκαν 150 μL φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος συγκέντρωσης 0,1 M και pH=6,8 και 13 μL διαλύματος ενζύμου β-γλυκουρονιδάσης (820 IU). Έπειτα από σύντομη ανακίνηση τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο στους 37°C για μια ώρα. Στην συνέχεια, λήφθηκαν 200 μL από το μίγμα της επώασης τα οποία εκχυλίστηκαν και αναλύθηκαν όπως περιγράφηκε στην παράγραφο την σχετική με τον προσδιορισμό της

ελεύθερης παρακεταμόλης. Επώσεις για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα και συγκεκριμένα για 1,5 και 2 ώρες, δεν έδωσαν διαφορετικά αποτελέσματα απ' ότι η επώση διάρκειας μίας ώρας (τα δεδομένα αυτά δεν παρουσιάζονται).

Ο προσδιορισμός της συζευγμένης παρακεταμόλης έγινε με αφαίρεση της μετρηθείσας συγκέντρωσης της ελεύθερης παρακεταμόλης από την μετρηθείσα συγκέντρωση της ολικής παρακεταμόλης.

2.3. Ποιοτικός έλεγχος

Γραμμικότητα των καμπυλών βαθμονόμησης των μεταβολιτών της καφεΐνης σε ούρα

Οι καμπύλες βαθμονόμησης κατασκευάστηκαν με σκοπό να επιβεβαιώσουν την γραμμική συσχέτιση μεταξύ του λόγου «ύψος κορυφής μεταβολίτη/ύψος κορυφής ΕΠ» και των προκαθορισμένων συγκεντρώσεων τους σε ούρα χωρίς μεθυλοξανθίνες. Τα δείγματα βαθμονόμησης σε συγκεντρώσεις 10, 20, 50, 100, 200 και 400 μM παρασκευάστηκαν με την ανάμιξη ούρων που δεν περιείχαν μεθυλοξανθίνες με πρότυπα μίγματα των 5 μεταβολιτών και του εσωτερικού προτύπου, ώστε να προκύψουν οι ανωτέρω τελικές συγκεντρώσεις. Τα δείγματα ούρων που χρησιμοποιήθηκαν για τη βαθμονόμηση εκχυλίστηκαν και αναλύθηκαν με τη διαδικασία που περιγράφηκε προηγουμένως. Οι πρότυπες καμπύλες βαθμονόμησης κατασκευάστηκαν με τη χρήση της μεθόδου της γραμμικής παλινδρόμησης (Πίνακας 3).

Γραμμικότητα των καμπυλών βαθμονόμησης των μεταβολιτών της καφεΐνης στο σίελο

Κατ' αναλογία με τα δείγματα ούρων, κατασκευάστηκαν καμπύλες βαθμονόμησης των μεταβολιτών της καφεΐνης στο σίελο σε συγκεντρώσεις 0,5, 1, 2, 5, 10 και 30 μM (Πίνακας 3).

Γραμμικότητα της καμπύλης βαθμονόμησης της παρακεταμόλης στα ούρα

Σύμφωνα με τα ανωτέρω κατασκευάστηκε καμπύλη βαθμονόμησης της παρακεταμόλης σε συγκεντρώσεις 0,1, 0,2, 0,5, 1, 1,5 και 2 μM (Πίνακας 3).

Πίνακας 3: Εξισώσεις γραμμικής παλινδρόμησης των καμπυλών βαθμονόμησης. Εξίσωση ελαχίστων τετραγώνων $y=ax+\beta$

	α	β	R^2	Εύρος συγκεντρώσεων (μM)
Μεταβολίτης καφεΐνης στα ούρα				
AFMU	0,0085	-0,0074	0,9906	10-400
1MU	0,0069	-0,0068	0,9960	10-400
1MX	0,0044	0,0101	0,9966	10-400
17MU	0,0036	0,0185	0,9990	10-400
17MX	0,0025	0,0024	0,9987	10-400
Μεταβολίτης καφεΐνης στον σίελο				
17MX	0,1121	0,0158	0,9998	0,5-30
137MX	0,1093	0,1268	0,9994	0,5-30
Παρακεταμόλη ούρων*				
	131,33	0,9530	0,9993	0,1-2,0

* οι συγκεντρώσεις της παρακεταμόλης εκφράζονται σε mM

Ακρίβεια και επαναληψιμότητα

Παρασκευάστηκαν δύο δείγματα ποιοτικού ελέγχου (Quality Control, QC) με την ανάμιξη ούρων ελευθέρων από μεθυλοξανθίνες με ένα πρότυπο διάλυμα αποτελούμενο από τους πέντε υπό εξέταση μεταβολίτες και του εσωτερικού προτύπου σε χαμηλές (30 μM) και υψηλές (300 μM) συγκεντρώσεις για κάθε μεταβολίτη. Πριν από κάθε ημερήσια χρωματογραφική ανάλυση των δειγμάτων ούρων, γινόταν ανάλυση των δύο δειγμάτων ελέγχου ποιότητας. Συνολικά αναλύθηκαν 4 δείγματα ελέγχου χαμηλών, και 4 δείγματα υψηλών συγκεντρώσεων. Η συγκέντρωση των μεταβολιτών σε κάθε δείγμα ποιοτικού ελέγχου προσδιορίστηκε μέσω των εξισώσεων των αντίστοιχων ευθειών γραμμικής παλινδρόμησης.

Κατ' ανάλογο τρόπο παρασκευάστηκαν δύο δείγματα ποιοτικού ελέγχου για την καφεΐνη και τους μεταβολίτες της στο σίελο σε συγκεντρώσεις 1,5 και 15 μM .

Παρομοίως παρασκευάστηκαν δύο δείγματα ποιοτικού ελέγχου για την παρακεταμόλη στα ούρα σε συγκεντρώσεις 0,15 και 1,5 mM (Πίνακας 4).

Πίνακας 4: Ακρίβεια και επαναληψιμότητα των μετρήσεων (n=4).

	Προστε- θείσα συγκέν- τρωση (μM)	Μέση μετρηθείσα συγκέντρω- ση	Σφάλμα (bias%)	Συντελεστής διακύμανσης (CV%)	Προστε- θείσα συγκέν- τρωση	Μετρηθείσα συγκέντρωση	Σφάλμα (bias%)	Συντελεστής διακύμανσης (CV%)
Μεταβολίτης καφεΐνης στα ούρα								
AFMU	30,00	29,45	-1,84	5,86	300,00	306,00	2,00	2,38
1MU	30,00	30,27	0,90	5,26	300,00	302,95	0,98	5,84
1MX	30,00	29,72	-0,93	1,41	300,00	295,30	-1,57	1,65
17MU	30,00	30,29	0,98	2,91	300,00	309,10	3,03	3,79
17MX	30,00	30,53	1,75	6,07	300,00	298,09	-0,64	2,74
Μεταβολίτης καφεΐνης στο σίελο								
17MX	1,50	1,58	5,22	4,73	15,00	15,22	1,44	5,78
137MX	1,50	1,56	3,98	5,10	15,00	14,49	-3,40	4,27
Παρακεταμόλη ούρων*								
	0,15	0,14	-6,7	6,43	1,50	1,55	3,33	6,90

*οι συγκεντρώσεις της παρακεταμόλης εκφράζονται σε mM

2.4 Στατιστική ανάλυση

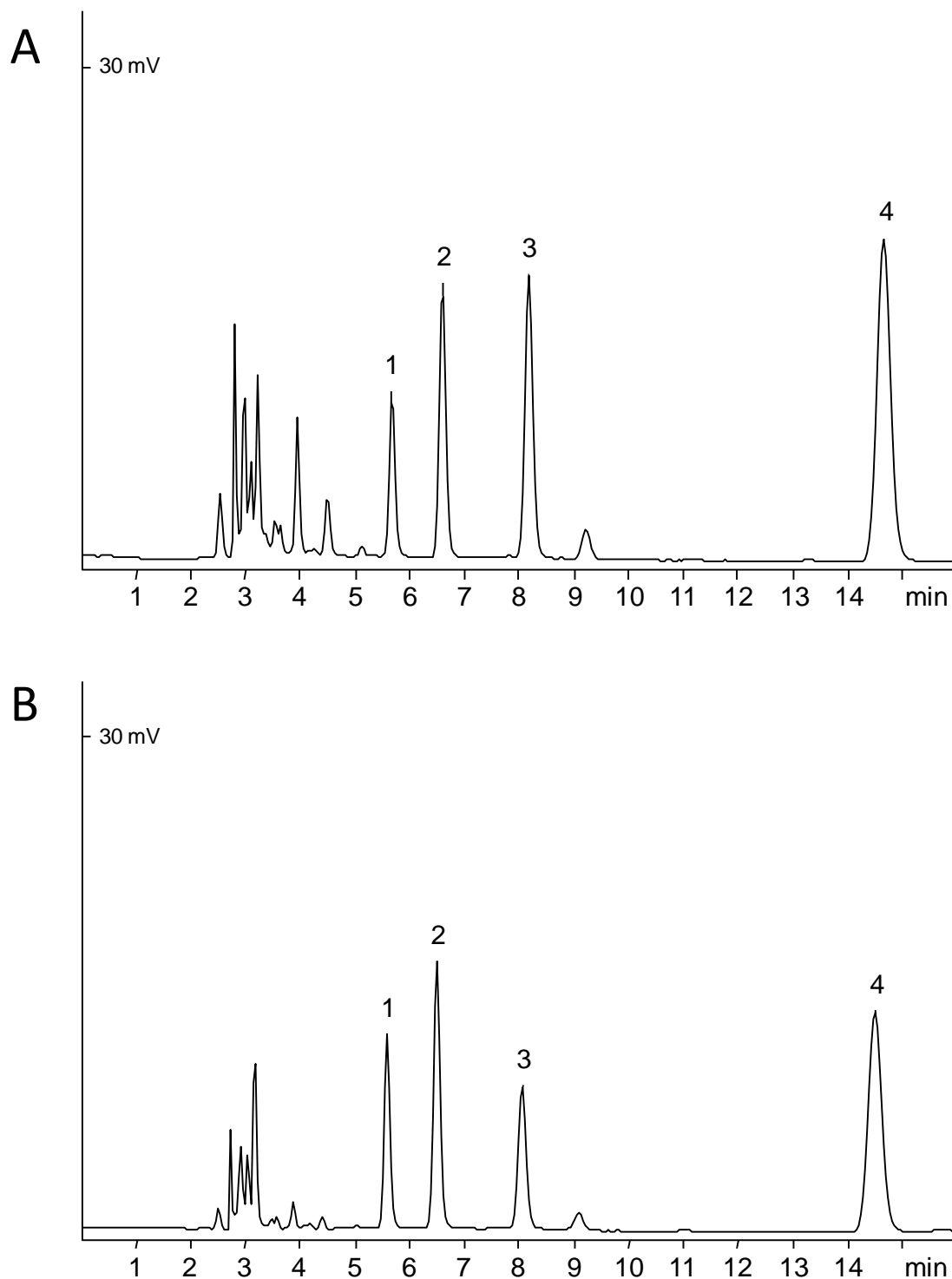
Τα αποτελέσματα παρουσιάστηκαν με τις μέσες τιμές και τις τυπικές αποκλίσεις των μετρήσεων των μεταβολικών λόγων της καφεΐνης στα ούρα και τον σίελο και των μετρήσεων του κλάσματος σύζευξης της παρακεταμόλης. Η γραμμικότητα των καμπυλών βαθμονόμησης προσδιορίστηκε με την ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης. Οι διαφορές μεταξύ των μέσων τιμών των μετρήσεων προ και μετά την χορήγηση της μέντας ελέγχθηκαν με την δοκιμασία t-test για σχετιζόμενα δείγματα (paired samples t-test). Οι διαφορές θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές σε επίπεδο σημαντικότητας $p < 0,05$. Η επεξεργασία των δεδομένων έγινε με το στατιστικό λογισμικό SPSS 13.0.

3. Αποτελέσματα

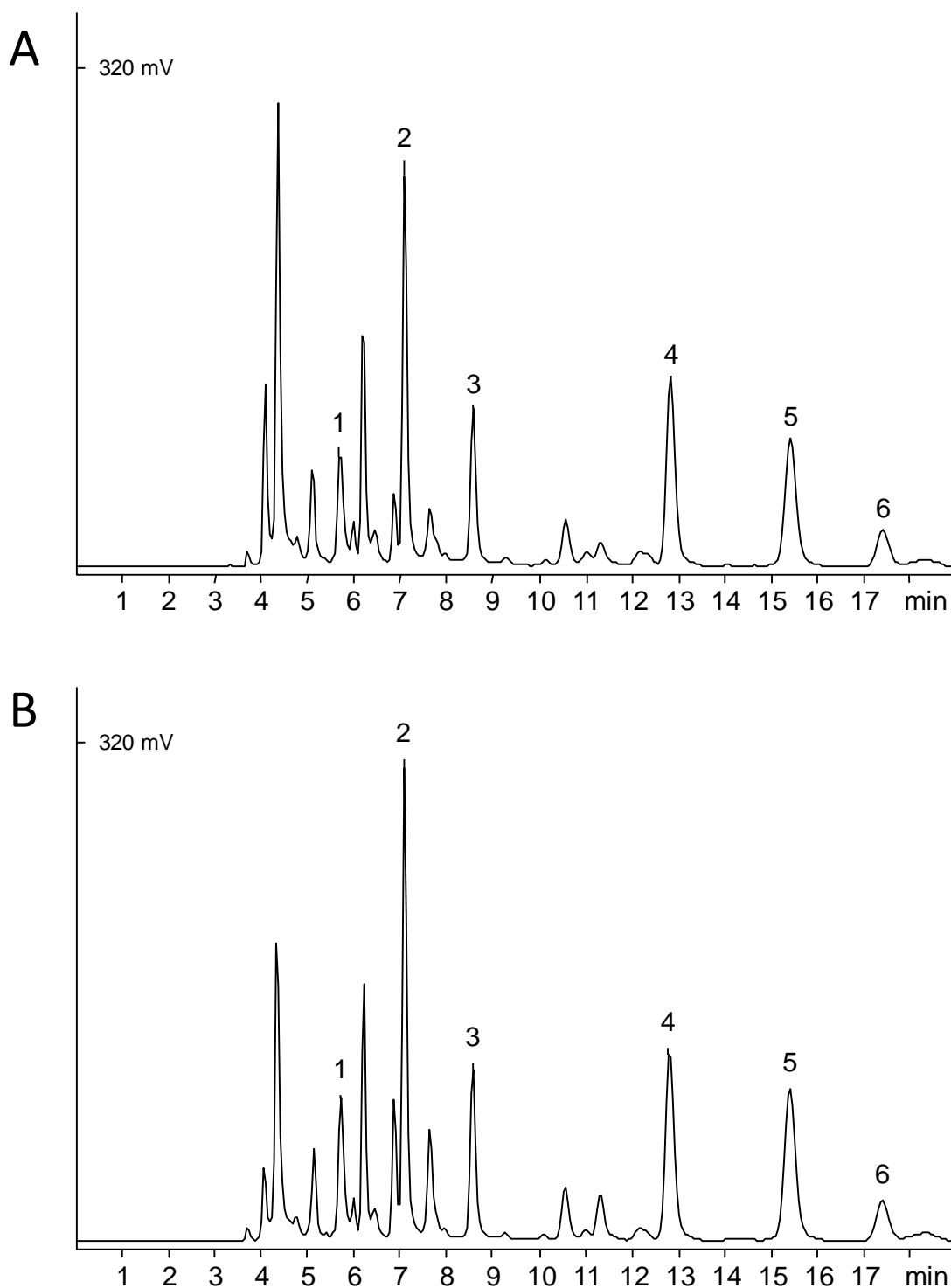
Στο Σχήμα 5 εμφανίζονται τα χρωματογραφήματα HPLC των μεταβολιτών της καφεΐνης στον σίελο ενός εθελοντή 6 ώρες μετά την κατανάλωση της καφεΐνης, προ και μετά την περίοδο κατανάλωσης του αφεψήματος της μέντας. Στο Σχήμα 6 εμφανίζονται τα χρωματογραφήματα HPLC των μεταβολιτών της καφεΐνης στα ούρα ενός εθελοντή 6 ώρες μετά την κατανάλωση της καφεΐνης, προ και μετά την περίοδο κατανάλωσης του αφεψήματος της μέντας. Στο Σχήμα 7 εμφανίζονται τα χρωματογραφήματα HPLC της ελεύθερης και της ολικής παρακεταμόλης στα ούρα εθελοντή προ και μετά την περίοδο κατανάλωσης του αφεψήματος της μέντας.

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων των τιμών των μεταβολικών λόγων $(AFMU+1MU+1MX)/17MU$, $17MU/(17MU+17MX)$, $17U/(17U+17X)$ και $AFMU/(AFMU+1MU+1MX)$ της καφεΐνης στα ούρα οι οποίοι αντανakλούν την δραστικότητα των ενζύμων CYP1A2, CYP2A6, XO και NAT2, αντίστοιχα, και του μεταβολικού λόγου $17MX/137MX$ στον σίελο, ο οποίος αντανakλά την δραστικότητα του CYP1A2, εμφανίζονται στον Πίνακα 5.

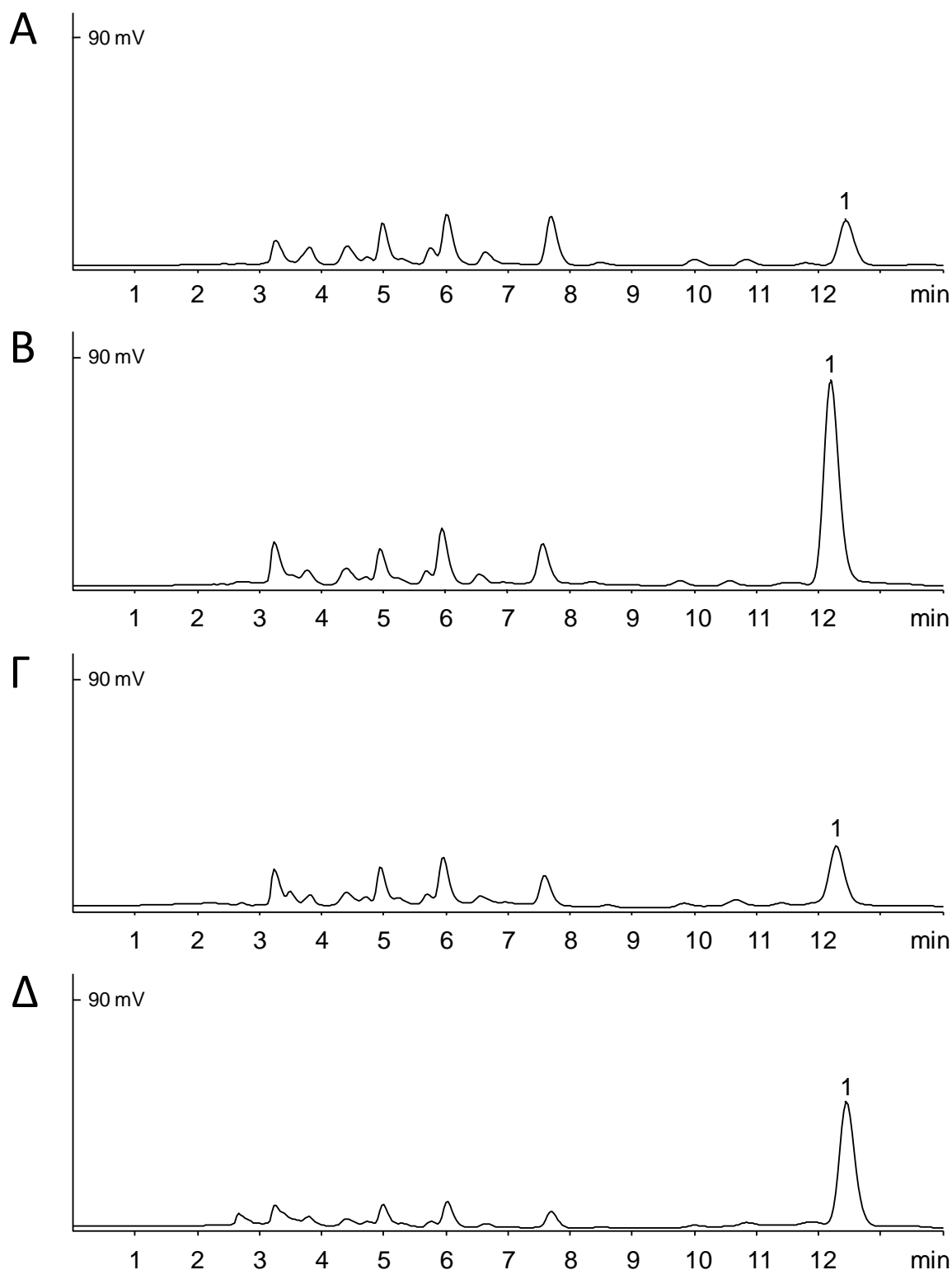
Τα αποτελέσματα των μετρήσεων της ελεύθερης και της ολικής παρακεταμόλης στα ούρα των εθελοντών εμφανίζονται στον Πίνακα 6.



Σχήμα 5: Χρωματογραφήματα HPLC των μεταβολιτών της καφεΐνης στο σίελο. **A:** πριν τη λήψη της μέντας, δείκτης δραστικότητας CYP1A2= 0,51. **B:** Μετά τη λήψη της μέντας, δείκτης δραστικότητας CYP1A2= 0,38. 1=37MX, 2=ΕΠ, 3= 17MX, 4=137MX.



Σχήμα 6: Χρωματογραφήματα HPLC μεταβολιτών καφεΐνης στα ούρα. **A:** πριν τη λήψη της μέντας, δείκτες δραστικότητας CYP1A2=3,10, CYP2A6=0,50, XO=0,62 και NAT2=0,13. **B:** Μετά τη λήψη της μέντας, δείκτες δραστικότητας CYP1A2=2,90, CYP2A6=0,52, XO=0,63 και NAT2=0,13. 1= AFMU, 2= 1MU, 3= 1MX, 4= ΕΠ, 5= 17MU, 6= 17MX.



Σχήμα 7: Χρωματογραφήματα HPLC ούρων μετά την κατανάλωση της παρακεταμόλης. **A:** ελεύθερη παρακεταμόλη πριν τη χορήγηση μέντας [Παρακεταμόλη]=0,16 mM. **B:** ολική παρακεταμόλη πριν τη χορήγηση μέντας [Παρακεταμόλη]=0,60 mM. **Γ:** ελεύθερη παρακεταμόλη μετά τη χορήγηση μέντας [Παρακεταμόλη]=0,17 mM. **Δ:** ολική παρακεταμόλη μετά τη χορήγηση μέντας [Παρακεταμόλη]=0,36 mM.

Πίνακας 5: Τιμές των μεταβολικών λόγων της καφεΐνης στα ούρα και στο σίελο που αντανakλούν τη δραστικότητα των CYP1A2, CYP2A6, XO και NAT2.

Κωδ.	Δείκτης CYP1A2 [†]		Δείκτης CYP2A6 [†]		Δείκτης XO [†]		Δείκτης NAT2 [†]		Δείκτης CYP1A2 [‡]	
	ΠΡΟ	ΜΕΤΑ	ΠΡΟ	ΜΕΤΑ	ΠΡΟ	ΜΕΤΑ	ΠΡΟ	ΜΕΤΑ	ΠΡΟ	ΜΕΤΑ
1	3,32	3,24	0,44	0,44	0,59	0,57	0,07	0,07	0,51	0,38
2	3,10	2,92	0,50	0,53	0,62	0,62	0,13	0,12	0,66	0,75
3	4,57	3,93	0,37	0,41	0,56	0,58	0,13	0,11	0,69	0,62
4	4,72	3,64	0,41	0,48	0,66	0,68	0,11	0,09	0,50	0,38
5	3,13	3,05	0,63	0,66	0,62	0,64	0,50	0,47	0,61	0,46
6	3,26	3,23	0,41	0,40	0,51	0,48	0,12	0,10	0,70	0,47
7	2,58	2,59	0,46	0,46	0,49	0,49	0,12	0,11	0,46	0,53
8	1,10	1,45	0,66	0,62	0,47	0,54	0,10	0,09	0,36	0,44
9	2,71	2,18	0,48	0,53	0,56	0,53	0,10	0,10	0,53	0,48
MT	3,166	2,927	0,483	0,501	0,564	0,564	0,153	0,140*	0,564	0,501
±T.A.	1,075	0,757	0,101	0,090	0,064	0,063	0,131	0,125	0,120	0,119

[†] Δείκτες στα ούρα: CYP1A2=(AFMU+1MU+1MX)/17MU, CYP2A6=17MU/(17MU+17MX), XO=1MU/(1MU+1MX), NAT2=AFMU/(AFMU+1MU+1MX). [‡] Δείκτης CYP1A2 στον σίελο: 17MX/137MX. *p=0.004 σε σχέση με προ μέντας, t-test για σχετιζόμενα δείγματα

Πίνακας 6: Συγκεντρώσεις παρακεταμόλης στα ούρα και το κλάσμα σύζευξης.

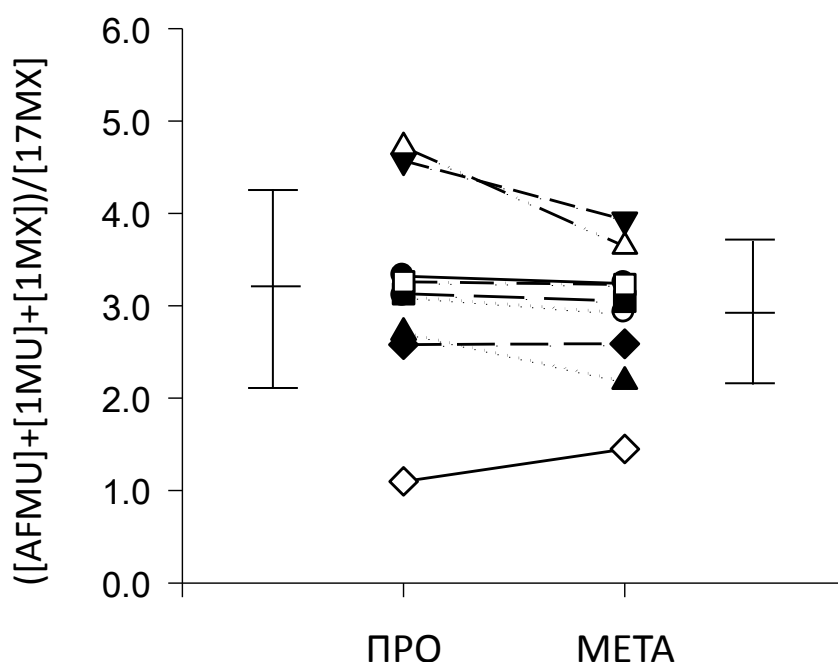
Κωδ.	[παρακεταμόλη] (mM) ΠΡΟ			[παρακεταμόλη] (mM) ΜΕΤΑ			Κλάσμα σύζευξης συζευγμένη/ολική	
	Ελεύθερη	Ολική	Συζευγ-μένη	Ελεύθερη	Ολική	Συζευγ-μένη	ΠΡΟ	ΜΕΤΑ
1	0,42	8,93	8,51	0,11	0,94	0,83	0,95	0,88
2	0,07	1,45	1,38	0,05	0,80	0,75	0,95	0,94
3	0,27	1,80	1,53	0,11	1,73	1,62	0,85	0,94
4*	0,04	0,13	0,09	0,02	0,06	0,04	0,69	0,67
5	0,27	1,31	1,04	0,39	1,73	1,34	0,79	0,77
6	0,16	0,93	0,77	0,14	0,56	0,42	0,83	0,75
7	0,31	6,14	5,83	0,28	1,93	1,65	0,95	0,85
8	0,09	0,42	0,33	0,16	4,35	4,19	0,79	0,96
9	0,05	0,11	0,06		0,23	0,16	0,54	0,69
MT							0,816	0,828
± T.A.							0,137	0,110

* Στο άτομο Νο4 δεν κατέστη δυνατόν να προσδιοριστούν οι συγκεντρώσεις παρακεταμόλης στα ούρα μετά την κατανάλωση της μέντας.

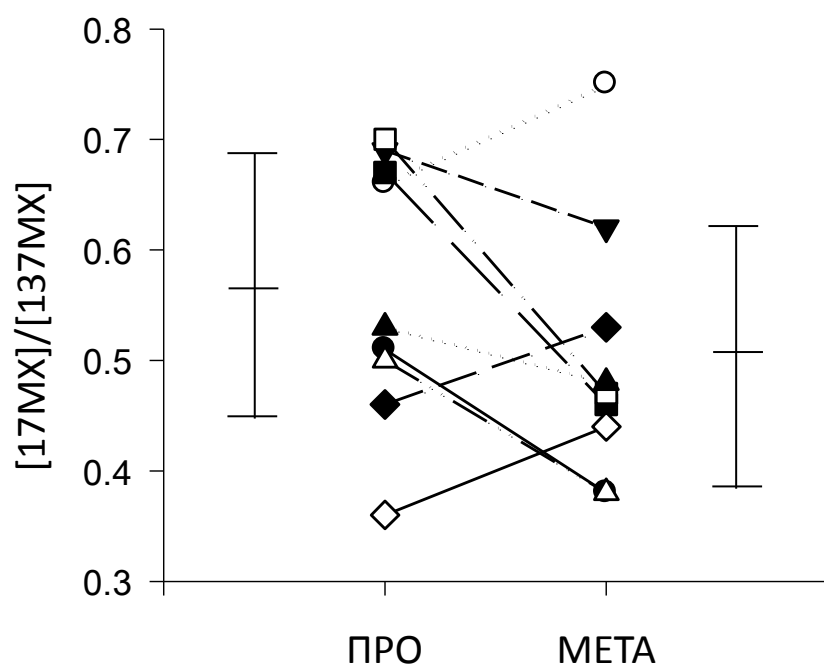
3.1 CYP1A2

Η μέση τιμή του μεταβολικού λόγου $(AFMU+1MU+1MX)/17MU$ στα ούρα ήταν μειωμένη στους εθελοντές κατά 7,5% μετά την περίοδο κατανάλωσης του αφεψήματος της μέντας χωρίς όμως η μείωση αυτή να φθάνει σε στατιστική σημαντικότητα ($2,927 \pm 0,757$ έναντι $3,166 \pm 1,075$, $p > 0,05$; Σχήμα 8).

Η μέση τιμή του μεταβολικού λόγου $17U/(17U+17X)$ στο σίελο ήταν μειωμένη στους εθελοντές μετά την περίοδο κατανάλωσης του αφεψήματος της μέντας κατά 11,2% χωρίς όμως στατιστική σημαντικότητα ($0,501 \pm 0,119$ έναντι $0,564 \pm 0,120$, $p > 0,05$; Σχήμα 9).



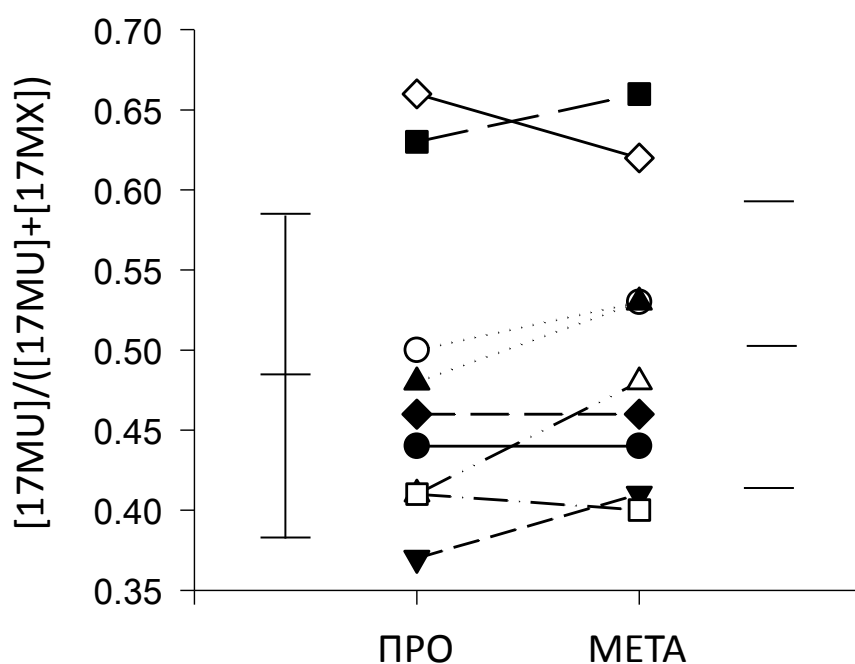
Σχήμα 8: Μεταβολικοί λόγοι της καφεΐνης για το CYP1A2 στα ούρα πριν και μετά τη χορήγηση μέντας. Οι οριζόντιες και κατακόρυφες γραμμές υποδεικνύουν τις μέσες τιμές και την τυπική απόκλιση, αντίστοιχα.



Σχήμα 9: Μεταβολικοί λόγοι της καφεΐνης για το CYP1A2 στο σάλιο πριν και μετά τη χορήγηση μέντας. Οι οριζόντιες και κατακόρυφες γραμμές υποδεικνύουν τις μέσες τιμές και την τυπική απόκλιση, αντίστοιχα.

3.2 CYP2A6

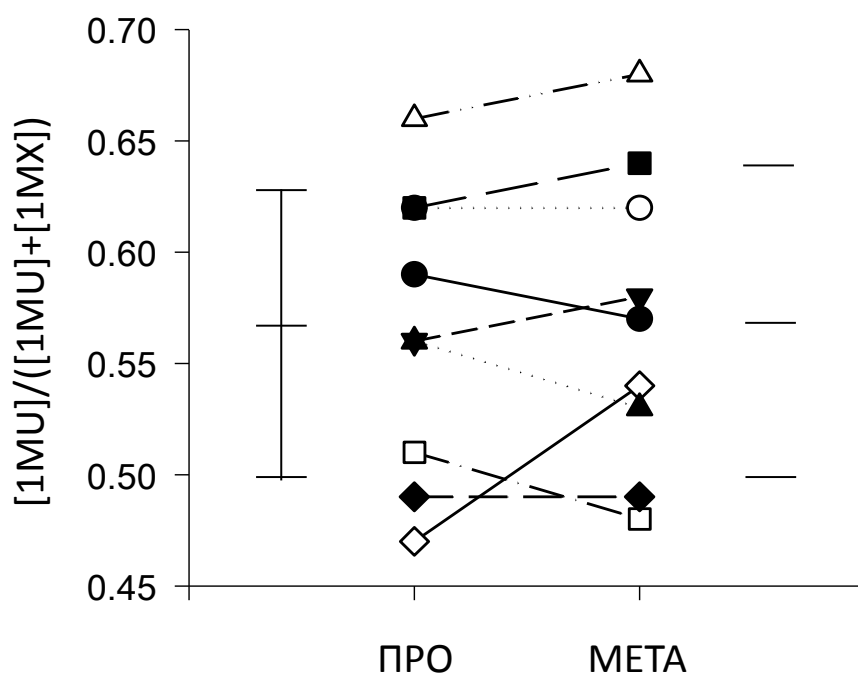
Η μέση τιμή του μεταβολικού λόγου $17\text{MU}/(17\text{MU}+17\text{MX})$ στα ούρα ήταν οριακά αυξημένη στους εθελοντές μετά την περίοδο κατανάλωσης του αφεψήματος της μέντας κατά 3,7% χωρίς όμως η αύξηση αυτή να φθάνει σε στατιστική σημαντικότητα ($0,501 \pm 0,090$ έναντι $0,483 \pm 0,101$; $p > 0,05$; Σχήμα 10).



Σχήμα 10: Μεταβολικοί λόγοι της καφεΐνης για το CYP2A6 στα ούρα πριν και μετά τη χορήγηση μέντας. Οι οριζόντιες και κατακόρυφες γραμμές υποδεικνύουν τις μέσες τιμές και την τυπική απόκλιση, αντίστοιχα.

3.3 ΧΟ

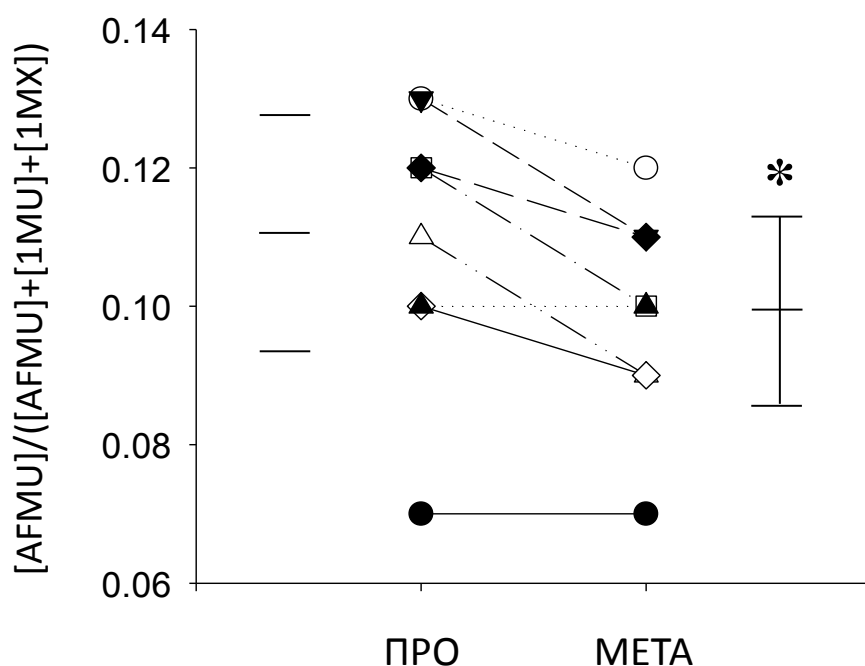
Η μέση τιμή του μεταβολικού λόγου $1MU/(1MU+1MX)$ στα ούρα παρέμεινε σταθερή στους εθελοντές πριν και μετά την περίοδο κατανάλωσης του αφεψήματος της μέντας ($0,564 \pm 0,063$ έναντι $0,564 \pm 0,064$; $p > 0,05$; Σχήμα 11).



Σχήμα 11: Μεταβολικοί λόγοι της καφεΐνης για το ΧΟ στα ούρα πριν και μετά τη χορήγηση μέντας. Οι οριζόντιες και κατακόρυφες γραμμές υποδεικνύουν τις μέσες τιμές και την τυπική απόκλιση, αντίστοιχα.

3.4 NAT2

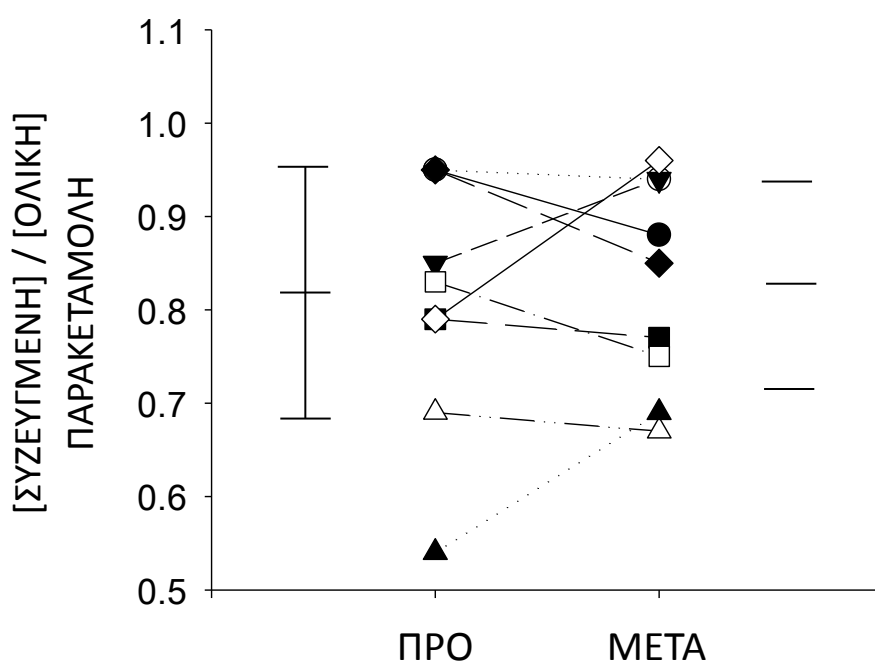
Η μέση τιμή του μεταβολικού λόγου $AFMU/(AFMU+1MU+1MX)$ στα ούρα ήταν στατιστικώς σημαντικά μειωμένη στους εθελοντές μετά την περίοδο κατανάλωσης του αφεψήματος της μέντας κατά 8,5% ($0,140 \pm 0,125$ έναντι $0,153 \pm 0,131$, $p=0,004$; Σχήμα 12).



Σχήμα 12: Μεταβολικοί λόγοι της καφεΐνης για το NAT2 στα ούρα πριν και μετά τη χορήγηση μέντας. Οι οριζόντιες και κατακόρυφες γραμμές υποδεικνύουν τις μέσες τιμές και την τυπική απόκλιση, αντίστοιχα. * $p=0,004$.

3.5 UGT1A1/1A6

Η μέση τιμή του κλάσματος σύζευξης της παρακεταμόλης (συζευγμένη/ολική) παρουσίασε μια ελάχιστη αύξηση στους 8 εθελοντές μετά την περίοδο κατανάλωσης του αφεψήματος της μέντας χωρίς στατιστική σημαντικότητα ($0,831 \pm 0,137$ έναντι $0,847 \pm 0,101$, $p > 0,05$; Σχήμα 13). Σε έναν εθελοντή (No4) δεν κατέστη δυνατόν να προσδιοριστούν οι συγκεντρώσεις παρακεταμόλης στα ούρα μετά την κατανάλωση της μέντας.



Σχήμα 13: Ποσοστά συζευγμένης παρακεταμόλης πριν και μετά την χορήγηση της μέντας. Οι οριζόντιες και κατακόρυφες γραμμές υποδεικνύουν τις μέσες τιμές και την τυπική απόκλιση, αντίστοιχα.

4. Συζήτηση

Εξ όσων είναι δυνατόν να γνωρίζουμε, η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη κατά την οποία διερευνήθηκε η επίδραση του αφεψήματος της μέντας στην *in vivo* δραστικότητα των ενζύμων CYP1A2, CYP2A6, NAT2, XO και UGT1A1/1A6 σε ανθρώπους με τη χρήση της καφεΐνης και της παρακεταμόλης ως φαρμάκων-δεικτών. Στην παρούσα εργασία δόθηκε ιδιαίτερη προσοχή στο πρωτόκολλο των συμμετεχόντων εθελοντών έτσι ώστε αυτοί να απόσχουν, κατά την διάρκεια της μελέτης, από φάρμακα, τρόφιμα και ποτά που είναι γνωστό ότι επιδρούν στην δραστικότητα των ενζύμων του μεταβολισμού των ξενοβιοτικών. Κατ' αυτόν τον τρόπο, έγινε προσπάθεια να περιοριστούν οι τυχαίοι διατροφικοί παράγοντες οι οποίοι θα μπορούσαν να τροποποιήσουν την επίδραση του αφεψήματος της μέντας στον οργανισμό. Οι 3 ημέρες αποχής από διατροφικούς παράγοντες πριν την χορήγηση του φυσικού προϊόντος (wash-out period), απαντάται και σε άλλες μελέτες αυτού του είδους (de Waard et al., 2008).

Όσον αφορά την διαδικασία προετοιμασίας των αποξηραμένων φύλλων της μέντας αυτή περιελάμβανε τον σύντομο βρασμό (2-3') και την εν συνεχεία παραμονή στο νερό για 5' πριν την τελική κατανάλωση του υδατικού διαλύματος. Η διαδικασία αυτή περιγράφεται στην βιβλιογραφία ως decoction (αφέψημα) και προτιμήθηκε από την εμβάπτιση του ξηρού προϊόντος σε βραστό νερό η οποία περιγράφεται ως infusion (έγχυση). Σε σχετική εργασία, προσδιορίστηκαν οι φαινολικές ενώσεις σε υδατικά εκχυλίσματα φασκόμηλου (*salvia officinalis* L.) με τις διαδικασίες της έγχυσης (infusion) και του αφεψήματος (decoction). Η ποσοτική ανάκτηση των συνολικών φαινολικών οξέων και των συνολικών φλαβονοειδών με την διαδικασία του αφεψήματος ήταν σημαντικά υψηλότερη από την ποσότητα των αντίστοιχων ουσιών που ανακτήθηκαν με την διαδικασία της έγχυσης κατά 28,7% και 44%, αντίστοιχα (Martins et al., 2015).

Παρ' όλο που στην παρούσα εργασία δεν έγινε ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των φαινολικών ενώσεων που περιέχονταν στο αφέψημα της μέντας, υπάρχουν διάφορες μελέτες κατά τις οποίες έχει γίνει σχετικός προσδιορισμός σε δείγματα μέντας διαφορετικής προέλευσης. Σε μία από αυτές, προσδιορίστηκαν οι υδατοδιαλυτές πολυφαινολικές ενώσεις οι οποίες ανακτήθηκαν με την διαδικασία της έγχυσης από

εμπορικά διαθέσιμες ποσότητες 45 διαφορετικών δειγμάτων ξηρών φύλλων μέντας. Η κυριότερη ένωση ήταν η εριοικτρίνη ($18,9 \pm 12,0$ mg/g ξηρού προϊόντος), ακολουθούμενη από την 7-O-ρουτινοσίδη της λουτεολίνης ($7,8 \pm 2,7$ mg/g), το ροσμαρινικό οξύ ($5,3 \pm 2,7$ mg/g), το 7-O-γλυκουρονίδιο της λουτεολίνης (2,8 mg/g), το 7-O-β-γλυκοσίδιο της ναριγκενίνης ($1,0 \pm 0,8$ mg/g), την 7-O-νεοεσπεριδοσίδη της απιγκενίνης ($0,8 \pm 0,4$ mg/g) και μικρότερες ποσότητες από 7-O-β-γλυκοσίδιο της εριοδικτυόλης, λιθοσπερμικού οξέος, ναριγκετίνης, εσπεριδίνης, καφεϊκού οξέος και εριοδικτυόλης (Fecka and Turek, 2007). Σε παρόμοια μελέτη, με την μέθοδο της υδροαπόσταξης με υπερκαθαρό νερό, οι κυριότερες ενώσεις που ανιχνεύτηκαν ήταν η εριοικτρίνη ($40,27 \pm 0,18$ mg/g), το ροσμαρινικό οξύ ($8,44 \pm 0,15$ mg/g), το 7-O-γλυκουρονίδιο της λουτεολίνης ($2,70 \pm 0,01$ mg/g), η εριοδικτυόλη ($0,32 \pm 0,00$ mg/g), το καφεϊκό οξύ ($0,22 \pm 0,00$ mg/g) και η 7-O-νεοεσπεριδοσίδη της απιγκενίνης ($0,89 \pm 0,03$ mg/g) (Dorman et al., 2003).

Από τις ανωτέρω μελέτες προκύπτει ότι, παρά τις διαφορετικές αναλογίες κάθε φορά, οι κυριότερες ενώσεις που απαντώνται σε υδατικά διαλύματα μέντας είναι, κατά σειρά, η εριοικτρίνη, οι γλυκοσίδες της λουτεολίνης και το ροσμαρινικό οξύ. Οι ουσίες αυτές, ως επικρατέστερες, αναμένεται να ασκούν την όποια βιολογική δράση στον οργανισμό σε περίπτωση κατανάλωσης υδατικών διαλυμάτων μέντας.

Η δοσολογία, τέλος, της μέντας διαμορφώθηκε στα 4 gr ξηρών φύλλων ημερησίως τα οποία λαμβάνονταν σε δύο δόσεις, πρωί και βράδυ, υπό την μορφή 250 mL αφεψήματος. Η δοσολογία αυτή ήταν καλώς ανεκτή από τους εθελοντές και βρίσκεται εντός των συνήθως λαμβανομένων ποσοτήτων οι οποίες κυμαίνονται από 1,5-3,0 gr ξηρών φύλλων σε 150-250 mL νερού, 3 φορές ημερησίως (European Medicines Agency, 2008).

CYP1A2

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, παρατηρήθηκε μείωση της δραστηριότητας του CYP1A2 μετά την περίοδο της κατανάλωσης του αφεψήματος της μέντας, όπως αυτή προσδιορίστηκε τόσο από τον μεταβολικό λόγο 17MX/137MX της καφεΐνης στον σίελο όσο και από τον αντίστοιχο λόγο (AFMU+1MU+1MX)/17MU στα ούρα. Η μέση μείωση του πρώτου λόγου ήταν 11,2% ενώ του δεύτερου ήταν 7,5%. Είναι πιθανόν ο μεταβολικός λόγος 17MX/137MX στον σίελο να έχει μεγαλύτερη ευαισθησία στην απεικόνιση της δραστηριότητας του CYP1A2 από τον αντίστοιχο μεταβολικό λόγο στα ούρα καθώς η

μετατροπή της 137MX προς 17MX καταλύεται ειδικά από το CYP1A2, ενώ οι μεταβολίτες που συμπεριλαμβάνονται στον λόγο (AFMU+1MU+1MX)/17MU παράγονται από την παράλληλη δράση και άλλων ενζύμων, πλην του CYP1A2.

Η μείωση της δραστηριότητας του CYP1A2 δεν ήταν ομοιόμορφη για όλους τους εθελοντές. Όσον αφορά στα ούρα, 7 άτομα παρουσίασαν μείωση της τιμής του αντίστοιχου μεταβολικού λόγου ενώ 2 άτομα παρουσίασαν αύξηση. Η ποσοστιαία μείωση κυμάνθηκε από 0,92-22,88%. Όσον αφορά στον σίελο, 6 άτομα παρουσίασαν μείωση της τιμής του αντίστοιχου μεταβολικού λόγου και 3 άτομα αύξηση. Η ποσοστιαία μείωση κυμάνθηκε από 9,43-32,86%. Σε κάθε περίπτωση, η μείωση των τιμών των μεταβολικών λόγων δεν παρουσίασε στατιστική σημαντικότητα ($p > 0,05$). Είναι πιθανόν ο αριθμός των συμμετεχόντων να μην επαρκούσε ώστε να αναδειχθεί στατιστικώς σημαντική διαφορά.

Από τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας δεν μπορεί να εξαχθεί οριστικό συμπέρασμα για την επίδραση του αφεψήματος της μέντας στην δραστηριότητα του CYP1A2. Απαιτούνται περαιτέρω μελέτες, με μεγαλύτερο αριθμό συμμετεχόντων, ώστε να επιβεβαιωθεί η μείωση της δραστηριότητας η οποία παρατηρήθηκε στην παρούσα εργασία. Σε τέτοια περίπτωση, η μείωση της δραστηριότητας του CYP1A2, η οποία επιτυγχάνεται από την κατανάλωση 4 gr ξηρών φύλλων μέντας την ημέρα υπό την μορφή αφεψήματος, είναι πιθανόν να επηρεάζει, σε σημαντικό βαθμό, την φαρμακοκινητική συγχωρηγούμενων φαρμάκων τα οποία μεταβολίζονται από το CYP1A2. Επιπλέον, η μείωση αυτή μπορεί να φανεί ικανή να προσφέρει χημειοπροστασία, σε υπολογίσιμο βαθμό, έναντι προκαρκινογόνων τα οποία ενεργοποιούνται μεταβολικά από το CYP1A2. Σε κάθε περίπτωση, καθώς δεν παρατηρήθηκε μέση αύξηση της δραστηριότητας του ενζύμου, δεν φαίνεται πιθανό το αφέψημα της μέντας να έχει κάποια επιβλαβή επίδραση στον οργανισμό λόγω μεταβολικής ενεργοποίησης ενώσεων της διατροφής και του περιβάλλοντος όπως είναι οι ετεροκυκλικές αμίνες των καλοψημμένων κρεάτων και οι αρωματικές αμίνες του καπνού των τσιγάρων και των αζωχρωμάτων. Καθώς τα κυριότερα συστατικά του υδατικού διαλύματος της μέντας είναι τα φλαβονοειδή εριοκίτρινη και λουτεολίνη και το ροσμαρινικό οξύ, είναι πιθανόν τα βιολογικά αποτελέσματα της λήψης της μέντας να οφείλονται στην μεμονωμένη ή στην συνεργιστική δράση αυτών των συστατικών.

Η σχέση της δομής των φλαβονοειδών και της επίδρασής τους στα ένζυμα του συστήματος P450 έχει διερευνηθεί σε *in vitro* μελέτη με την χρήση ηπατικών μικροσωμάτων ανθρώπου. Σ' αυτή δείχθηκε ότι φλαβονοειδή με ελεύθερες υδροξυλομάδες, μεταξύ αυτών και οι φλαβανόνες εσπεριτίνη και ναριγκενίνη, αναστέλλουν τις αντιδράσεις οι οποίες διεξάγονται μέσω του συστήματος P450, ενώ φλαβονοειδή χωρίς υδροξυλομάδες διεγείρουν την δραστικότητα του P450 (Buening et al., 1981). Φαίνεται, επίσης, ότι επίπεδα μόρια με χαμηλό λόγο όγκου/επιφανείας παρουσιάζουν υψηλή ανασταλτική δράση έναντι του CYP1A2. Για τον λόγο αυτό οι φλαβανόνες και οι φλαβάνες, χωρίς τον διπλό δεσμό C2-C3, έχοντας τον Β δακτύλιο σχεδόν κάθετο στο υπόλοιπο μόριο, παρουσιάζουν μειωμένη ανασταλτική αποτελεσματικότητα έναντι άλλων φλαβονοειδών. Η παρουσία πολλαπλών υδροξυλομάδων στον δακτύλιο Β, επίσης, έχει ως αποτέλεσμα την δραστική μείωση της ανασταλτικής ικανότητας. Φαίνεται, γενικώς, ότι κρίσιμος παράγοντας για την ανασταλτική ικανότητα είναι οι υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του CYP1A2 και των φλαβονοειδών (Lee et al., 1998; Hodek et al., 2002). Όπως έχει αναφερθεί ανωτέρω, το κυριότερο φλαβονοειδές στο υδατικό διάλυμα της μέντας είναι η εριοκίτρινη οποία ανήκει στην κατηγορία των φλαβανονών, οι οποίες δεν έχουν διπλό δεσμό μεταξύ των ατόμων C2-C3, με 2 υδροξυλομάδες στον δακτύλιο Β. Με βάση την δομή της, συνεπώς, αναμένεται η εριοκίτρινη να έχει μειωμένη ανασταλτική δράση για το CYP1A2 έναντι άλλων φλαβονοειδών με διαφορετική δομή, όπως η κουερσετίνη, για παράδειγμα, η οποία ανήκει στην κατηγορία των φλαβονολών με διπλό δεσμό μεταξύ των ατόμων C2-C3 και για την οποία έχειδειχθεί ότι αναστέλλει *in vivo* σημαντικά την δραστικότητα του CYP1A2 (Xiao et al., 2014). Σε άλλη, όμως, *in vivo* μελέτηδείχθηκε ότι υδατικό διάλυμα μέντας 2% (w/v) όταν χορηγήθηκε σε αρουραίους για 4 εβδομάδες ανέστειλε σημαντικά την δραστικότητα του CYP1A2 κατά 76% σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (Maliakal and Wanwimolruk, 2001). Φαίνεται ότι η μεγαλύτερη διάρκεια του πειράματος σε σχέση με την παρούσα εργασία (28 ημέρες έναντι 6) και η συνεχής κατανάλωση του υδατικού διαλύματος της μέντας στο πόσιμο ύδωρ, είχε περισσότερο εμφανή αποτελέσματα, όσον αφορά την αναστολή του CYP1A2.

Αναφορικά με το δεύτερο σε περιεκτικότητα συστατικό της μέντας, τη λουτεολίνη, έχειδειχθεί σε *in vitro* μελέτη ότι αναστέλλει τη δραστικότητα του CYP1A2 αλλά σε μικρότερο

βαθμό από άλλες φλαβόνες με μικρότερο αριθμό υδροξυλίων στον δακτύλιο B (Kim et al., 2005). Έτσι, φαίνεται ότι η σχετικώς μικρή μείωση της δραστηριότητας του CYP1A2 η οποία παρατηρήθηκε στην παρούσα εργασία να οφείλεται στην έλλειψη σημαντικής ανασταλτικής ικανότητας, τόσο της εριοκιτρίνης όσο και της λουτεολίνης.

Όσον αφορά, τέλος, το ροσμαρινικό οξύ έχει δειχθεί, σε προηγούμενη μελέτη, ότι η προσθήκη του στην δίαιτα των αρουραίων για δύο εβδομάδες δεν είχε επίδραση στην δραστηριότητα του CYP1A2 πιθανότατα λόγω της μεταβολικής μετατροπής του πριν αυτό φτάσει στο ήπαρ (Debresac et al., 2001).

CYP2A6

Μία πολύ ειδική αντίδραση η οποία καταλύεται από το CYP2A6 είναι η 7- υδροξυλίωση της κουμαρίνης (1,2-βενζοπυρόνη) η οποία είναι μία φυσική ουσία που απαντάται σε πολλά φυτά. Μετά από κατανάλωση κουμαρίνης, ποσοστό μεγαλύτερο του 95% της 7-OH-κουμαρίνης που σχηματίζεται απεκκρίνεται, μέσα σε 4 ώρες, στα ούρα συνδεδεμένη με γλυκουρονικό. Συνεπώς, η κουμαρίνη είναι το κατ' εξοχήν υπόστρωμα για την εκτίμηση της μεταβολικής ικανότητας του CYP2A6 *in vivo* [Oscarson, 2001].

Εκτός από την 7-υδροξυλίωση της κουμαρίνης, μία άλλη αντίδραση η οποία καταλύεται, κυρίως, από το CYP2A6 είναι η 8-υδροξυλίωση της 17MX προς 17MU με μικρότερη συμμετοχή του CYP1A2. Σε μικρές συγκεντρώσεις 17MX (0,1 mM), όμως, το CYP2A6 είναι το μοναδικό ένζυμο που καταλύει την παραπάνω αντίδραση [Nowell et al., 2002]. Επομένως, η καφεΐνη, παρόλο που παρουσιάζει μικρότερη ειδικότητα, μπορεί να αποτελέσει ένα εναλλακτικό υπόστρωμα για την εκτίμηση της δραστηριότητας του CYP2A6 *in vivo*. Με βάση, λοιπόν, την οξείδωση της 17MX έχει προταθεί ο μεταβολικός λόγος 17MU/17MX ως δείκτης της δραστηριότητας του CYP2A6 καθώς ανταποκρίνεται στον θεωρητικό λόγο «μεταβολίτης(-ες)/φάρμακο» [Grant et al., 1983; Nowell et al., 2002].

Με δεδομένο την χρήση της καφεΐνης ως φαρμάκου-δείκτη, στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε ο μεταβολικός λόγος 17MU/(17MU+17MX) για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας του CYP2A6, ο οποίος προέρχεται από την τροποποίηση του λόγου 17MU/17MX, κατ' αναλογία με την τροποποίηση του λόγου 1MU/1MX προς 1MU/(1MU+1MX), ο οποίος εκφράζει την δραστηριότητα της XO (Grant et al., 1983; Carrillo and Benitez, 1994). Ο τροποποιημένος λόγος εκφράζει την συγκέντρωση του 17MU ως

ποσοστό της συνολικής οδού του CYP2A6 και παρουσίασε μικρότερη μεταβλητότητα σε βάθος χρόνου, σε ένα δείγμα υγιών εθελοντών, και για τον λόγο αυτό προτιμήθηκε έναντι του αρχικού (μη δημοσιευθέντα δεδομένα).

Στην παρούσα εργασία, οι μέσες τιμές του λόγου αυτού παρουσίασαν μη σημαντική αύξηση, της τάξης του 3,7%, μετά την κατανάλωση της μέντας. Σε άλλη *in vivo* μελέτη κατά την οποία διερευνήθηκε η επίδραση του υδατικού αφεψήματος μέντας στον μεταβολισμό της νικοτίνης σε καπνιστές δείχθηκε ότι ο μεταβολικός λόγος νικοτίνη/κοτινίνη στα ούρα αυξήθηκε σημαντικά, κατά 33%, μετά από 7ήμερη κατανάλωση μέντας. Καθώς η μετατροπή της νικοτίνης προς κοτινίνη οφείλεται στο CYP2A6 (Messina et al., 1997) συνάγεται ότι η κατανάλωση της μέντας ανέστειλε την δραστικότητα του CYP2A6 (Ghazi et al., 2011).

Σε άλλη *in vivo* μελέτη διερευνήθηκε η επίδραση του χυμού γκρέϊπ-φρουτ και του συστατικού του ναρινγκίνη στον μεταβολισμό της κουμαρίνης χωρίς να αναδειχθεί κάποιου είδους αλληλεπίδραση (Runkel et al., 1997). Η ναρινγκίνη είναι το 7-O-γλυκοσίδιο της φλαβανόνης ναρινγκενίνης η οποία ανήκει στην ίδια υποοικογένεια φλαβονοειδών όπως η εριοκίτρινη, το κύριο συστατικό του υδατικού διαλύματος μέντας. Άλλες *in vivo* και *in vitro* μελέτες κατά τις οποίες διερευνήθηκε η επίδραση διαφόρων άλλων φλαβονοειδών στη δραστικότητα του CYP2A6 έχουν δώσει αντιφατικά αποτελέσματα. Αναστολή του CYP2A6 έχει παρατηρηθεί σε *in vivo* και *in vitro* μελέτες από τα φλαβονοειδή όπως η απιγκενίνη, λουτεολίνη και κουερσετίνη, διάφορες ισοφλαβόνες (Nakajima et al., 2006; Prasopthum et al., 2015) και φλαβονόλες (Tiong et al., 2010), ενώ επαγωγή του CYP2A6 έχει παρατηρηθεί σε *in vivo* μελέτες από την ισοφλαβόνη γκενιστεΐνη και την φλαβονόλη κουερσετίνη με φάρμακο-δείκτη την καφεΐνη (Chen et al., 2009; Chen et al., 2011).

Τα αποτελέσματα της παρούσης εργασίας παρουσιάζουν εγγύτητα με τα συμπεράσματα της εργασίας που αφορούν στη συναφή με την εριοκίτρινη ουσία ναρινγκίνη η οποία διεσχίστηκε με το πλέον ειδικό υπόστρωμα για το CYP2A6, την κουμαρίνη. Όσον αφορά τα αντιφατικά αποτελέσματα που αναφέρονται στις άλλες εργασίες, είναι πιθανόν να σχετίζονται με τα διαφορετικά υποστρώματα και τις διαφορετικές εξειδικεύσεις που παρουσιάζουν σε σχέση με το CYP2A6.

ΧΟ

Η ΧΟ είναι πηγή ελευθέρων ριζών και η λειτουργικότητά της αυξάνεται κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας και επαναιμάτωσης των ιστών (ischemia-reperfusion injury), σε ασθένειες όπως η αρθρίτιδα, η ρευματοειδής αρθρίτιδα, το άσθμα και τα καρδιαγγειακά νοσήματα οι οποίες παρουσιάζονται πιο συχνά σε ηλικιωμένους (Kato et al., 1991; Saugstad, 1996). Η δραστικότητα της ΧΟ αναστέλλεται από την αλλοπουρινόλη (Grant et al., 1986) και επάγεται από την ιντερφερόνη-γ (Renton and Knickle, 1990), τον παράγοντα TNF-α, την ιντερλευκίνη-1β (Harrison, 2002), ενώ δεν φαίνεται να επηρεάζεται από την κατανάλωση αλκοόλ (Guercioli et al., 1991).

Στην παρούσα εργασία η μέση τιμή του δείκτη της δραστικότητας της ΧΟ ήταν σχεδόν ταυτόσημη στις περιόδους πριν και μετά την κατανάλωση της μέντας. Σε *in vitro* μελέτη δείχθηκε ότι τα φλαβονοειδή λουτεολίνη, εριοδικτυόλη και το καφεϊκό οξύ ήταν ισχυροί αναστολείς της ΧΟ. Για την εριοδικτυόλη η ποσοστιαία αναστολή της ΧΟ κυμάνθηκε από 12 έως 60%, κατά προσέγγιση, για συγκεντρώσεις από 0,2 έως 100 $\mu\text{mol/L}$ (Nguyen et al., 2004). Σε *in vivo* μελέτη, κατά την οποία χορηγήθηκαν 4,5g εριοδικτυόλης σε χυμό λεμονιού σε υγιείς εθελοντές, η μέγιστη συγκέντρωση στο πλάσμα προσέγγισε τα 2 $\mu\text{mol/L}$ (Miyake et al., 2006). Η συγκέντρωση αυτή, με βάση την εργασία των Nguyen et al., θα αναμενόταν να προκαλέσει αναστολή της ΧΟ της τάξης του 20%. Στην παρούσα εργασία η ημερήσια πρόσληψη της μέντας ήταν 4gr στα οποία η εκτιμώμενη, με βάση τη βιβλιογραφία, ποσότητα εριοδικτυόλης είναι 80-160mg. Η ποσότητα αυτή, συγκριτικά με τις προηγούμενες εργασίες, είναι σημαντικά χαμηλότερη ώστε να προκαλέσει την *in vivo* αναστολή της ΧΟ.

Με βάση τα ανωτέρω φαίνεται ότι η τακτική κατανάλωση του αφεψήματος μέντας δεν φαίνεται να συνεισφέρει στην άμυνα έναντι του οξειδωτικού στρες που οφείλεται σε ρευματικά και φλεγμονώδη νοσήματα.

NAT2

Σε *in vitro* μελέτη διερευνήθηκε η επίδραση διαφόρων φλαβονοειδών στην ενζυμική δραστικότητα της NAT2 και δείχθηκε ότι αυτά ασκούν ανασταλτική δραστηριότητα σε συνάρτηση με τη χημική τους δομή. Συγκεκριμένα, η ανασταλτική δραστηριότητα των

φλαβονοειδών ήταν ανάλογη του αριθμού των υδροξυλίων στο δακτύλιο B. Η αναστολή αυτή συντελέστηκε μέσω του μηχανισμού της μη συναγωνιστικής αναστολής, δηλαδή της αναστολής εκείνης κατά την οποία οι αναστολές προσδένονται σε σημείο διαφορετικό από την καταλυτική τριάδα αμινοξέων Cys-His-Asp του ενεργού κέντρου το ενζύμου. Μεταξύ των φλαβονοειδών που διερευνήθηκαν ήταν και η φλαβανόνη ταξιφολίνη η οποία, σε συγκέντρωση 1000 μM ανέστειλε τη δραστηριότητα της NAT2 σε ποσοστό ~50% (Kukongviriyapan et al., 2006). Στην παρούσα εργασία η μέση τιμή του δείκτη της δραστηριότητας της NAT2 παρουσίασε στατιστικώς σημαντική μείωση της τάξης του 8,5% μετά την περίοδο κατανάλωσης του αφεψήματος της μέντας. Δεδομένου ότι το κύριο συστατικό του αφεψήματος μέντας είναι η φλαβανόνη εριοικιτρίνη, φαίνεται ότι η παρατηρηθείσα, στην παρούσα εργασία, αναστολή της NAT2 οφείλεται στην ανωτέρω ουσία λόγω της δομικής ομοιότητας με την ταξιφολίνη.

Στο δείγμα των εθελοντών που συμμετείχαν, 8 από αυτούς εμφάνισαν το φαινότυπο του βραδέος ακετυλιωτή και ένας εθελοντής εμφάνισε τον φαινότυπο του ταχέως ακετυλιωτή. Ο διαχωρισμός έγινε με βάση την τιμή του μεταβολικού λόγου $\text{AFMU}/(\text{AFMU}+1\text{MU}+1\text{MX})$ 0,25 η οποία αποτελεί το σημείο του φαινοτυπικού διαχωρισμού (cut-off-point) σε δείγμα ελληνικού πληθυσμού (Begas et al., 2007). Μεταξύ των εθελοντών αυτών, 6 βραδείες ακετυλιωτές παρουσίασαν μείωση του μεταβολικού λόγου, 2 βραδείες ακετυλιωτές παρέμειναν αμετάβλητοι και ο ταχύς ακετυλιωτής παρουσίασε μείωση του μεταβολικού λόγου μετά την κατανάλωση της μέντας.

Επιδημιολογικά, ο φαινότυπος και ο γονότυπος του βραδέος ακετυλιωτή έχει συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο για εμφάνιση καρκίνου της ουροδόχου κύστης, ιδίως σε άτομα με υψηλή έκθεση σε αρωματικές αμίνες και σε καπνιστές (Yuan et al., 2008; Moore et al., 2011; Tao et al., 2012). Φαίνεται ότι οι βραδείες ακετυλιωτές είναι λιγότερο αποτελεσματικοί στην αποτοξίνωση από τις αρωματικές αμίνες και άλλα περιβαλλοντικά καρκινογόνα με αποτέλεσμα τον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου.

Στην παρούσα εργασία η μείωση της δραστηριότητας της NAT2 που παρατηρήθηκε μετά την κατανάλωση της μέντας δεν φαίνεται να ευνοεί την αποτοξίνωση μέσω αύξησης της N-ακετυλίωσης των ξενοβιοτικών αλλά είναι πιθανότερο να ευνοεί την μειωμένη μεταβολική ενεργοποίηση ξενοβιοτικών μέσω μειωμένης O-ακετυλίωσης. Η μεταβολική

αυτή οδός περιλαμβάνει, σε πρώτο στάδιο, την N-οξειδωση των ετεροκυκλικών αρωματικών αμινών των καλοψημένων κρεάτων, από ένζυμα της Φάσης Ι, και σε δεύτερο στάδιο την O-ακετυλίωση από την NAT2. Οι μεταβολίτες που προκύπτουν μέσω αυτής της διαδικασίας έχουν δυνατότητα μεταλλαξιγένεσης εξαιτίας της ικανότητάς τους να προσδένονται στο DNA (Buonarati et al., 1990; Wild et al., 1995).

Επιπλέον, η στατιστικώς σημαντική αυτή μείωση της δραστηριότητας της NAT2 μπορεί, ενδεχομένως, να αποτελεί παράγοντα μεταβολής της φαρμακοκινητικής συγχορηγούμενων φαρμάκων τα οποία απομακρύνονται μέσω ακετυλίωσης και κατά συνέπεια παράγοντα λήψης απόφασης για την τροποποίηση της δοσολογίας των φαρμάκων αυτών.

UGT1A1/1A6

Στην παρούσα μελέτη η εκτίμηση της δραστηριότητας των UGT1A1/1A6 έγινε μέσω του προσδιορισμού του ποσοστού της συζευγμένης παρακεταμόλης σε σχέση με την ολική. Η μέτρηση της ολικής, και κατ' επέκταση της συζευγμένης παρακεταμόλης, έγινε με τη βοήθεια του ενζύμου β-γλυκουρονιδάση το οποίο ήταν ανασυνδυσμένο από υπερέκφραση σε στέλεχος *Escherichia coli* BL21 και δεν παρουσιάζει καθόλου δραστηριότητα σουλφατάσης. Η χρήση του συγκεκριμένου ενζύμου κρίθηκε απαραίτητη καθώς, στα ούρα, η παρακεταμόλη είναι συζευγμένη με γλυκουρονικό και θειϊκό και έτσι η χρησιμοποίηση β-γλυκουρονιδάσης από *Helix pomatia*, η οποία παρουσιάζει και δευτερεύουσα δράση σουλφατάσης, δεν θα έδινε ξεκάθαρη εικόνα για την ποσότητα της γλυκουρονιδωμένης παρακεταμόλης και κατά συνέπεια της δράσης των UGT1A1/1A6. Με βάση τη χρησιμοποίηση του ενζύμου αυτού, στην παρούσα εργασία, δείχθηκε ότι δεν υπήρξε στατιστικώς σημαντική διαφορά στα ποσοστά της συζευγμένης παρακεταμόλης πριν και μετά τη χορήγηση της μέντας. Επομένως, φαίνεται ότι δεν επηρεάστηκε η δραστηριότητα των ενζύμων UGT1A1/1A6.

Σε *in vitro* μελέτη με μικροσώματα ήπατος ανθρώπου δείχθηκε ότι η δραστηριότητα της UGT1A1 με υπόστρωμα την οιστραδιόλη δεν επηρεάστηκε από την φλαβανόνη ναρινγκενίνη, ένα φλαβονοειδές που ανήκει στην δομικά παρόμοια υποομάδα με την εριοδικτυόλη, ένα από τα κύρια συστατικά της μέντας. Όσον αφορά το δεύτερο σε περιεκτικότητα συστατικό της μέντας, την φλαβόνη λουτεολίνη, δείχθηκε ότι οι παρόμοιες

δομικά, με αυτήν, флаβόνες αναστέλλουν τη δραστικότητα του ενζύμου (Williams et al., 2002).

Αντίθετα, σε άλλη *in vitro* μελέτη με ανθρώπινα κύτταρα ηπατώματος HepG2 δείχθηκε ότι η λουτεολίνη και άλλες флаβόνες είχαν επαγωγική δράση στο ένζυμο UGT1A1. Η δράση αυτή σχετίστηκε με την παρουσία 2 υδροξυλομάδων στον Α-δακτύλιο του μορίου, ενώ η παρουσία υδροξυλομάδας στην 3-θέση του δακτυλίου C καθώς και ο κορεσμός του δεσμού 2,3 ανέστειλε την επαγωγική δράση (Walle and Walle, 2002). Παρ' όλο που η εριοκιτρίνη δεν είχε περιληφθεί στα εξετασθέντα флаβονοειδή, είναι πιθανό ο κορεσμός του δεσμού 2,3 που υπάρχει στο μόριό της να ευθύνεται για την απουσία επαγωγής της UGT1A1 που παρατηρήθηκε στην παρούσα εργασία. Στην περίπτωση της λουτεολίνης, τα συμπεράσματα των ανωτέρω εργασιών είναι αλληλοσυγκρουόμενα και δεν μπορεί να εξαχθεί ασφαλές συμπέρασμα για την *in vitro* και κατ' επέκταση για την *in vivo* επίδρασή της στην δραστικότητα του UGT1A1.

Όσον αφορά, τέλος, το ροσμαρινικό οξύ έχει δειχθεί ότι η προσθήκη του στην δίαιτα των αρουραίων για δύο εβδομάδες δεν είχε επίδραση στην δραστικότητα της UGT πιθανότατα λόγω της μεταβολικής μετατροπής του πριν αυτό φτάσει στο ήπαρ (Debresac et al., 2001).

5. Συμπέρασμα

Κατά την παρούσα εργασία μελετήθηκε η δράση του αφεψήματος της μέντας στην *in vivo* δραστικότητα των ανθρώπινων ενζύμων του μεταβολισμού των ξενοβιοτικών CYP1A2, CYP2A6, XO, NAT2 και UGT1A1/1A6. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η δραστικότητα του CYP1A2 παρουσίασε τάση μείωσης, μετά την ημερήσια κατανάλωση αφεψήματος 4gr αποξηραμένων φύλλων μέντας, ενώ δεν επηρεάστηκε, σε σημαντικό βαθμό, η δραστικότητα των CYP2A6, XO και UGT1A1/1A6. Αντίθετα, η κατανάλωση της ανωτέρω ποσότητας μέντας ανέστειλε σε μικρό, αλλά στατιστικώς σημαντικό, βαθμό τη δραστηριότητα της NAT2. Είναι πιθανόν η επίδραση της μέντας στην NAT2 να επηρεάζει την αποβολή των φαρμάκων τα οποία απομακρύνονται μέσω ακετυλίωσης και κατά συνέπεια η χρήση της να απαιτεί την τροποποίηση των θεραπευτικών δοσολογιών των φαρμάκων αυτών.

Περισσότερες, τέλος, μελέτες απαιτούνται για την εκτίμηση της αναστολής της δραστικότητας του CYP1A2 από την μέντα ώστε να επιβεβαιωθεί το μέγεθος της χημειοπροστασίας από περιβαλλοντικά προκαρκινογόνα και της αλληλεπίδρασης με φάρμακα-υποστρώματα για το CYP1A2.

6. Βιβλιογραφία

1. Aranda, R., Domenech, E., Rus, A-D., Real, J.T., Sastre, J., Vina, J. et al. (2007). Age-related increase in xanthine oxidase activity in human plasma and rat tissues. *Free Radical Research*, 41, pp.1195-1200.
2. Arnaud, M.J. (2011). Pharmacokinetics and metabolism of natural methylxanthines in animal and man. *Handbook of Experimental Pharmacology*. 200, pp.33-91.
3. Atmane, N., Dairou, J., Paul, A., Dupret, J-M., Rodrigues-Lima, F. (2003). Redox regulation of the human xenobiotic metabolizing enzyme Arylamine N-acetyltransferase 1 (NAT1). *Journal of Biological Chemistry*, 278, pp.35086-35092.
4. Bebia, Z., Buch, S., Wilson, J., Frye, R., Romkes, M., Cecchetti, A. et al. (2004). Bioequivalence revisited: Influence of age and sex on CYP enzymes. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 76, pp. 618-627.
5. Begas, E., Kouvaras, E., Tsakalof, A., Papakosta, S., Asproдини, E.K. (2007). In vivo evaluation of CYP1A2, CYP2A6, NAT-2 and xanthine oxidase activities in a Greek population sample by the RP-HPLC monitoring of caffeine metabolic ratios. *Biomedical Chromatography*, 21, pp.190-200.
6. Begas, E., Kouvaras, E., Tsakalof, A.K., Bounitsi, M., Asproдини, E.K. (2015). Development and validation of a reversed-phase HPLC method for CYP1A2 phenotyping by use of a caffeine metabolite ratio in saliva. *Biomedical Chromatography*, 29(11), pp.1657-1663.
7. Benowitz, N.L., Peng, M., Jacob III, P. (2003) Effects of cigarette smoking and carbon monoxide on chlorzoxazone and caffeine metabolism. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 74, pp.468-474.
8. Bock, K.W. and Köhle, C. (2005). UDP-glucuronosyltransferase 1A6: structural, functional, and regulatory aspects. *Methods in Enzymology*, 400, pp.57-75.
9. Bock, K.W., Schrenk, D., Forster, A., Griese, E.U., Mörike, K., Brockmeier, D., Eichelbaum, M. (1994). The influence of environmental and genetic factors on CYP2D6, CYP1A2 and UDP-glucuronosyltransferases in man using sparteine, caffeine, and paracetamol as probes. *Pharmacogenetics*, 4(4), pp.209-218.

10. Boukouvala, S. and Sim, E. (2005) Structural analysis of the genes for human arylamine N-acetyltransferases and characterisation of alternative transcripts. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 96, pp.343-351.
11. Buening, MK., Chang, RL., Huang, MT., Fortner, JG., Wood, AW., Conney, AH. (1981). Activation and inhibition of benzo(a)pyrene and aflatoxin B1 metabolism in human liver microsomes by naturally occurring flavonoids. *Cancer Research*, 41(1), pp. 67-72.
12. Buonarati, MH., Turteltaub, KW., Shen, NH., Felton, JS. (1990). Role of sulfation and acetylation in the activation of 2-hydroxyamino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine to intermediates which bind DNA. *Mutation Research*, 245(3), pp.185-190.
13. Burchell, B., Lockley, DJ., Staines, A., Uesawa, Y., Coughtrie, MW. (2005). Substrate specificity of human hepatic udp-glucuronosyltransferases. *Methods Enzymology*, 400, pp 46-57.
14. Butler MA, Lang NP, Young JF, Caporaso NE, Vineis P, Hayes RB, et al. Determination of CYP1A2 and NAT2 phenotypes in human populations by analysis of caffeine urinary metabolites. *Pharmacogenetics* 1992, 2:116-127.
15. Campbell, ME., Spielberg, SP., Kalow, W. (1987). A urinary metabolite ratio that reflects systemic caffeine clearance. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 42(2), pp.157-165.
16. Camus, AM., Geneste, O., Honkakoski, P., Berezat, JC., Henderson, CJ., Wolf, CR. et al. (1993). High variability of nitrosamine metabolism among individuals: role of cytochromes P450 2A6 and 2E1 in the dealkylation of N-nitrosodimethylamine and N-nitrosodiethylamine in mice and humans. *Molecular Carcinogenesis*, 7, pp.268-275.
17. Carrillo, JA. and Benitez, J. (1994). Caffeine metabolism in a healthy Spanish population: N-acetylator phenotype and oxidation pathways. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 55, pp.293-304.
18. Carrillo, JA., Christensen, M., Ramos, SI., Alm, C., Dahl, M-L., Benitez, J. et al. (2000). Evaluation of Caffeine as an *In Vivo* Probe for CYP1A2 Using Measurements in Plasma, Saliva, and Urine. *Therapeutic Drug Monitoring*, 22, pp.409-417.
19. Chen, C. and Kong, AN. (2004). Dietary chemopreventive compounds and ARE/EpRE signaling. *Free Radical Biology & Medicine.*, 36(12), pp.1505-1516.

20. Chen, Y., Xiao, CQ., He, YJ., Chen, BL., Wang, G., Zhou, G., Zhang, W., Tan, ZR., Cao, S., Wang, LP., Zhou, HH. (2011). Genistein alters caffeine exposure in healthy female volunteers. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 67(4), pp.347-353.
21. Chen, Y., Xiao, P., Ou-Yang, DS., Fan, L., Guo, D., Wang, YN., Han, Y., Tu, JH., Zhou, G., Huang, YF., Zhou, HH. (2009). Simultaneous action of the flavonoid quercetin on cytochrome P450 (CYP) 1A2, CYP2A6, N-acetyltransferase and xanthine oxidase activity in healthy volunteers. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, 36(8), pp.828-833.
22. Debersac, P., Vernevaux, MF., Amiot, MJ., Suschetet, M., Siess, MH. (2001). Effects of a water-soluble extract of rosemary and its purified component rosmarinic acid on xenobiotic-metabolizing enzymes in rat liver. *Food and Chemical Toxicology*, 39(2), pp.109-117.
23. de Waard, PW., Peijnenburg, AA., Baykus, H., Aarts, JM., Hoogenboom, RL., van Schooten, FJ., de Kok, TM. (2008). A human intervention study with foods containing natural Ah-receptor agonists does not significantly show AhR-mediated effects as measured in blood cells and urine. *Chemico- Biological Interaction*, 176(1), pp.19-29.
24. Di, YM., Chow, VD., Yang, LP., Zhou, SF. (2009). Structure, function, regulation and polymorphism of human cytochrome P450 2A6. *Current Drug Metabolism*, 10(7), pp.754-780.
25. Djordjevic, N., Carrillo, JA., Gervasini, G., Jankovic, S., Aklillu, E. (2010). In vivo evaluation of CYP2A6 and xanthine oxidase enzyme activities in the Serbian population. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 66(6), pp.571-578.
26. Djordjevic, N., Carrillo, JA., Roh, HK., Karlsson, S., Ueda, N., Bertilsson, L., Aklillu, E. (2012). Comparison of N-acetyltransferase-2 enzyme genotype-phenotype and xanthine oxidase enzyme activity between Swedes and Koreans. *Journal of Clinical Pharmacology*, 52(10), pp.1527-1534.
27. Dorman, HJ., Koşar, M., Kahlos, K., Holm, Y., Hiltunen, R. (2003). Antioxidant properties and composition of aqueous extracts from *Mentha* species, hybrids, varieties, and cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(16), pp.4563-4569.

28. Dupret, JM. and Rodrigues-Lima, F. (2005). Structure and regulation of the drug-metabolizing enzymes arylamine N-acetyltransferases. *Current Medicinal Chemistry*, 12(3), pp.311-318.
29. Edenharder, R., von Petersdorff, I., Rauscher, R. (1993). Antimutagenic effects of flavonoids, chalcones and structurally related compounds on the activity of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ) and other heterocyclic amine mutagens from cooked food. *Mutation Research*, 287(2), pp.261-274.
30. European Medicines Agency. Evaluation of Medicines for Human Use. Assesement report on Mentha X Piperita L., Folium. Doc. Ref. EMEA/HMPC/193910/2007, London, 4 September 2008.
31. Evans, DA. (1989). N-acetyltransferase. *Pharmacology & Therapeutics*, 42, pp.157-234.
32. Faber, MS., Jetter, A., Fuhr, U. (2005). Assessment of CYP1A2 activity in clinical practice: why, how, and when? *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 97(3), pp.125-134.
33. Fecka, I. and Turek, S. (2007). Determination of water-soluble polyphenolic compounds in commercial herbal teas from Lamiaceae: peppermint, melissa, and sage. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 55(26), pp.10908-10917.
34. Fisher, MB., Vandenbranden, M., Findlay, K., Burchell, B., Thummel, KE., Hall, SD.,Wrighton, SA. (2000). Tissue distribution and interindividual variation in human UDP-glucuronosyltransferase activity: relationship between UGT1A1 promoter genotype and variability in a liver bank. *Pharmacogenetics*, 10(8), pp.727-739.
35. Foster, BC., Vandenhoek, S., Hana, J., Krantis, A., Akhtar, MH., Bryan, M., Budzinski, JW., Ramputh, A., Arnason, JT. (2003). In vitro inhibition of human cytochrome P450-mediated metabolism of marker substrates by natural products. *Phytomedicine*, 10(4), pp.334-342.
36. Fuhr, U., Woodcock, BG., Siewert, M. (1992). Verapamil and drug metabolism by the cytochrome P450 isoform CYP1A2. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 42, pp.463-464.
37. Fuhr, U., Anders, EM., Mahr, G., Sörgel, F., Staib, AH. (1992). Inhibitory potency of quinolone antibacterial agents against cytochrome P450IA2 activity in vivo and in vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 36, pp.942-948.

38. Fuhr, U. and Kummert, AL. (1995). The fate of maringin in humans: a key to grapefruit juice-drug interactions. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 58, pp.365-373.
39. Fuhr, U., Klittich, K., Staib, AH. (1993). Inhibitory effect of grapefruit juice and its bitter principal, naringenin, on CYP1A2 dependent metabolism of caffeine in man. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 35(4), pp.431-436.
40. Fuhr, U. and Rost, KL. (1994), Simple and reliable CYP1A2 phenotyping by the paraxanthine/caffeine ratio in plasma and in saliva. *Pharmacogenetics*, 4(3), pp.109-116.
41. Gallagher EP, Wienkers LC, Stapleton PL, Kunze KL, Eaton DL. Role of human microsomal and human complementary DNA-expressed cytochromes P4501A2 and P4503A4 in the bioactivation of aflatoxin B1. *Cancer Res* 1994, 54:101-108.
42. Ghazi, AM., Salhab, AS., Arafat, TA., Irshaid, YM. (2011). Effect of mint drink on metabolism of nicotine as measured by nicotine to cotinine ratio in urine of Jordanian smoking volunteers. *Nicotine & Tobacco Research*, 13(8), pp.661-667.
43. Ghotbi, R., Christensen, M., Roh, HK., Ingelman-Sundberg, M., Aklillu, E., Bertilsson, L. (2007). Comparisons of CYP1A2 genetic polymorphisms, enzyme activity and the genotype-phenotype relationship in Swedes and Koreans. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 63(6), pp.537-546.
44. Grant, DM., Tang, BK., Kalow, W. (1983). Variability in caffeine metabolism. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 33, pp.591-602.
45. Grant, DM., Tang, BK., Campbell, ME., Kalow, W. (1986). Effect of allopurinol on caffeine disposition in man. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 21, pp.454-458.
46. Gross, M., Kruisselbrink, T., Anderson, K., Lang, N., McGovern, P., Delongchamp, R. et al. (1999) Distribution and concordance of N-acetyltransferase genotype and phenotype in an American population. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 8, pp.683-692.
47. Gu, L., Gonzales, FJ., Kalow, W., Tang, BK. (1992). Biotransformation of caffeine, paraxanthine, theobromine, and theophylline by c-DNA-expressed human CYP1A2 and CYP2E1. *Pharmacogenetics*, 2, pp.73-77.
48. Guercioli, R., Szumlanski, C., Weinshilboum, RM. (1991). Human liver xanthine oxidase: nature and extent of individual variation. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 50, pp.663-672.

49. Gurley, BJ., Gardner, SF., Hubbard, MA., Williams, DK., Gentry, WB., Carrier, J., Khan, IA., Edwards, DJ., Shah, A. (2004). In vivo assessment of botanical supplementation on human cytochrome P450 phenotypes: Citrus aurantium, Echinacea purpurea, milk thistle, and saw palmetto. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 76(5), pp.428-440.
50. Han, X-M., Ouyang, D-S., Chen, X-P., Shu, Y., Jiang, C-H., Tan, Z-R., et al. (2002). Inducibility of CYP1A2 by omeprazole *in vivo* related to the genetic polymorphism of CYP1A2. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 5, pp.540–543.
51. Harris, RM., Wood, DM., Bottomley, L., Blagg, S., Owen, K., Hughes, PJ., Waring, RH., Kirk, CJ. (2004). Phytoestrogens are potent inhibitors of estrogen sulfation: implications for breast cancer risk and treatment. *Journal of Clinical Endocrinology Metabolism*, 89(4), pp.1779-1787.
52. Harrison, R. (2002). Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? *Free Radical Biology & Medicine*, 33, pp.774-797
53. Hein, DW. (2000). N-Acetyltransferase genetics and their role in predisposition to aromatic and heterocyclic amine-induced carcinogenesis. *Toxicology Letters*, 112-113, pp.349-356.
54. Hodek, P., Trefil, P., Stiborová, M. (2002). Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chemico-Biological Interactions*, 139(1), pp.1-21.
55. Hong, C-C., Tang, B-K., Rao, V., Agarwal, S., Martin, L., Tritchler, D., et al. (2004). Cytochrome P4501A2 (CYP1A2) activity, mammographic density, and oxidative stress: a cross-sectional study. *Breast Cancer Research*, 6, pp.R338-R351.
56. Jiang, Z., Dragin, N., Jorge-Nebert, LF., Martin, MV., Guengerich, FP., Aklillu, E., et al. (2006). Search for an association between the human CYP1A2 genotype and CYP1A2 metabolic phenotype. *Pharmacogenetic and Genomics*, 16, pp.359-367.
57. Kalow, W. and Tang, B-K. (1993). The use of caffeine for enzyme assays: a critical appraisal. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 53, pp.503-514.
58. Kanq, ZC., Tsai, SJ., Lee, H. (1999). Quercetin inhibits benzo[a]pyrene-induced DNA adducts in human Hep G2 cells by altering cytochrome P-450 1A1 gene expression. *Nutrition and Cancer*, 35(2), pp.175-179.

59. Kato, M., Morikawa, A., Kimura, H., Shimizu, T., Nakano, M., Kuroume, T. (1991). Effects of antiasthma drugs on superoxide anion generation from human polymorphonuclear leukocytes or hypoxanthine-xanthine oxidase system. *International Archives of Allergy and Immunology*, 96, pp.128-133.
60. Kim, HJ., Lee, SB., Park, SK., Kim, HM., Park, YI., Dong, MS. (2005). Effects of hydroxyl group numbers on the B-ring of 5,7-dihydroxyflavones on the differential inhibition of human CYP 1A and CYP1B1 enzymes. *Archives of Pharmacal Research*, 28(10), pp.1114-1121.
61. King, CD., Rios, GR., Assouline, JA., Tephly, TR. (1999). Expression of UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) 2B7 and 1A6 in the human brain and identification of 5-hydroxytryptamine as a substrate. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 365(1), pp.156-162.
62. Kirby, GM., Wolf, CR., Neal, GE., Judah, DJ., Henderson, CJ., Srivatanakul, P., et al. (1993). In vitro metabolism of aflatoxin B1 by normal and tumorous liver tissue from Thailand. *Carcinogenesis*, 14, pp.2613-2620.
63. Kohno, H., Tanaka, T., Kawabata, K., Hirose, Y., Sugie, S., Tsuda, H., Mori, H. (2002). Silymarin, a naturally occurring polyphenolic antioxidant flavonoid, inhibits azoxymethane-induced colon carcinogenesis in male F344 rats. *International Journal of Cancer*, 101(5), pp.461-468.
64. Kooij, A., Schijns, M., Frederiks, WM., Van Noorden, CJ., James, J. (1992). Distribution of xanthine oxidoreductase activity in human tissues-a histochemical and biochemical study. *Virchows Archiv B Cell Pathology Including Molecular Pathology*, 63, pp.17-23.
65. Kot, M. and Daniel, WA. (2008). The relative contribution of human cytochrome P450 isoforms to the four caffeine oxidation pathways: an in vitro comparative study with cDNA-expressed P450s including CYP2C isoforms. *Biochemical Pharmacology*, 76(4), pp.543-551.
66. Kukongviriyapan, V., Phromsopha, N., Tassaneeyakul, W., Kukongviriyapan, U., Sripa, B., Hahnvajanawong, V., Bhudhisawasdi, V. (2006). Inhibitory effects of polyphenolic compounds on human arylamine N-acetyltransferase 1 and 2. *Xenobiotica*, 36(1), pp.15-28.

67. Lampe, JW., King, IB., Li, S., Grate, MT., Barale, KV., Chen, C., Feng, Z., Potter, JD. (2000) Brassica vegetables increase and apiaceous vegetables decrease cytochrome P450 1A2 activity in humans: changes in caffeine metabolite ratios in response to controlled vegetable diets. *Carcinogenesis*, 21(6), pp.1157-1162.
68. Landi, MT., Sinha, R., Lang, NP., Kadlubar, FF. (1999). Human cytochrome P4501A2. In Ryder W (ed) Metabolic polymorphisms and susceptibility to cancer. *IARC Scientific Publications no 148*. International Agency for Research in Cancer, Lyon, pp.173-195.
69. Lang, NP., Butler, MA., Massengill, J., Lawson, M., Stotts, RC., Hauer-Jansen, M., et al. (1994). Rapid metabolic phenotypes for acetyltransferase and cytochrome P4501A2 and putative exposure to food-borne heterocyclic amines increase the risk for colorectal cancer of polyps. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 3, pp.675-682.
70. Le Bail, JC., Laroche, T., Marre-Fournier, F., Habrioux, G. (1998). Aromatase and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase inhibition by flavonoids. *Cancer Letters*, 133(1), pp.101-106.
71. Le Marchand, L., Franke, AA., Custer, L., Wilkens, LR., Cooney, RV. (1997). Lifestyle and nutritional correlates of cytochrome CYP1A2 activity: inverse associations with plasma lutein and alpha-tocopherol. *Pharmacogenetics*, 7, pp.11-19.
72. Lee, H., Yeom, H., Kim, YG., Yoon, CN., Jin, C., Choi, JS., Kim, BR., Kim, DH. (1998). Structure-related inhibition of human hepatic caffeine N3-demethylation by naturally occurring flavonoids. *Biochemical Pharmacology*, 55(9), pp.1369-1375.
73. Lelo, A., Kjellen, G., Birkett, DJ., Miners, JO. (1989). Paraxanthine metabolism in humans: determination of metabolic partial clearances and effects of allopurinol and cimetidine. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 248, pp.315-319.
74. Lelouet, H., Bechtel, YC., Paitaud, G., Brientini, MP., Miguet, JP., Bechtel, P.R. (2001). Caffeine metabolism in a group of 67 patients with primary biliary cirrhosis. *International Journal of Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 39, pp.25-32.
75. Levartovsky, D., Lagziel, A., Sperling, O., Liberman, U., Yaron, M., Hosoya, T., et al. (2000). XDH gene mutation is the underlying cause of classical xanthinuria: A second report. *Kidney International*, 57, pp.2215–2220.

76. Lin, JH. and Lu, AYH. (1998). Inhibition and Induction of Cytochrome P450 and the Clinical Implications. *Clinical Pharmacokinetics*, 35, pp.361-390.
77. Loi, C-M., Parker, BM., Cusack, BJ., Vestal, RE. (1993). Individual and combined effects of cimetidine and ciprofloxacin on the theophylline metabolism in male nonsmokers. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 36, pp.195-200.
78. Mackenzie, PI., Rodbourn, L., Iyanagi, T. (1993). Glucuronidation of carcinogen metabolites by complementary DNA-expressed uridine 5'-diphosphate glucuronosyltransferases. *Cancer Research*, 53(7), pp 1529-1533.
79. Malfatti, MA. and Felton, JS. (2001). N-glucuronidation of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) and N-hydroxy-PhIP by specific human UDP-glucuronosyltransferases. *Carcinogenesis*, 22(7), pp.1087-1093.
80. Maliakal, PP. and Wanwimolruk, S. (2001). Effect of herbal teas on hepatic drug metabolizing enzymes in rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 53(10), pp.1323-1329.
81. Marín, L., Miguélez, EM., Villar, CJ., Lombó, F. (2015). Bioavailability of dietary polyphenols and gut microbiota metabolism: antimicrobial properties. *Biomed Research International*, 2015, pp.905215.
82. Marshall, W. Κλινική Βιοχημεία. 3^η Έκδοση, Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας, Αθήνα, 1998, pp. 98-101.
83. Martins, N., Barros, L., Santos-Buelga, C., Henriques, M., Silva, S., Ferreira, IC. (2015). Evaluation of bioactive properties and phenolic compounds in different extracts prepared from *Salvia officinalis* L. *Food Chemistry*, 170, pp. 378-385.
84. McGill, MR. and Jaeschke, H. (2013). Metabolism and disposition of acetaminophen: recent advances in relation to hepatotoxicity and diagnosis. *Pharmaceutical Research*, 30(9), pp.2174-2187.
85. McKay, DL. and Blumberg, JB. (2006). A review of the bioactivity and potential health benefits of peppermint tea (*Mentha piperita* L.). *Phytotherapy Research*. 20(8), pp.619-633.

86. Messina, ES., Tyndale, RF., Sellers, EM. (1997). A major role for CYP2A6 in nicotine C-oxidation by human liver microsomes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 282, pp.1608-1614.
87. Miranda, CL., Aponso, GL., Stevens, JF., Deinzer, ML., Buhler, DR. (2000). Prenylated chalcones and flavanones as inducers of quinone reductase in mouse Hepa 1c1c7 cells. *Cancer Letters*, 149(1-2), pp.21-29.
88. Mitchell, KR. and Warshawsky, D. (2003). Xenobiotic inducible regions of the human arylamine N-acetyltransferase 1 and 2 genes. *Toxicology Letters*, 139, pp.11-23.
89. Miyake, Y., Sakurai, C., Usuda, M., Fukumoto, S., Hiramitsu, M., Sakaida, K., Osawa, T., Kondo, K. (2006). Difference in plasma metabolite concentration after ingestion of lemon flavonoids and their aglycones in humans. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 52(1), pp.54-60.
90. Moon, YJ., Wang, X., Morris, ME. (2006). Dietary flavonoids: effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. *Toxicology In Vitro*, 20(2), pp.187-210.
91. Moore, LE., Baris, DR., Figueroa, JD., Garcia-Closas, M., Karagas, MR., Schwenn, MR., Johnson, AT., Lubin, JH., Hein, DW., Dagnall, CL., Colt, JS., Kida, M., Jones, MA., Schned, AR., Cherala, SS., Chanock, SJ., Cantor, KP., Silverman, DT., Rothman, N. (2011). GSTM1 null and NAT2 slow acetylation genotypes, smoking intensity and bladder cancer risk: results from the New England bladder cancer study and NAT2 meta-analysis. *Carcinogenesis*, 32(2), pp.182-189.
92. Nakajima, M., Yokoi, T., Mizutani, M., Shin, S., Kadlubar, FF., Kamataki, T. (1994). Phenotyping of CYP1A2 in Japanese population by analysis of caffeine urinary metabolites: absence of mutation prescribing the phenotype in the CYP1A2 gene. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 3, pp.413-421.
93. Nakajima, M., Yokoi, T., Mizutani, M., Kinoshita, M., Funayama, M., Kamataki, T. (1999). Genetic polymorphism in the 5'-flanking region of human CYP1A2 gene: effect on the CYP1A2 inducibility in humans. *Journal of Biochemistry*, 125, pp.803-808.
94. Nakajima, M., Itoh, M., Yamanaka, H., Fukami, T., Tokudome, S., Yamamoto, Y., Yamamoto, H., Yokoi, T. (2006). Isoflavones inhibit nicotine C-oxidation catalyzed by human CYP2A6. *Journal of Clinical Pharmacology*, 46(3), pp.337-344.

95. Nguyen, MT., Awale, S., Tezuka, Y., Tran, QL., Watanabe, H., Kadota, S. (2004). Xanthine oxidase inhibitory activity of Vietnamese medicinal plants. *Biological and Pharmacology Bulletin*, 27(9), pp.1414-1421.
96. Nowell, S., Sweeney, C., Hammons, G., Kadlubar, FF., Lang, NP. (2002). CYP2A6 activity by caffeine phenotyping: association with colorectal cancer risk. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 11, pp.377-383.
97. Okey, AB., Franc, MA., Moffat, ID., Tijet, N., Boutros, PC., Korkalainen, M., et al. (2005). Toxicological implications of polymorphisms in receptors for xenobiotic chemicals: the case of the aryl hydrocarbon receptor. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 207(2 Suppl), pp.43-51.
98. Okumura, K., Tomoko, K., Chikazawa, S., Komada, F., Iwakawa, S., Tanigawara, Y. (1997), Genotyping of N-acetylation polymorphism and correlation with procainamide metabolism. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 61, pp.509-517.
99. Olson, J. Κλινική Φαρμακολογία Διασκεδαστικά Απλή, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο, 1997, p. 7.
100. Oscarson, M. (2001). Genetic polymorphisms in the cytochrome P450 2A6 (CYP2A6) gene: implications for interindividual differences in nicotine metabolism. *Drug Metabolism and Disposition*, 29, pp.91-95.
101. Parke, DV. and Ioannides, C. (1981). Role of mixed-function oxidases in the formation of biological reactive intermediates. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 136, pp.23-38.
102. Parkinson, A., Mudra, DR., Johnson, C., Dwyer, A., Carroll, KM. (2004). The effects of gender, age, ethnicity, and liver cirrhosis on cytochrome P450 enzyme activity in human liver microsomes and inducibility in cultured human hepatocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 199, pp.193-209.
103. Pavsek, P. and Dvorak, Z. (2008). Xenobiotic-induced transcriptional regulation of xenobiotic metabolizing enzymes of the cytochrome P450 superfamily in human extrahepatic tissues. *Current Drug Metabolism*, 9, pp.129-143.

104. Pelkonen, O., Turpeinen, M., Hakkola, J., Honkakoski, P., Hukkanen, J., Raunio, H. (2008). Inhibition and induction of human cytochrome P450 enzymes: current status. *Archives of Toxicology*, 82(10), pp.667-715.
105. Pelkonen, O., Rautio, A., Raunio, H., Pasanen, M. (2000). CYP2A6: a human coumarin 7-hydroxylase. *Toxicology*, 144, pp.139-147.
106. Perera, V., Gross, AS., McLachlan, AJ. (2010). Caffeine and paraxanthine HPLC assay for CYP1A2 phenotype assessment using saliva and plasma. *Biomedical Chromatography*, 24(10), pp.1136-44.
107. Pollock, BG., Wylie, M., Stack, JA., Sorisio, DA., Thompson, DS., Kirshner, MA., et al. (1999). Inhibition of caffeine metabolism by estrogen replacement therapy in postmenopausal women. *Journal of Clinical Pharmacology*, 39, pp.936-940.
108. Prasopthum, A., Pouyfung, P., Sarapusit, S., Srisook, E., Rongnoparut, P. (2015). Inhibition effects of Vernonia cinerea active compounds against cytochrome P450 2A6 and human monoamine oxidases, possible targets for reduction of tobacco dependence. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 30(2), pp.174-181.
109. Rasmussen, BB., Nielsen, TL., Brosen, K. (1998). Fluvoxamine is a potent inhibitor of the metabolism of caffeine in vitro. *Pharmacology and Toxicology*, 83, pp.240-245.
110. Raunio, H. and Rahnasto-Rilla, M. (2012). CYP2A6: genetics, structure, regulation, and function. *Drug Metabolism and Drug Interactions*, 27(2), pp.73-88.
111. Relling, MV., Lin, J-S., Ayers, GD., Evans, WE. (1992), Racial and gender differences in N-acetyltransferase, xanthine oxidase, and CYP1A2 activities. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 52, pp.643-658.
112. Renton, KW. and Knickle, LC. (1990). Regulation of hepatic cytochrome P450 during infectious disease. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 68, pp.777-781.
113. Roberts, DW., Doerge, DR., Churchwell, MI., Gamboa da Costa, G., Marques, MM., Tolleson, WH. (2004). Inhibition of extrahepatic human cytochromes P450 1A1 and 1B1 by metabolism of isoflavones found in Trifolium pratense (red clover). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(21), pp.6623-6632.
114. Rodrigues-Lima, F., Dairou, J., Dupret, JM. (2008). Effect of environmental substances on the activity of arylamine N-acetyltransferases. *Current Drug Metabolism*, 9(6), pp.505-9.

- 115.Rostami-Hodjegan, A., Nurminen, S., Jackson, PR., Tucker, GT. (1996). Caffeine urinary metabolite ratios as markers of enzyme activity: a theoretical assessment. *Pharmacogenetics*, 6, pp.121-149.
- 116.Runkel, M., Bourian, M., Tegtmeier, M., Legrum, W. (1997). The character of inhibition of the metabolism of 1,2-benzopyrone (coumarin) by grapefruit juice in human. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 53(3-4), pp.265-269.
- 117.Sachse, C., Brockmoller, J., Bauer, S., Roots, I. (1999). Functional significance of C—A polymorphism in intron-1 of the cytochrome CYP1A2 gene tested with caffeine. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 47, pp.445-449.
- 118.Sachse, C., Bhambra, U., Smith, G., Lightfoot, TJ., Barrett, JH., Scollay, J., et al. (2003). Colorectal Cancer Study Group. Polymorphisms in the cytochrome P450 CYP1A2 gene (CYP1A2) in colorectal cancer patients and controls: allele frequencies, linkage disequilibrium and influence on caffeine metabolism. *British Journal Clinical Pharmacology*, 55, pp. 68-76.
- 119.Saugstad, OD. (1996). Role of xanthine oxidase and its inhibitor in hypoxia: reoxygenation injury. *Pediatrics*, 98, pp.103-107.
- 120.Shimada, T., Yamazaki, H., Mimura, M., Inui, Y., Guengerich, FP. (1994). Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *Journal Pharmacology Experimentals and Therapeutics*, 270, pp.414-423.
- 121.Sim, E., Fakis, G., Laurieri, N., Boukouvala, S. (2012). Arylamine N-acetyltransferases— from drug metabolism and pharmacogenetics to identification of novel targets for pharmacological intervention. *Advances in Pharmacology*, 63, pp.169-205.
- 122.Sim, SC. and Ingelman-Sundberg, M. (2010). The Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature website: a peer-reviewed database of CYP variants and their associated effects. *Human Genomics*, 4(4), pp.278-281.
- 123.Sinha, R., Rothman, N., Brown, ED., Mark, SD., Hoover, RN., Caporaso, NE., et al. (1994). Pan-Fried Meat Containing High Levels of Heterocyclic Aromatic Amines but Low Levels of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Induces Cytochrome P4501A2 Activity in Humans. *Cancer Research*, 54, pp. 6154-6159.

- 124.Sinha, R. and Rothman, N. (1999). Role of well-done, grilled meat, heterocyclic amines (HCAs) in the etiology of human cancer. *Cancer Letters*, 143, pp.189-194.
- 125.Smith, G., Stubbins, MJ., Harries, LW., Wolf, CR. (1998). Molecular genetics of the human cytochrome P450 monooxygenase superfamily. *Xenobiotica*, 28, pp.1129-1165.
- 126.Sotaniemi, EA., Rautio, A., Backstrom, M., Arvela, P., Pelkonen, O. (1999). CYP3A4 and CYP2A6 activities marked by the metabolism of lignocaine and coumarin in patients with liver and kidney diseases and epileptic patients. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 39, pp.71-76.
- 127.Stillwell, WG., Turesky, RJ., Sinha, R., Skipper, PL., Tannenbaum, SR. (1999). Biomonitoring of heterocyclic aromatic amine metabolites in human urine. *Cancer Letters*, 143(2), pp.145-148.
- 128.Stryer, L. Βιοχημεία. 2η Έκδοση, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο, 1997: 617, pp. 673-674.
- 129.Tang, BK., Grant, DM., Kalow, W. (1983). Isolation and identification of 5-acetylamino-6-formylamino-3-methyluracil as a major metabolite of caffeine in man. *Drug Metabolism and Disposition*, 11, pp.218-220.
- 130.Tao, L., Xiang, YB., Chan, KK., Wang, R., Gao, YT., Yu, MC., Yuan, JM. (2012). Cytochrome P4501A2 phenotype and bladder cancer risk: The Shanghai bladder cancer study. *International Journal of Cancer*, 130(5), pp.1174-1183.
- 131.Thornton-Manning, J., Appleton, ML., Gonzalez, FJ., Yost, GS. (1996). Metabolism of 3-methylindole by vaccinia-expressed P450 enzymes: correlation of 3-methyleneindolenine formation and protein-binding. *Pharmacology Experimental Therapeutics*, 276, pp.21-29.
- 132.Tiong, KH., Yiap, BC., Tan, EL., Ismail, R., Ong, CE. (2010). In vitro modulation of naturally occurring flavonoids on cytochrome P450 2A6 (CYP2A6) activity. *Xenobiotica*, 40(7), pp.458-66.
- 133.Tsutsumi, K., Kotegawa, T., Matsuki, S., Tanaka, Y., Ishii, Y., Kodama, Y., et al. (2001). The effect of pregnancy on cytochrome P4501A2, xanthine oxidase, and N-acetyltransferase activities in humans. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 70, pp.121-125.

134. Vistisen, K., Loft, S., Poulsen, HE. (1991). Cytochrome P4501A2 activity in man measured by caffeine metabolism: effect of smoking, broccoli and exercise. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 283, pp.407-411.
135. Vistisen, K., Poulsen, HE., Loft, S. (2004). Foreign compound metabolism capacity in man measured from metabolites of dietary caffeine. *Carcinogenesis*, 13, pp.1561-1568.
136. Vistisen, K., Loft Olsen, JH., Vallentin, S., Ottesen, S., Hirsch, FR. (2004). Low CYP1A2 activity associated with testicular cancer. *Carcinogenesis*, 25, pp.923-929.
137. Volak, LP., Hanley, MJ., Masse, G., Hazarika, S., Harmatz, JS., Badmaev, V., Majeed, M., Greenblatt, DJ., Court, MH. (2013). Effect of a herbal extract containing curcumin and piperine on midazolam, flurbiprofen and paracetamol (acetaminophen) pharmacokinetics in healthy volunteers. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 75(2), pp.450-62.
138. Voutsinas, J., Wilkens, LR., Franke, A., Vogt, TM., Yokochi, LA., Decker, R., Le Marchand, L. (2013). Heterocyclic amine intake, smoking, cytochrome P450 1A2 and N-acetylation phenotypes, and risk of colorectal adenoma in a multiethnic population. *Gut*, 62(3), pp.416-422.
139. Walle, UK. and Walle, T. (2002). Induction of human UDP-glucuronosyltransferase UGT1A1 by flavonoids-structural requirements. *Drug Metabolism and Disposition*, 30(5), pp.564-569.
140. Wenk, M., Todesco, L., Krähenbühl, S. (2004). Effect of St John's wort on the activities of CYP1A2, CYP3A4, CYP2D6, N-acetyltransferase 2, and xanthine oxidase in healthy males and females. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 57(4), pp.495-499.
141. Wild, D., Feser, W., Michel, S., Lord, HL., Josephy, PD. (1995). Metabolic activation of heterocyclic aromatic amines catalyzed by human arylamine N-acetyltransferase isozymes (NAT1 and NAT2) expressed in *Salmonella typhimurium*. *Carcinogenesis*, 16(3), pp.643-648.
142. Williams, JA., Ring, BJ., Cantrell, VE., Campanale, K., Jones, DR., Hall, SD., Wrighton, SA. (2002). Differential modulation of UDP-glucuronosyltransferase 1A1 (UGT1A1)-catalyzed estradiol-3-glucuronidation by the addition of UGT1A1 substrates and other compounds to human liver microsomes. *Drug Metabolism and Disposition*, 30(11), pp.1266-1273.

143. Wong, P., Villeneuve, G., Tessier, V., Banerjee, K., Nedev, H., Jean-Claude, B.J., et al. (2002). Stability of 5-acetamido-6-formylamino-3-methyluracil in buffers and urine. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 28, pp.693–700.
144. Xiao, J., Huang, W.H., Peng, J.B., Tan, Z.R., Ou-Yang, D.S., Hu, D.L., Zhang, W., Chen, Y. (2014). Quercetin significantly inhibits the metabolism of caffeine, a substrate of cytochrome P450 1A2 unrelated to CYP1A2*1C (-2964G>A) and *1F (734C>A) gene polymorphisms. *Biomed Research International*, 2014, 405071.
145. Yamazaki, H., Shaw, P.M., Guengerich, F.P., Shimada, T. (1998). Roles of cytochromes P450 1A2 and 3A4 in the oxidation of estradiol and estrone in human liver microsomes. *Chemical Research in Toxicology*, 11, pp.659-665.
146. Yamazaki, H., Inui, Y., Yun, C.H., Guengerich, F.P., Shimada, T. (1992). Cytochrome P450 2E1 and 2A6 enzymes as major catalysts for metabolic activation of N-nitrosodialkylamines and tobacco-related nitrosamines in human liver microsomes. *Carcinogenesis*, 13, pp.1789-1794.
147. Yuan, J.M., Chan, K.K., Coetzee, G.A., Castelao, J.E., Watson, M.A., Bell, D.A., Wang, R., Yu, M.C. (2008). Genetic determinants in the metabolism of bladder carcinogens in relation to risk of bladder cancer. *Carcinogenesis*, 29(7), pp.1386-1393.
148. Zheng, J., Chen, B., Jiang, B., Zeng, L., Tang, Z.R., Fan, L., Zhou, H.H. (2010). The effects of puerarin on CYP2D6 and CYP1A2 activities in vivo. *Archives Pharmacal Research*, 33(2), pp.243-246.
149. Zuber, R., Modrianský, M., Dvorák, Z., Rohovský, P., Ulrichová, J., Simánek, V., Anzenbacher, P. (2002). Effect of silybin and its congeners on human liver microsomal cytochrome P450 activities. *Phytotherapy Research*, 16(7), pp.632-638.