

# Metabolizam flavonoida posredovan citokromom P450 1A2

---

**Bardić, Marija**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2018**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:882811>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-03-06**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



**Marija Bardić**

**Metabolizam flavonoida posredovan  
citokromom P450 1A2**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2018.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Biokemija lijekova Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Zavodu za farmaceutsku kemiju pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Mirze Bojića, docenta Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Želim se zahvaliti doc. dr. sc. Mirzi Bojiću koji mi je omogućio da pod njegovim mentorstvom izradim diplomski rad. Zahvalna sam na stručnom vodstvu, savjetima, pomoći i strpljenju tijekom izrade ovog rada.

Veliko hvala upućujem Goranu Benkoviću, mag. pharm., koji mi je pružio pomoć pri interpretaciji rezultata i posljedično pisanju rada.

Zahvaljujem se svim svojim prijateljima koji su uvijek uz mene, pružaju mi podršku i nesebično razumijevanja. Posebno hvala Ani na bezuvjetnoj vjeri u mene, Barbari na nezaboravnim cimerskim danima i Silviji na ludim razgovorima i planovima.

Najveću zahvalnost upućujem svojoj maloj obitelji koja mi je pružila bezuvjetnoj podršku i razumijevanje tijekom cijelog studija. Mama i Ivan veliko hvala na svemu, moj uspjeh je i vaš.

Bez svih Vas pisanje ovog rada i studiranje ne bi bilo uspješno, veliko hvala svima!

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
1.1. Flavonoidi.....	2
1.1.1. Uloga flavonoida u biljkama.....	2
1.1.2. Kemija i podjela flavonoida.....	3
1.1.3. Flavonoidima bogata hrana.....	6
1.1.4. Metabolizam flavonoida u ljudi.....	7
1.1.5. Biološki učinci flavonoida.....	9
1.2. Citokrom P450 1A2.....	12
1.2.1. Ekspresija i polimorfizam citokroma P450 1A2.....	13
1.2.2. Supstrati i reakcije.....	14
1.2.3. Induktori i inhibitori.....	17
<b>2. OBRAZLOŽENJE TEME</b> .....	19
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	22
3.1. Supstancije.....	23
3.2. Instrumenti i oprema.....	24
3.3. Postupak.....	24
3.4. Metoda.....	26
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	28
4.1. Apigenin.....	29
4.2. Kemferol.....	35
4.3. Flavon.....	36

4.4. 7-hidroksiflavon.....	38
4.5. Galangin.....	40
4.6. 3,7-dihidroksiflavon.....	40
4.7. 6-hidroksiflavon.....	42
4.8. Akacetin.....	44
4.9. Naringenin.....	46
4.10. Sakuranetin.....	48
4.11. Tangeretin.....	50
<b>5. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>53</b>
<b>6. LITERATURA.....</b>	<b>55</b>
<b>7. SAŽETAK/SUMMARY.....</b>	<b>60</b>
<b>7.1. SAŽETAK.....</b>	<b>61</b>
<b>7.2. SUMMARY.....</b>	<b>62</b>

**TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/ BASIC DOCUMENTATION CARD**

# **1.UVOD**

## **1.1.FLAVONOIDI**

Hrana biljnog podrijetla sadrži mnoge spojeve koji mogu mijenjati enzimske i kemijske reakcije te stoga mogu pozitivno i negativno utjecati na ljudsko zdravlje. Biljke i biljni lijekovi su konzumirani od dolaska ljudskog života na zemlju pa su stoga od davnina poznati u održavanju zdravlja. Ovaj doprinos potječe od raznih biološki aktivnosti spojeva koje nazivamo fitonutrijentima ili fitokemikalijama, a jedna od većih skupina ovih spojeva su flavonoidi i njihovi polimeri (Beecher, 2003). Flavonoidi su velika grupa biljnih sekundarnih metabolita koja osigurava brojna povoljna svojstva, ali budući da su strani spojevi, ksenobiotici, primjenu flavonoida baš kao i lijekova treba uzeti s oprezom (Kumar i Pandey, 2013).

Zabilježen je porast interesa za flavonoide u terapijskom potencijalu zbog sve više blagotvornih učinaka prehrambenih flavonoida, no potrebno je opsežno istražiti metabolizam flavonoida, utjecaj interindividualnih varijabilnosti na metabolizam, što nastaje te što je zapravo odgovorno za njihove učinke (Cassidy i Minihane, 2017).

### **1.1.1. ULOGA FLAVONOIDA U BILJKAMA**

Flavonoidi su biljni pigmenti koji se sintetiziraju iz fenilalanina, obično ih primjećujemo kao nijanse žute, narančaste, crvene, plave boje cvjetova i plodova (Slika 1). Budući da su vrlo rasprostranjeni botaničari ih koriste za taksonomsku klasifikaciju. Pojavljuju se u gotovo svim biljnim dijelovima, osobito fotosintetizirajućim dijelovima biljne stanice, ali nema dokaza da sudjeluju u fotosintetskom procesu (Tiwari i Husain, 2017). U biljkama flavonoidi igraju važnu ulogu u borbi protiv oksidativnog stresa i djeluju kao regulatori rasta.

Kao i kod ljudi tako i kod biljka promjene mogu izazvati stvaranje reaktivnih kisikovih specija (nadalje: ROS) koje mogu dovesti do oksidativnog stresa. Kada su uvjeti okoliša ograničavajući (suša, niska/visoka temperature, nestašica hranjivih tvari) smanjuje se količina ROS detoksificirajućih enzima u kloroplastu pa se povećava biosinteza flavonoida koji pomažu u uklanjanju ROS-a. Flavonoidi imaju sposobnost apsorbirati UV-zračenja, inhibirati stvaranja ROS-a i gasiti ROS nakon što se formirao. Struktura flavonoida određuje antioksidativni kapacitet i sposobnost apsorpcije UV-zračenja, pa tako dihidroksi B prsten ima najveći antioksidativni kapacitet, a monohidroksilirani B prsten ima veću sposobnost apsorpcije zračenja (Kumar i Pandey, 2013).

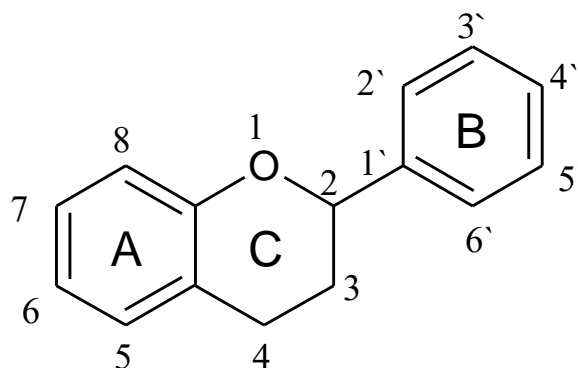
Flavonoidi u biljkama služe za rast biljaka, razvoj i obranu. Oni inhibiraju rast biljke inhibicijom egzocitoze auksina (indol-3-octena kiselina) i mogu modulirati aktivnost proteina uključenih u rast stanice djelujući kao regulatori transkripcije (Havsteen, 2002).



**Slika 1.** Flavonoidi su pigmenti odgovorni za boju latica cvjetova (preuzeto s <https://www.proflowers.com>)

### 1.1.2. KEMIJA I PODJELA FLAVONOIDA

Flavonoidi imaju polifenolnu strukturu koja se temelji na 15-članom ugljikovom kosturu. Struktura se sastoji od 2 benzenska prstena (A i B) povezana preko „mosta“ od 3 ugljika koji postaje dio heterocikličkog prstena kada se kombinira s kisikom i 2 ugljikova atoma A prstena (Slika 2; Kumar i Pandey, 2013).



**Slika 2.** Opća struktura flavonoida



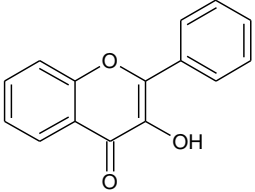
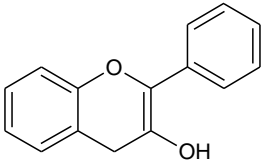
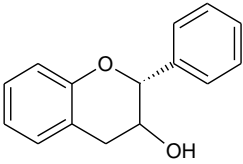
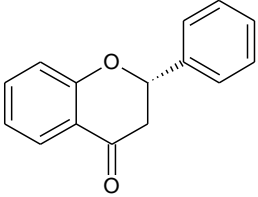
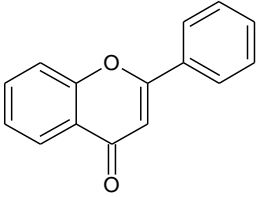
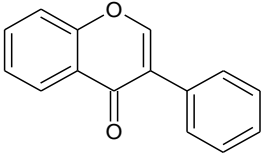
Flavonoidna skupina spojeva ovisno o položaju vezanja aromatskog prstena (B prstena) na heterociklički prsten dijeli se na flavonoide (aromatski prsten vezan na položaj 2) i izoflavonoide (aromatski prsten vezan na položaj 3). Različite grupe flavonoida se razlikuju u stupnju oksidacije i obrascu supstitucije C prstena dok se pojedinačni spojevi unutar grupe razlikuju u obrascu supstitucije aromatskih prstena A i B. Flavonoidi s hidroksilnom skupinom na C3 prstena C su 3-hidroksiflavonoidi (flavonoli, antocijani, katehini), a oni kojima nedostaje ta hidroksilna skupina su 3-dezoksiflavonoidi (flavanoni i flavoni). Tablica 1 prikazuje strukturnu podjelu flavonoida, najznačajnije predstavnike i najbogatije izvore flavonoida za čovjeka (Erlund, 2004; Kumar i Pandey, 2013).

Flavonoidi se rijetko pojavljuju u prirodi u slobodnom obliku kao aglikoni, a češće vezani za šećernu komponentu preko hidroksilnih skupina kao glikozidi. Također mogu polimerizirati u veće molekule i kompleksnije strukture u samim biljkama ili kao rezultat prerade hrane, a sve to pridonosi složenosti i velikom broju identificiranih molekula (Beccher, 2003). Raznolika flavonoidna struktura pridonosi razlikama u biološkim učincima koje su vidljive u biodostupnosti i bioaktivnosti flavonoida (Cassidy i Minihane, 2017).

Flavonoidi su često hidroksilirani na položajima 3, 5, 7, 3', 4' i 5'. Neke od tih hidroksilnih skupina često su metilirane, acetilirane ili sulfatirane. Kada se formiraju glikozidi, glikozidna veza se obično nalazi na položaju 3 ili 7, glikozidi su uglavnom O-glikozidi, a ugljikohidrati koji se najviše susreću tijekom formiranja glikozida su L-ramnoza, D-glukoza, glukoramnoza, galaktoza, arabinoza (Havsteen, 2002).

Vrlo su reaktivni spojevi i mogu ući u gotovo bilo koju vrstu reakcije poznatu organskoj kemiji, npr. redukcije, karbonilne reakcije, hidrofobne interakcije, tautomerije, izomerizacije. Flavonoidi snažno apsorbiraju UV-zračenje i prisutni su u svim biljnim stanicama koje sadrže plastide. Njihova elektronska svojstva ne uključuju samo hvatanje energije i prijenos već i biološku selektivnost aktivacijom svjetlosno osjetljivih gena. Drugo upečatljivo svojstvo flavonoida je fluorescencija koja se često koristi za identifikaciju i polukvantitativnu procjenu količine flavonoida u biljnom materijalu (Havsteen, 2002).

**Tablica 1.** Strukturna podjela flavonoida, najznačajniji predstavnici i najbogatiji izvori flavonoida za čovjeka

Podjela i struktura flavonoida		Najznačajniji predstavnici i najbogatiji izvori u prehrani	
FLAVONOIDI	3 – HIDROKSI FLAVONOIDI	<p>FLAVONOLI</p> 	Najčešći flavonol u prehrani je kvercetin. Njegova najviša koncentracija pronađena je u luku, a ostali izvori kvercetina su čaj, jabuka i vino. Kemferol, miricetin, izoramnetin, galangin su još neki od flavonola prisutni u prehrani.
		<p>ANTOCIJANIDINI</p> 	Najčešći antocijanidini su pelargonidin, cijanidin, delfinidin i malvidin. Odgovorni su za crvenu, plavu i ljubičastu boju jestivog voća i povrća kao što su to šljive, jabuke, patlidžan.
		<p>KATEHINI</p> 	Najviša koncentracija katehina je u čaju i crvenom vinu, a inače su prisutni u kakau, čokoladi, trešnjama, jabukama, kruškama, breskvama. Neki predstavnici su silimarin, silibinin, taksifolin, (+)-katehin.
	3 – DEZOKSI FLAVONOIDI	<p>FLAVANONI</p> 	Javljaju se gotovo isključivo u citrusnom voću, a najveća koncentracija je pronađena u krutom tkivu voća. Hesperidin, narirutin, naringin, naringenin su neki od flavonona koje nalazimo u citrusima.
		<p>FLAVONI</p> 	Glavni flavoni u prehrani su apigenin i luteolin. Njihov unos hranom je nizak jer dolaze u značajnim koncentracijama u biljkama koje se ne konzumiraju svakodnevno u većoj mjeri – crveni papar i celer.
IZOFLAVONOIDI		 <p>Uglavnom se javljaju u mahunarkama, a najveća koncentracija je u soji i proizvodima od soje, znatno niža u ostalim mahunarkama, a još niža u ostalom voću i povrću. Dominantni izoflavonoidi su genistein i daidzein.</p>	

### 1.1.3. FLAVONOIDIMA BOGATA HRANA

Flavonoidi su komponente prehrane brojnih biljojeda i svejeda, uključujući čovjeka. Budući da su fitokemikalije, ne mogu se sintetizirati od strane ljudi i životinja. Pronađeni su u voću, povrću, pićima poput crvenog vina, sokova, piva, a odgovorni su za boju, okus, prevenciju oksidacije masti i zaštitu vitamina i enzima u hrani. Tablica 1 uz strukturnu karakterizaciju prikazuje i najznačajnije prehrambene izvore pojedinih skupina flavonoida, iz čega je vidljivo da tip flavonoida varira ovisno o vrsti prehranbenog izvora. Također, sastav iste biljke uzgojene na različitim područjima može se značajno razlikovati u sastavu ovisno o genetskim čimbenicima, klimi, kvaliteti tla, količini svjetla i drugim vanjskim faktorima. Stoga kontrolirana kultivacija i selekcija predstavlja prvi korak da se osigura dosljedna koncentracija specifičnih spojeva ili grupe spojeva (Pietta i Gardana, 2003).

Polifenolna struktura flavonoida osjetljiva je na postupke prerade hrane i rukovanja hranom. Luk tijekom skladištenja izgubi 25-33% kvercetina u prvih 12 dana, nakon toga su primijećeni mali gubici. Hrana koja ima veliku površinu ili rupturirane stanične zidove tijekom kuhanja u vodi izgubit će znatnu količinu flavonoida. Zbog svega ovoga vrlo je teško procijeniti ukupan unos flavonoida, pretpostavlja se da je prosječna potrošnja od 20 mg/dan do 70 mg/dan. Pojedini pregledi navode različite vrijednosti unosa koje se kreću od nekoliko stotina miligrama na dan pa do 1-2 grama dnevno (Beecher, 2003).

Važnije od ukupnog unosa flavonoida može biti unos pojedinih flavonoidnih grupa, ali ni to nije svugdje jednako jer ovisi o navikama nacije pojedine zemlje. U Nizozemskoj je povećana konzumacija flavonola zbog popularnosti čaja kao pića, a slično tome u Japanu je vrlo konzumirana soja i hrana od soje pa kao rezultat toga veća je potrošnja izoflavonoida u usporedbi s ostalim grupama flavonoida (Hodek, 2012). Iako su flavonoidi uz klasične hranjive tvari (npr. proteine, aminokiseline, vitamine, minerale) sveprisutni i smatra se da povoljno utječu na biološke aktivnosti tako da smanjuju rizik od kroničnih bolesti, oni naposljetku nisu klasificirani kao vitamini. Razlog tome je što će odsutnost klasičnih hranjivih tvari uzrokovati deficitarne bolesti, a odsutnost flavonoida u prehrani neće izazvati takve abnormalnosti (Beecher, 2003).

#### 1.1.4. METABOLIZAM FLAVONOIDA U LJUDI

Važna mjesta metabolizma flavonoida su gastrointestinalni lumen, stanice intestinalnog zida i jetra. Metabolizam flavonoida ide fazom 1 i fazom 2 biotransformacije slično kao i kod lijekova, a cilj je brza detoksikacija i polarniji produkti koji se mogu lakše izlučiti iz tijela. Poznavati metabolite flavonoida je stvar interesa jer mogu utjecati na biološku aktivnost spoja (Erlund, 2004).

Flavonoidi se oslobađaju iz hrane žvakanjem, a nadalje se oligomerni flavonoidi mogu hidrolizirati u monomere i dimere pod utjecajem kiselih uvjeta u želucu. Daljnja apsorpcija ovisit će o fizikalno-kemijskim svojstvima kao što je molekularna masa, konfiguracija, lipofilnost, topljivost, pKa (Kumar i Pandey, 2013).

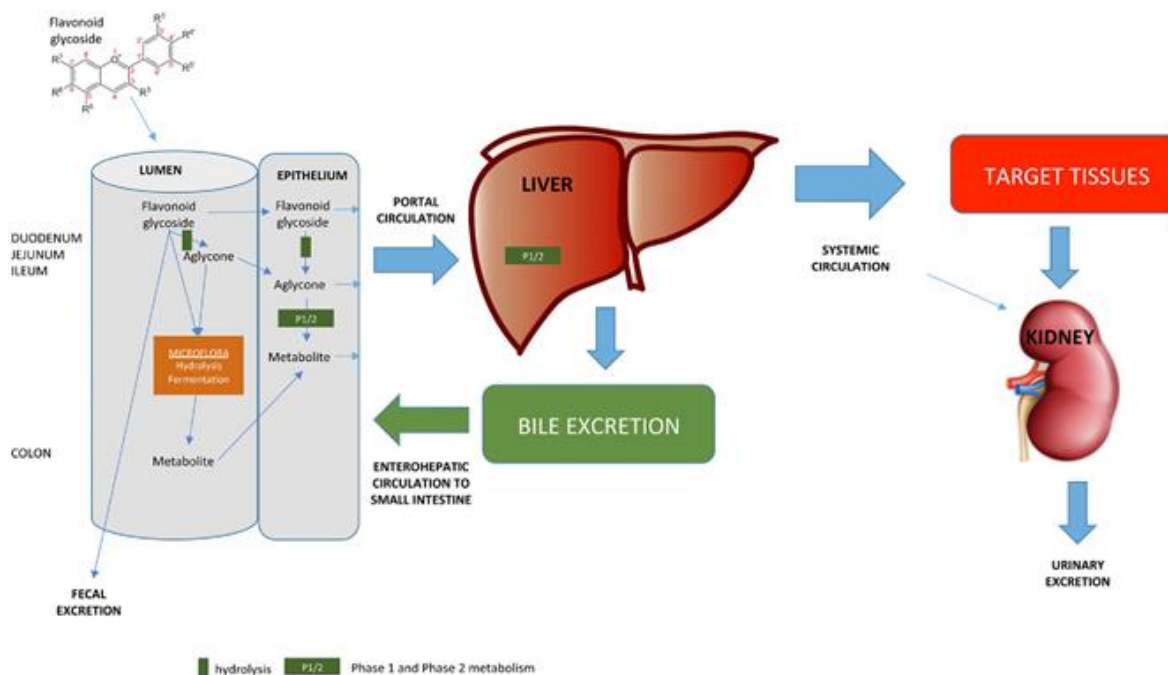
Flavonoide obično konzumiramo u obliku glikozida jer su kao takvi prisutni u biljkama, iznimka su katehina, a aglikoni se oslobode u epitelu ili lumenu tankog crijeva ili pak moraju doći do debelog crijeva prije apsorpcije gdje su izloženi hidrolizi i fermentaciji posredovanoj mikrobiomom (Cassidy i Minihane, 2017). Aglikoni se lako apsorbiraju u tankom crijevu pasivnom difuzijom kao rezultat povećane lipofilnosti, dok se glikozidi uglavnom moraju prevesti u oblik aglikona (Kumar i Pandey, 2013).

Laktaza florizin hidrolaza (nadalje: laktaza/LPH) i  $\beta$ -glukozidaza su enzimi koji u lumenu tankog crijeva hidroliziraju flavonoidne glikozide u njihove aglikone, nakon čega se oslobođeni aglikoni mogu apsorbirati. Alternativno se hidrofilni flavonoidni glikozidi, poput kvercetina, mogu izravno prenijeti u epitel preko epitelnih transportera kao što je  $\text{Na}^+$ -glukoza kotransporter, a ti glikozidi se onda naknadno hidroliziraju unutarstaničnom citosolnom  $\beta$ -glukozidazom. Stoga, do hidrolize svakako dolazi bilo u lumenu tankog crijeva ili epitelu. Antocijani su iznimka jer su prisutni u plazmi i urinu kao glikozidi, razlog toga je nestabilan aglikon pri pH crijeva pa i mali udio glikozida koji se apsorbira je važan (Cassidy i Minihane, 2017). Flavonoidi koji nisu supstrati ovih enzima i veće molekule provode se do debelog crijeva gdje bakterije imaju sposobnost hidrolize flavonoidnih glikozida, ali istovremeno mogu degradirati oslobođene flavonoidne aglikone. Enzimi odgovorni za hidrolizu su uglavnom enzimi gastrointestinalnih bakterija. Mikrobiom debelog crijeva igra važnu ulogu u katabolizmu neapsorbiranih flavonoida u manje molekule kao što su fenolne i aromatske kiseline koje mogu postati bioraspoložive. Budući da je apsorpcijska sposobnost debelog crijeva znatno manja od tankog crijeva, očekuje se samo mala apsorpcija tih glikozida (Kumar i Pandey, 2017).

Nakon apsorpcije flavonoida, u jetri se podvrgavaju metabolizmu faze 1 i faze 2. Među enzimima uključenim u fazu 1 metabolizma ksenobiotika, citokrom P450 igra ključnu ulogu jer čini 70-80% svih enzima faze 1 (Hodek, 2012). Flavonoidi se mogu podvrgnuti oksidaciji, O-demetilaciji i/ili C-hidroksilaciji kataliziranoj s citokromom P450. Produkti dobiveni metabolizmom u fazi 1 čine mali udio metabolita flavonoida što je vjerojatno zbog brze faze 2 metabolizma koja najčešće uključuje glukuronidaciju enzimom UGT (UDP-glukuronoziltransferaza), sulfataciju enzimom SULT (sulfotransferaza) ili metilaciju enzimom COMT (katehol-O-metiltransferaza; Cassidy i Minihane, 2017).

Osim što se flavonoidi metaboliziraju s citokromima, oni mogu utjecati na citokrome tako da potiču ekspresiju i povećavaju kapacitet metabolizma ksenobiotika ili mogu inhibirati djelovanje citokroma izravno se vežući na enzim. Pokazalo se da citokrom P450 1A2 (nadalje: CYP 1A2) igra važnu ulogu u hidroksilaciji i demetilaciji flavonoida. Ostali citokromi (CYP3A4, CYP2C9, CYP2E1, CYP2B6) također imaju značaj u metabolizmu flavonoida, ali je manji. Smatra se da je preduvjet za vezanje na CYP1A2 prisutnost višestrukih hidroksilnih skupina, ponajviše dvije na poziciji C5 i C7. Visoko inhibitorni učinak na CYP1A2 imaju planarne molekule malog volumena, a glikozilacija, prisutnost nekoliko hidroksilnih i/ili metoksi skupina rezultira smanjenjem inhibitornog kapaciteta (Hodek, 2012).

Nakon faze 2 nastali glukuronidni, sulfatni i metilni konjugati su sada polarniji spojevi i mogu se izlučiti putem bubrega u mokraću ili putem žući u tanko crijevo gdje enterohepatička cirkulacija može izazvati ponovnu apsorpciju flavonoida. Slika 3 prikazuje sažetak apsorpcije i postapsorpcijskog metabolizma flavonoida (Cassidy i Minihane, 2017). Što se tiče biodostupnosti ona značajno varira između raznih grupa i spojeva, a varijacije u biološkoj raspoloživosti flavonoida su prisutne i zbog fizioloških (masa, sastav tijela, motilitet gastrointestinalnog trakta) i molekularnih faktora (razlike u sintezi transportera ili enzima uključenih u biotransformaciju). Također izvor hrane može utjecati na bioraspoloživost, primjer toga je apsorpcija kvercetina iz luka koja je 4 puta veća u odnosu na apsorpciju iz jabuke ili čaja (Erlund, 2004; Kumar i Pandey, 2013).



**Slika 3.** Prikaz apsorpcije i postapsorpcijskog metabolizma flavonoida

### 1.1.5. BIOLOŠKI UČINCI FLAVONOIDA

Flavonoidi imaju različita biološka svojstva kojima promiču zdravlje i pomažu smanjiti rizik od bolesti (Kumar i Pandey, 2013). Najbolje opisano svojstvo gotovo svake skupine flavonoida je njihova antioksidativna aktivnost koja se očituje kroz smanjeno stvaranje ROS-a i/ili uklanjanje istog. Osim što posjeduju antioksidativnu aktivnost ističu se još i po protuupalnim, antibakterijskim, antivirusnim, kemoprotektivnim svojstvima (Pietta i Gardana, 2003).

Antioksidansi su specifični spojevi koji štite ljudske, životinjske i biljne stanice od štetnih učinaka slobodnih radikala, a učinkovitost flavonoida kao antioksidansa ovisi o konfiguraciji, supstitucija i ukupni broj hidroksilnih skupina u nuklearnoj strukturi. Flavonoidi koji imaju 3', 4'-katehol u B prstenu i prisutnost 2,3-nezasićene veze u konjugaciji s 4-okso skupinom u prstenu C imat će jaču antioksidativnu aktivnost od flavonoida koji nemaju ove skupine (Kumar i Pandey, 2013). Slobodni radikali javljaju se tijekom fizioloških procesa, posebice u respiratornom lancu i oksidacijama ili tijekom izloženosti zračenju (Havsteen, 2002). Antioksidativna aktivnost flavonoida uključuje supresiju stvaranja ROS-a inhibicijom enzima, uklanjanje slobodnih radikala i regulaciju antioksidativne obrane. Tako štite biološke sustave

od štetnog učinka oksidativnog procesa na makromolekule i DNA (Tiwari i Husain, 2017). Pojava, položaj, struktura i broj šećera u flavonoidu igra važnu ulogu u antioksidativnoj aktivnosti. Aglikoni su uglavnom snažniji antioksidansi od glikozida, ali ponekad šećerni dio može povećati bioraspoloživost (Kumar i Pandey, 2013).

Flavonoidi su se pokazali i kao spojevi koji imaju povoljan učinak u prevenciji kardiovaskularnih bolesti. Brojna istraživanja primijetila su da flavonoidi pokazuju antitrombotsku aktivnost i zato se vjeruje da osiguravaju određenu kardiovaskularnu zaštitu što je od izuzetne važnosti budući da je većina starije populacije u razvijenim zemljama pogođena ovim bolestima. Flavonoidna antitrombotska aktivnost potiče od inhibicije ciklooksigenaza (nadalje: COX), lipooksigenaza (nadalje: LOX), tirozin kinaza, fosfodiesteraza kao i povećane proizvodnje prostaciklina putem endotelnih stanica (Bojić i sur., 2011).

Nadalje, učinkovitost flavonoida protiv različitih mikroorganizama nije začuđujuća budući da se flavonoidi u biljkama sintetiziraju kao jedan od obrambenih mehanizama protiv mikrobnih infekcija. Njihov način antimikrobnog djelovanja može biti povezan sa sposobnošću inaktivacije mikrobnih adhezina, enzima i proteina staničnog transporta, a lipofilni flavonoidi mogu poremetiti membrane mikroorganizama. *In vitro* katehini su pokazali antibakterijsko djelovanje protiv *Vibrio cholerae*, *Streptococcus mutans*, *Shigellae*; prema tome flavonoidi bi mogli poslužiti kao izvor inspiracije za razvoj novih antibiotika ili bar kao alternativni konvencionalni antibiotici (Kumar i Pandey, 2013). Ovi spojevi bi također mogli biti važan izvor informacija i za razvoj novih antivirusnih lijekova zbog dostupnosti i očekivanih niskih nuspojava. *In vitro* je zabilježeno da flavonoidi imaju učinke na širok raspon biljnih i životinjskih virusa, a koji mehanizam leži ispod antivirusnih svojstva nije potpuno razjašnjeno, trenutna znanja predlažu djelovanje i na virus i na stanicu domaćina.

Opažen protuupalni učinak vidljiv je zbog inhibicije LOX i COX enzima koji su uključeni u biosintezu leukotriena i prostaglandina, a time se smanjuje stvaranje i oslobađanje proupalnih citokina i medijatora (Hodek, 2012). Flavonoidi imaju utjecaj na inicijaciju upale i imuni odgovor preko inhibicije kinaza koje su ključni regulatorni enzimi upale.

Za silimarin je primijećeno da stimulira enzimsku aktivnost DNA-ovisne RNA polimeraze 1 i kasnije biosintezu RNA i proteina što rezultira biosintezom DNA, staničnom proliferacijom, sniženom peroksidacijom lipida i regeneracijom oštećene jetre (Kumar i Pandey, 2013).

Uz flavonoide se povezuje i povoljni učinci na kognitivne funkcije, Parkinsonovu bolest kao i manji rizik od astme i razvoja dijabetesa tipa 2 (Cassidy i Minihane, 2017; Erlund, 2004). Flavonoidi se mogu specifično vezati za neke receptore makromolekula kao što su to estrogenski receptori (ER- $\alpha$  i ER- $\beta$ ) i GABA receptori (gama-aminomaslačna kiselina). Tako flavonoidi mogu izazvati anksiolitički učinak vežući se kao kompetitivni ligandi na benzodiazepinsko vezno mjesto. Estrogeni/antiestrogeni efekt mogu izazvati fitoestrogeni koji pripadaju grupi izoflavona. Strukturno su slični 17 $\beta$ -estradiolu te se vežu na estrogene receptore tako da nešto više preferiraju ER- $\beta$  dok se endogeni estrogenski vežu istim afinitetom za ER- $\alpha$  i ER- $\beta$ . Unos hrane bogate izoflavonima je povezan s manjim rizikom od karcinoma prostate, dojke kao i redukcijom simptoma menopauze. Prema tome flavonoidi se prikazuju i kao kemoprotektivni spojevi. Oni utječu na početne i napredne stupnjeve kancerogeneze, blokiraju ekspresiju enzima ili razinu aktivnosti, zaštićuju stanicu od ROS-a, interferiraju s procesom apoptoze itd.

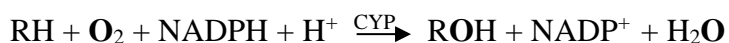
Uz sve ove navedene biološke aktivnosti flavonoida, čini se kao da flavonoidi preveniraju sve bolesti i osiguravaju zdravlje. *In vitro*, *ex vivo* i epidemiološke studije mogu pokazati takve rezultate, ali klinička istraživanja teško da takve obećavajuće aktivnosti mogu potvrditi. Razlog tome je što su *in vitro* studije provedene s nerealnim koncentracijama flavonoida koje se *in vivo* ne mogu postići zbog biodostupnosti i metabolizma flavonoida. Također, flavonoidi su osim kao kemoprotektivni spojevi prikazani i kao citotoksični, a aktivnost vjerojatno ovisi o uvjetima ciljnih stanica. Ni antioksidativna aktivnost flavonoida nije apsolutna jer flavonoidi mogu u nekim slučajevima djelovati kao prooksidansi, a sve ovisi o eksperimentalnim postavkama, koncentraciji flavonoida, tipu stanice ili stanju kulture stanica (Hodek, 2012).



## 1.2.CITOKROM P450 1A2

Citokrom P450 su proteini, članovi superporodice hemproteina, koji metaboliziraju oksidativne biotransformacije lipofilnih supstrata u polarnije produkte. Kod sisavaca sustav enzima citokrom P450 čini integralni dio membranskih proteina i sastavni je dio strukture membrane mitohondrija i endoplazmatskog retikuluma, a aktivnost enzima opažena je i u membranama jezgre, plazme i Golgijevog aparata (Rendić i Medić-Šarić, 2013). Fluidnost i naboj membrane može značajno utjecati na katalitička svojstva enzima, budući da o ovim svojstvima ovisi pokretljivost proteina u membrani pa promjenom prehrane može doći do promjene u sastavu membrane, a posljedično i do promjene fluidnosti membrane (Rendić, 1995).

Središnja značajka katalitičkog ciklusa citokroma P450 jest sposobnost henskog željeza da, nakon vezanja supstrata na enzim, sudjeluje u oksidativno-reduktivnim reakcijama kojima se iz molekulskog kisika jedan atom kisika ugrađuje u supstrat, a drugi reducira u oksidativni stupanj kisika u vodi.



Za oksigenaciju supstrata potrebna su dva protona i dva elektrona. Donori protona i sustavi za prijenos ovise o smještaju u stanici i izvoru enzima. Mehanizam reakcije je identičan za sve enzime bez obzira kojoj porodici enzima pripadaju. Razlike među enzimima očituju se u specifičnosti prema supstratima (Rendić i Medić-Šarić, 2013).

Ekspresija i aktivnost citokroma P450 je pod utjecajem okoliša i genetskih faktora i ovisi o fiziološkom i patofiziološkom stanju organizma (Dvorak, 2012). Gotovo svaka tvar koja se pojavljuje u okolišu može biti supstrat, induktor i/ili inhibitor jednog ili više enzima iz ove skupine i samim time potencijalno imati učinak na metabolizam endogenih tvari i supstrata ovih enzima (Rendić, 1995). Kod metaboličkih pretvorbi ksenobiotika prevladavaju oksidacijski procesi i >90% svih oksidacijskih reakcija katalizirano je enzimima citokrom P450 (Rendić i Medić-Šarić, 2013). U čovjeka je do sad identificirano 57 enzima, a smatra se da je otprilike četvrtina uključena prvobitno u metabolizam ksenobiotika, u odnosu na ostale koji su uključeni i u fiziološke procese kao npr. metabolizam sterola (Guengerich, 2006).

Od 57 enzima, 5 ih je uključeno u metabolizam većine lijekova - CYP3A4/3A5, CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19, CYP1A2. Citokrom P450 1A2 (CYP1A2) je jedan od „5 velikana“ i odgovoran je za 9% metabolizma lijekova i 15% metabolizma ostalih ksenobiotika.

### 1.2.1. EKSPRESIJA I POLIMORFIZAM CITOKROMA P450 1A2

CYP1A2 je uglavnom eksprimiran u jetri s udjelom od 6-13% s razinom varijabilnosti do 40 puta među pojedincima. Pojedini radovi navode ekspresiju i u nekim ekstrahepatičkim tkivima poput kolona, mozga, nazalne mukoze. Citokrom P450 mogu tvoriti komplekse od 6-10 proteina (rotamere) u membrani koji olakšavaju transport metabolita među enzimima. Tako se CYP1A1 i CYP1A2 mogu funkcionalno povezati tako da CYP1A1 katalizira npr. nastajanje primarnih fenola, a CYP1A2 dalje metabolizira fenole do diolepoksida (Guengerich, 2015; Rendić, 1995).

Geni CYP1A2 (*CYP1A2*) sastoje se od 7 eksona i 6 introna i nalaze se na kromosomu 15q24.1 (Zanger i Schwab, 2013). Ključni transkripcijski faktor CYP1A2 gena je aril-ugljikovodični receptor (nadalje: AhR) koji je sveprisutan u ljudskom tkivu. Mnoge stanične funkcije poput imunog odgovora, diferencijacije stanica, ekspresije gena za metabolizam lipida, regulacije staničnog ciklusa ovise o aktivaciji AhR endogenim ligandom, međutim AhR je podložan aktivaciji i egzogenim ligandima, a konačni stanični odgovor ovisi o prirodi liganda (Dvorak, 2012). Također je zapaženo da na regulaciji CYP1A2 gena utječe LXRL (Liver X receptor alpha) i DHEA (dehidroepiandrosterone) gdje posljednji djeluje tako da destabilizira mRNA i smanjuje regulaciju CYP1A2 gena (Guengerich, 2015).

*In vivo*, aktivnost CYP1A2 pokazuje značajan stupanj individualnih varijacija. Jedan od razloga mogu biti negenetski čimbenici (prehrana, zagađivači, pušenje) koji utječu na *in vivo* aktivnost i/ili ekspresiju CYP1A2. Smanjena ekspresija pronađena je kod donora jetre s povećanim jetrenim probama, povećanim C-reaktivnim proteinom (CRP) i kolestazom (Zanger i Schwab, 2013). Drugi razlog je pojava polimorfizma u CYP1A2 genu (Sachse, 2003). 41 alel je poznat, a još 5 jednostrukih nuklearnih polimorfizama (SNP) je zabilježeno, ali njihovi haplotipovi još nisu otkriveni ([www.pharmavar.org](http://www.pharmavar.org)). Neke od varijacija povezane su s promijenjenom ekspresijom ili inducibilnošću, a samim time i promijenjenom enzimskom aktivnosti, obično smanjenom. Budući da je CYP1A2 značajan u bioaktivaciji prokarcinogena, brojne studije su istraživale njegovu povezanost s različitim oblicima karcinoma (Zanger i Schwab, 2013). Kod osoba s kolorektalnim karcinomom uočena je viša aktivnost CYP1A2 što je i za očekivati jer je stalno prisutna povećana bioaktivacija prokarcinogena i samim time veća vjerojatnost razvoja karcinoma, također su povezane genetske varijacije CYP1A2 s karcinomom pluća.

CYP1A2\*1C alel povezan je s nižom enzimskom aktivnosti CYP1A2, dakle smanjen je metabolizam kofeina, koji je supstrat ovog enzima, i aktivacija prokarcinogena. Jedan od

detaljnije istraženih alela je CYP1A2\*1F koji je povezan s visokom inducibilnošću, npr. pušači s ovim alelom imat će značajno povećan metabolizam kofeina (Guengerich, 2015; Sachse, 2003). Ovaj polimorfizam je također povezan s povećanim rizikom od nasljednog medularnog karcinoma i povećanim rizikom od hipertenzije. Primijećeno je da se lokus povezan s krvnim tlakom nalaze na kromosomu gdje i CYP1A2 geni (15q24.1). Budući da je kofein supstrat CYP1A2, istraživana je povezanost između unosa kofeina i hipertenzije no potrebne su dodatne studije jer su rezultati još uvijek sporni (Guessous i sur., 2012; Merve i Gül, 2017).

Pojedinci s različitim CYP profilom mogu primiti drugačije povoljne učinke od prehrambenih flavonoida pa u kojoj mjeri će flavonoidi imati povoljne učinke na zdravlje i prevenciju bolesti ovisi o enzimima i o biotransformaciji flavonoida (Breinhold i sur., 2002).

### 1.2.2. SUPSTRATI I REAKCIJE

Svojstvo ovog enzima je da pokazuje preferenciju za aromatske amine i heterocikličke spojeve iz čega je zaključeno, kao i iz kristalne strukture CYP1A2 u kompleksu s  $\alpha$ -naftoflavonom (nadalje:  $\alpha$ NF), da je mjesto vezanja supstrata kompaktno, zatvoreno, tj. da se stvara planarni džep, koji je idealan za smještaj ukrućenih, površinski velikih, planarnih policikličkih molekula (Rendić, 1995; Zanger i Schwab, 2013).

CYP1A2 je stoga uključen u bioaktivaciju mnogih kancerogenih spojeva kao što su policiklički aromatski amini (nadalje: PAH), aromatski amini, heterociklički amini (nadalje: HA), N-nitrozamini (Guengerich, 2015). Spojevi poput heterocikličkih amina i PAH-ova moju nastati tijekom prženja ili pečenja mesa, a metabolizam preko CYP1A2 rezultira stvaranjem reaktivnih metabolita koji se mogu vezati s DNA i stvarati adukte koji imaju potencijal da uzrokuju mutacije i povećavaju rizik za karcinom (Sachse, 2003). Stoga visoka *in vivo* aktivnost CYP1A2 bi mogla poslužiti kao čimbenik osjetljivosti za otkrivanje karcinoma mokraćnog mjehura, kolona, rektuma gdje je izloženost spojevima kao što su PAH i HA uključeno u etiologiju bolesti (Guengerich, 2015). Jedan od važnijih karcinogena je aristološka kiselina (nadalje: AA) koja je povezana s nefropatijom i urotelijalnim karcinomom. Nefropatija uzrokovana AA opažena je u skupini belgijskih žena koje su konzumirale pilule za mršavljenje s ekstraktom biljke iz roda *Aristolochia* i te pacijentice su brzo progredirale do krajnjeg stadija renalne bolesti. Balkanska endemska nefropatija je također povezana s AA i karcinomom prostate. Nakon metaboliziranja AA identificirani su specifični AA-DNA adukti koji dovode

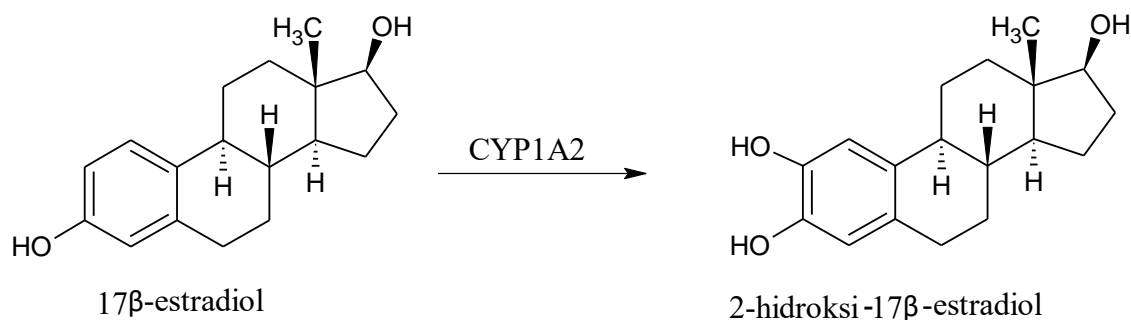
do mutacija koje su pak povezane s karcinogenezom. U ljudskim jetrenim mikrosomima je upravo CYP1A2 odgovoran za nitroredukciju AA koja vodi ka stvaranju DNA adukta, ali isto tako ovaj enzim je odgovoran i za reakciju demetilacije i stvaranje 8-hidroksiaristolohičke kiseline koja se smatra reakcijom detoksikacije. Koju od reakcija će CYP1A2 katalizirati ovisi o uvjetima, točnije o koncentraciji kisika. Dominantna reakcija je reakcija demetilacija i smatra se da je 87% te reakcije u jetri posredovano CYP1A2 (Striborova i sur., 2012).

Zbog svoje visoke ekspresije u jetri, CYP1A2 sudjeluje u metabolizmu niza lijekova, različitih skupina, a neki od njih su navedeni u Tablici 2 (Zanger i Schwab, 2013).

**Tablica 2.** Neki od lijekova metabolizirani enzimom CYP1A2 (Zanger i Schwab, 2013)

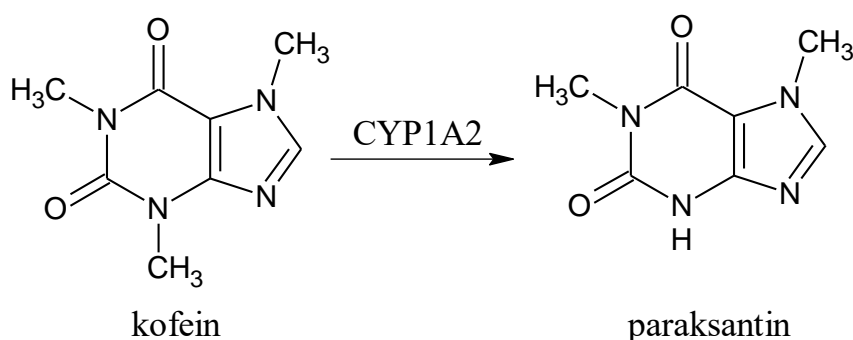
<b>CYP1A2 supstrati – lijekovi</b>	
Analgetici i antipiretici	paracetamol, fenacetin, lidokain
Antipsihotici	olanzapin, klozapin
Antidepresivi	Duloksetin
Protuupalni lijekovi	Nabumetone
Kardiovaskularni lijekovi	propranolol, triamteren, guanabenz
Inhibitori kolinesteraze	Takrin
Miorelaksansi	Tizanidin
Hipnotici	Zolpidem
Antiasmatici	Teofilin

CYP1A2 također sudjeluje u metabolizmu nekih endogenih spojeva kao što su to eikosanoidi, arahidonska kiselina, prostaglandini, melatonin, retinoična kiselina, estrogen. Najznačajniji endogeni supstrati ovog enzima su 17 $\beta$ -estradiol i estron. Hidroksilacija u položaju 2 je najčešća reakcija i smatra se prevencijom oksidacije 17 $\beta$ -estradiola u potencijalno reaktivnije 4-hidroksi produkte (Slika 4; Guengerich, 2015).



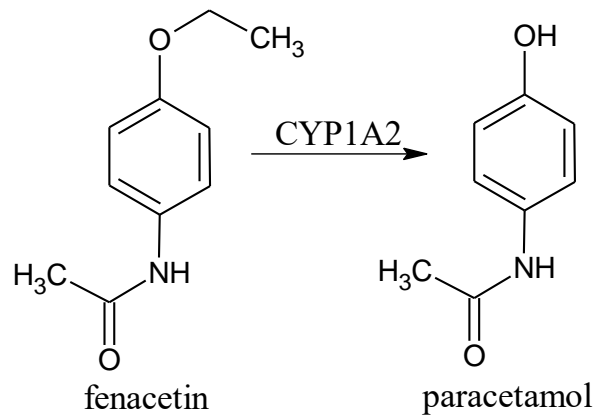
**Slika 4.** Reakcija hidroksilacije 17β-estradiola u položaju 2

Ponekad metabolizam lijeka ili kemijskog spoja ide u većoj mjeri preko jednog enzima, tada se takvi spojevi mogu iskoristiti za ispitivanje aktivnosti enzima u nekom tkivu. Kofein je jedan od najkorištenijih spojeva diljem svijeta i gotovo se potpuno metabolizira (samo 3% doze nepromijenjeno u urinu), a glavna metabolička reakcija je N3-demetilacija u paraksantin koja čini 80% metaboličkog puta kofeina (Slika 5). Iz tog razloga se ova reakcija koristi za određivanje CYP1A2 aktivnosti u ljudi (Shirley i sur., 2003).



**Slika 5.** Marker reakcija – N3-demetilacija kofeina

Fenacetin se enzimom CYP1A2 pretežito metabolizira O-deetilacijom u paracetamol (Slika 6). Ova reakcija se koristi u *in vitro* ispitivanjima aktivnosti CYP1A2 budući da je fenacetin povučen s tržišta jer su istraživanja na životinjama povezala primjenu fenacetina s pojavom nefropatije. Povučena je iako nefropatija kod ljudi nije povezana s fenacetinom. Smanjena aktivnost CYP1A2 utječe na metabolizam fenacetina tako da dolazi do potencijalno toksičnog sekundarnog puta koji je praćen deacetilacijom, formiranjem kinonimina i methemoglobinemijom (Rendić i Medić-Šarić, 2013).



**Slika 6.** O-deetilacija fenacetina

### 1.2.3. INDUKTORI I INHIBITORI CYP1A2

Indukcija gena je složen proces koji najčešće započinje vezanjem male molekule, liganda, za receptor što rezultira ekspresijom funkcionalnog proteina. Ključni transkripcijski faktor CYP1A2 gena je AhR koji je podložan aktivaciji egzogenim ligandima, stoga ksenobiotici koji aktiviraju AhR su zapravo CYP1A2 induktori. Dioksini, 3-metilkolantren, 5,6-benzoflavon su neki od ksenobiotika koji djeluju kao egzogeni ligandi, aktiviraju AhR i mogu dovesti do endogenih poremećaja i toksičnih učinaka (Dvorak, 2012). Omeprazol i primakin spadaju u atipične induktore jer djeluju na transkripciju, ali bez vezanja na AhR (Zanger i Schwab, 2013). Bitan induktor ovog enzima je pušenje koje može značajno povećati CYP1A2 aktivnost i samim time smanjiti učinak CYP1A2 supstrata.

Atipični antipsihotik, olanzapin, koristi se u liječenju shizofrenije, bipolarnog poremećaja i drugih psihotičnih stanja, a metabolizira se preko CYP1A2. Pušenje kao induktor enzima pridonio je 40% većem klirensu olanzapina među pušačima u usporedbi s nepušačima. Mnogi psihijatrijski bolesnici puše pa ako dođe do prestanka pušenja koncentracija olanzapina u plazmi bit će povišena, a to može rezultirati neželjenim učincima poput sedacije (Merve i Gül, 2017).

Supstrati koji inhibiraju CYP1A2 će povećati plazma koncentraciju lijekova koji se istovremeno njime metaboliziraju i u nekim slučajevima dovesti do neželjenih učinaka koji se mogu očitovati u poremećaju biosinteze endogenih tvari (sterola), nuspojavama lijekova itd. Tako primjerice kofein, zbog pretežitog metaboliziranja preko CYP1A2, uz istovremenu primjenu inhibitora ovog enzima može izazvati aritmiju kao neželjeni učinak. Brojni supstrati

moгу nepovratno inhibirati djelovanje enzima, nazivaju se suicidalnim supstratima, a inhibicija ireverzibilna. Ako se supstrat veže na enzim i ne dolazi do daljnjeg tijeka biokemijske reakcije, ali je taj kompleks s enzimom povratan, ta inhibicija se naziva reverzibilnom.

Inhibitori CYP1A2 uočeni tijekom kliničkog rada su furafilin i fluvoksamin. Furafilin je bio kandidat za lijek, ali nije nikad razvijen zbog inhibicije CYP1A2 i interferencije s metabolizmom kofeina (Rendić, 1995; Rendić i Medić-Šarić, 2013). U *in vitro* istraživanjima kao CYP1A2 inhibitor koristi se  $\alpha$ -naftoflavon. TCDD (2,3,7,8-tetraklorodibenzo-dioksin) i neki polihalogenirani bifenoli su snažni inhibitori dokazani s CYP1A2 iz štakora (Guengerich, 2015). Studije su pokazale da i flavonoid kvercetin kojeg ljudi unose prehranom inhibira aktivnost CYP1A2 pa može doći do potencijalnih interakcija sa supstratima ovog enzima (Breinholt i sur., 2002). Tablica 3 prikazuje sažeti pregled nekih CYP1A2 inhibitora i induktora (Guengerich, 2015; Rendić, 1995).

**Tablica 3.** Neki CYP1A2 inhibitori i induktori (Guengerich, 2015; Rendić, 1995)

<b>CYP1A2 induktori</b>	<b>CYP1A2 inhibitori</b>
poliklorirani bifenoli	7,8-benzoflavon
PAH (3-metilkolantren)	5,6-benzoflavon
5,6- benzoflavon	fluvoksamin
TCDD (2,3,7,8-tetraklorodibenzo-dioksin)	cimetidin
pušenje-tvari u dimu cigareta	furafilin
tvari u hrani podvrgnutoj pirolizi	$\alpha$ -naftoflavon
meso pripremljeno na roštilju (vjerojatno PAH i HA)	kvercetin
povrće (uglavnom porodica Brassicaceae)	aksitinib
omeprazol	
primakin	
intenzivna tjeļovježba	

## **2.OBRAZLOŽENJE TEME**



Flavonoidi su polifenolni spojevi koji se pojavljuju posvuda u hrani biljnog podrijetla i većina ljudi je svakodnevno izložena flavonoidima. Imaju blagotvorno djelovanje na zdravlje zbog svojih antioksidativnih svojstva i mnogih drugih bioloških aktivnosti poput antibakterijskog, antivirusnog, antikarcinogenog, hepatoprotektivnog djelovanja. Budući da farmaceutska industrija stalno traga za novim ljekovitim biljkama i funkcionalnim spojevima koji bi mogli poslužiti za razvoj optimalnih derivata, nije neobično što su flavonoidi izazvali zanimanje i skrenuli pažnju na sebe budući da su svakodnevno prisutni u prehrani i pokazuju niz povoljnih učinaka. Isto tako potrebno je precizno proučiti što jedemo, budući da su flavonoidi relativno nepoznati spojevi koje svakodnevno unosimo u većoj količini. Postoji heterogenost u odgovoru na povećani unos flavonoida što je vjerojatno posredovano širokom interindividualnom varijabilnosti u apsorpciji i metabolizmu flavonoida (Cassidy i Minihane, 2017).

Točno određivanje flavonoidnih metabolita može biti važno za istraživanje jer biološka i kemijska svojstva se mogu razlikovati od roditeljskog spoja tako da zapravo metaboliti mogu imati fiziološki utjecaj prvobitno pripisan roditeljskom spoju, flavonoidnom aglikonu. Neškodljivost i sigurnost primjene postiže se poznavanjem kemijskih i biokemijskih svojstva djelatnog spoja, dakle potrebno je poznavati biotransformaciju da bi mogli predvidjeti poželjna i nepoželjna djelovanja.

S flavonoidima se u organizmu postupa kao sa stranim spojevima tako da su slični ili identični enzimi uključeni u metabolizam flavonoida i lijekova. Citokrom P450 su najprisutniji enzimi u metabolizmu ksenobiotika. To nagoviješta da su flavonoidi potencijalni modulatori lijekova što može utjecati na terapijski učinak lijeka (Hodek, 2012). Mogu utjecati na lijek na razini enzima i transportera ksenobiotika kao i mijenjati sastav membrane te tako utjecati na pokretljivost proteina, citokroma P450, u membrani.

Kolika je važnosti citokroma P450 govori činjenica da gotovo svaka tvar koja se pojavljuje u okolišu može biti supstrat, induktor i/ili inhibitor jednog ili više enzima iz ove skupine. Zadatak ovih enzima je prevesti ksenobiotike u polarnije produkte pogodnije za izlučivanje (Rendić i Medić-Šarić, 2013). CYP1A2 je najviše uključen u metabolizam flavonoida, dolazi do stvaranja različitih metabolita s različitim biokemijskim svojstvima u usporedbi s matičnim spojem.

Povećana svjesnost da samo mala promjena u flavonoidnoj strukturi može utjecati na biološka svojstva povećala je potrebu za detaljnijim studijama o biotransformaciji flavonoida i potencijalnim svojstvima dobivenih metabolita (Breinholt i sur., 2002). Budući da je malo studija o metabolitima, cilj ovog rada je bio povećati ta znanja koja će kasnije možda poslužiti

u procjenama interakcija flavonoida i lijeka, možda pomoći utvrditi metabolite odgovorne za brojne farmakološke učinke, a možda i dovesti do novih ideja za razvoj lijekova.

Istraživanje koje je prethodilo ovom je od 30 različitih flavonoida dokazalo da 11 njih pokazuje tendenciju da se metabolizira citokromom P450. LC/MS je metoda kojom je ispitano tih 11 flavonoida u ovom istraživanju i na temelju dobivenih rezultata zaključeno koji se od flavonoida metabolizira s CYP1A2. LC spregnut s MS-om je metoda izbora jer se dobije fingerprint za spoj i informacije o kromatografskim i MS ponašanjima analita.

### **3.MATERIJALI I METODE**

### 3.1. SUPSTANCIJE

- Bakulosomi koji uz citokrom P450 (100 pmol) imaju eksprimiranu i NADPH reduktazu, odnosno citokrom b<sub>5</sub> (volumen tijekom inkubacije: 10 µL)
- Kalijev fosfat - pufer, 50 mmol, pH=7,4 (volumen tijekom inkubacije: 5 µL)
- Destilirana voda (tijekom inkubacije dodati do ukupnog volumena od 100 µL; 69 µL)
- NADPH-generirajući sustav (nadalje: GS) – omjer supstanca koje čine ovaj sustav je 100:50:2 (15% volumena inkubacije, dakle 15 µL)
  - glukoza-6-fosfat
  - NADP<sup>+</sup>
  - glukoza-6-fosfat dehidrogenaza
- Acetonitril (volumen tijekom inkubacije: 100 µL)
- Metanol
- Flavonoidi (volumen tijekom inkubacije: 1 µL)
  - apigenin
  - kemferol
  - flavon
  - 7-hidroksiflavon
  - galangin
  - 3,7-dihidroksiflavon
  - 6-hidroksiflavon
  - akacetin
  - naringenin
  - sakuranetin
  - tangeretin

### 3.2. INSTRUMENTI I PRIBOR

- Epruvete
- Staklene vial
- Ledena kupelj
- Vodena kupelj s mućkanjem na 37°C
- Tresilica za epruvete
- Centrifuga
- Evaporator
- LC/MS

### 3.3. POSTUPAK

- Prije početka inkubacije potrebno je pripremiti NADPH-generirajući sustav koji se sastoji od glukoza-6-fosfata, NADP<sup>+</sup> i glukoza-6-fosfat dehidrogenaze u omjerima 100:50:2. Dodatak generirajućeg sustava je u prednosti nad dodatkom samog NADPH u inkubacijsku smjesu jer osigurava da NADPH nije ograničavajući reagens i sprečava prekomjerno nakupljanje NADP<sup>+</sup> koji je kompetitivni inhibitor NADPH-P450 reduktaze.
- U svaku epruvetu dodaje se kalijev pufer, destilirana voda, supstrat (flavonoid) i enzim u prethodno navedenim volumenima. Za svaki flavonoid potrebne su 3 epruvete, dvije s GS-om i jedna kao slijepa proba u koju umjesto GS-a dodajemo istu količinu vode. Epruvete se stave na preinkubaciju u vodenu kupelj na temperaturi od 37 °C na 5 minute prije nego što se dodaje GS ili voda.
- Nakon što je prošla preinkubacija dodaje se GS u dvije epruvete svakog uzorka flavonoida i voda u njihove slijepa probe. Da bi rezultati bili što točnije potrebno je uskladiti vrijeme budući da je puno uzoraka. Kasnije je potrebno prekinuti reakcije istim redom i vremenski što točnije.
- Inkubacija se dalje provodi u istoj vodenoj kupelji uz miješanje na temperaturi od 37 °C i pH 7,4 i traje 30 minuta.
- Nakon 30 minuta zaustavlja se reakcija sa 100 µL acetonitrila koji se cijelo vrijeme čuva pohranjen u hladnoj kupelji. Nakon što se doda acetonitril u epruvetu, ona se pomiješa

na tresilici da bi bili sigurni da se reakcija potpuno zaustavila. Acetonitril zaustavlja reakciju tako da denaturira enzim i sprečava daljnju katalizu.

- Budući da se acetonitril miješa s vodom, nema slojeva. Iz tog razloga sljedeći korak je centrifugiranje 10 minuta na 3000 rpm čime će se slojevi odvojiti, a za daljnju analizu u HPLC-u koristi se donji, vodeni sloj, koji se mikropipetom prebaci u drugu epruvetu.
- Sljedeći korak je evaporacija u struji N<sub>2</sub> bez zagrijavanja, nakon toga slijedi otapanje u otapalu, metanolu, prebacivanje u vialu te LC/MS analiza pod sljedećim uvjetima:

HPLC uvjeti:

- Kolona: Poroshell 120 EC-C18, 100x3,0 mm, 2,7 μm
- Protok: 0,4 ml/min
- Temperatura kolone: 40 °C
- Volumen injektiranja: 5 μl
- Valna duljina (UV detektor): 350 nm
- Mobilna faza A: voda:metanol:mravlja kiselina = 93:5:2 (V/V/V)
- Mobilna faza B: voda:metanol:mravlja kiselina = 3:95:2 (V/V/V)
- Gradijent:

<b>t [min]</b>	0	14	15	16	20
<b>udio B [%]</b>	40	80	80	40	40

MS (Q-TOF) uvjeti:

- Instrument Mode: Low (1700 *m/z*), High Resolution (4 GHz, HIRes)
  - Ion Polarity: Positive
- Izvor (Source): Dual AJS ESI

- Gas Temperature: 200 °C
- Drying Gas: 8 L/min
- Nebulizer: 40 psig
- Sheath Gas Temperature: 300 °C

MS TOF:

- Fragmentor: 175 V
- Skimmer: 65 V
- OCT 1RF V<sub>pp</sub>: 750 V
- Collision Energy: 0 V

Acquisition mode:

- MS

TOF Spectra:

- Mass range: 100-1000  $m/z$

Acquisition rate:

- 1 scan/s

Referent mass:

- $m/z$ : 121,050873
- $m/z$ : 922,009798

### 3.4. METODA

LC/MS je moćna analitička tehnika koja je nastala povezivanjem tekućinske kromatografije (LC) s detekcijom spektrometrije masa (MS). Tekućinska kromatografija u ovom vezanom sustavu odvaja komponente uzorka i predstavlja ih spektrometru masa koji ima sposobnost određivanja točne mase pojedinih spojeva. Ovim povezivanjem omogućena je i analiza složenih uzoraka koji su mješavina spojeva velikog raspona mase i molekula različitih svojstva (velike, polarne, ionske, termički nestabilne). Rezultate koje dobijemo ovom analizom osiguravaju nam informacije o molekularnoj masi, strukturi, identifikaciji i kvantitativnoj specifičnosti komponenta uzorka. Koristeći uz MS još jedan LC detektor, poput UV-VIS detektora, dobiju se još bogatije informacije što je najvidljivije ako se u smjesi nalaze spojevi sa sličnim UV-VIS spektrima ili spojevi s istim masama ([www.agilent.com](http://www.agilent.com)).

Tekućinska kromatografija je unaprijeđeni oblik kolonske kromatografije u kojoj tekuća mobilna faza pod tlakom prolazi kroz čeličnu kolonu napunjenu malim česticama stacionarne faze (3-10  $\mu\text{m}$ ) noseći sastavnice uzorka. Uzorak se unosi preko ventila s više petlji u tok mobilne faze, a na koloni dolazi do fizičkog razdvajanja između dvije faze, stacionarne i mobilne. Ovisno o prirodi analita, sastavu mobilne faze i stacionarnoj fazi analiti će se različito zadržavati, a samim time razlikovat će se vrijeme za eluciju pojedinog analita, a to vrijeme nazivamo vrijeme zadržavanja. Tijekom analize moguće je koristiti izokratno ili gradijentno eluiranje, tj. sastav mobilne faze se ne mijenja ili mijenja tijekom vremena. Ovisno o sastavu stacionarne i mobilne faze razlikujemo normalno faznu i obrnuto faznu tekućinsku kromatografiju. Obrnuto fazna sadrži nepolarnu stacionarnu fazu koju čini silicij dioksid modificiran s dugim lancima ugljikovodika na površini, a mobilna faza je najčešće mješavina

otapala. Obrnuto fazna kromatografija se najčešće koristi, a korištena je i u ovom istraživanju ([www.chemguide.co.uk](http://www.chemguide.co.uk)).

Nakon što je uzorak razdvojen tekućinskom kromatografijom, spektrometrijom masa (MS) dobije se maseni spektar svake razdvojene komponente uzorka. MS je analitička tehnika u kojoj se molekule analita ioniziraju, a nakon toga se nastali ioni u plinskoj fazi razdvajaju i detektiraju prema njihovom omjeru mase i naboja ( $m/z$ ). Svaki MS ima ionizacijsku komoru, analizator, detektor, a sve se to nalazi u vakuumu. Flavonoidi se povećano istražuju s MS-om od otkrića blagih ionizacijskih postupaka kao što je to ionizacijsko raspršenje (nadalje: ESI) jer ova tehnika omogućuje analizu analita bez derivatizacije, fragmentiranje izostaje te nastaje samo molekulski ion, navedena ionizacija je korištena i u ovom istraživanju (Packer, 2003). Ionizacija započinje tako da uzorak iz kromatografske kolone prolazi kroz usku kapilaru, a kraj kapilare je na visokom potencijalu pa dolazi do akumuliranja pozitivnog naboja na površini tekućine. Uzorak se rasprši pri atmosferskom tlaku i sad raspršene kapljice putuju prema analizatoru. Kapljice analita se suše u struji  $N_2$ , otapalo isparava, a naboj ostaje konstantan. Količina naboja postaje sve gušća, dolazi do raspršenja u još manje čestice, a naboj s kapljice uzrokuje ionizaciju analita. Nakon što ioni stignu do analizatora masa, ovdje se razdvajaju na temelju omjera  $m/z$ . Analizator korišten tijekom ovog istraživanja je Q-TOF (hibridni analizator- kvadrupolni analizator vremena leta). Analizator razdvaja ione primjenjujući električna i magnetska polja, a detektor do kojeg stižu ioni određuje udio pojedinih ioniziranih molekularnih iona kako bi dobili zastupljenost pojedinih iona ([www.ecs.umass.edu](http://www.ecs.umass.edu)).

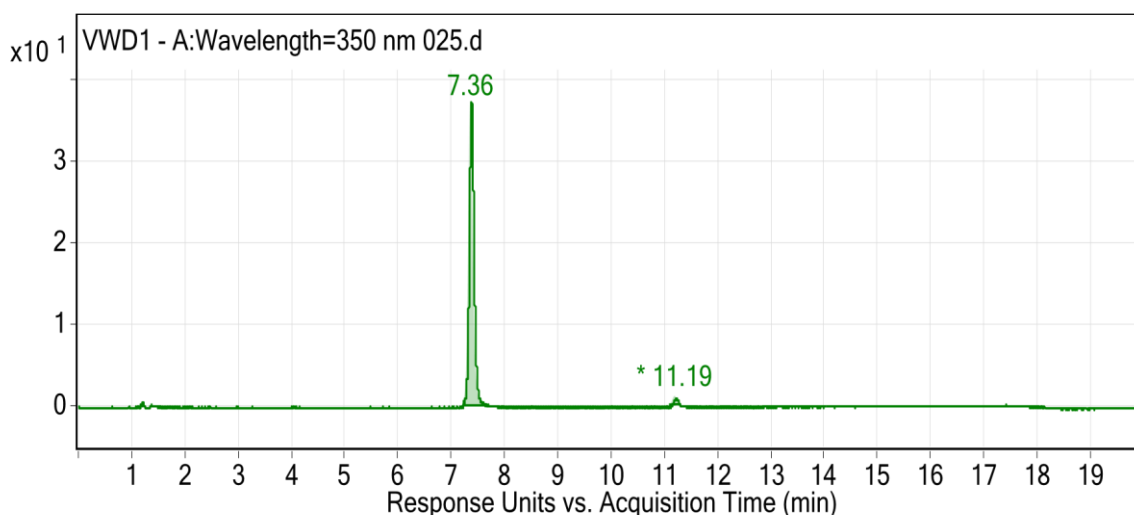


## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

Od jedanaest ispitanih flavonoida, potvrđeno je da se devet metabolizira citokromom P450 1A2. Detaljan prikaz rezultata dan je za flavonoid apigenin, a ostali su navedeni u nešto skraćenom obliku.

## 4.1.APIGENIN

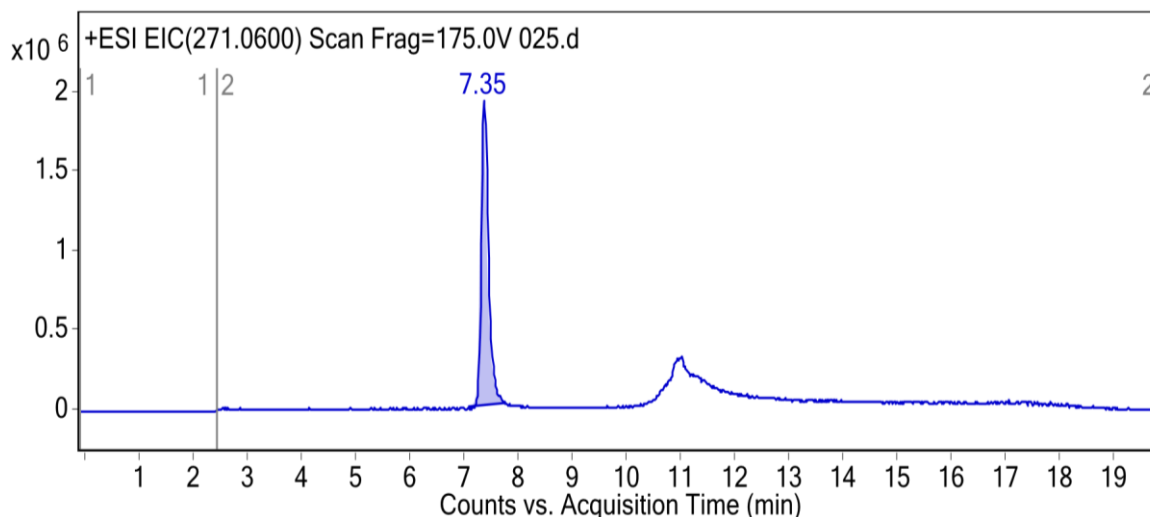
UV kromatogram inkubacijske smjese za apigenin ( $C_{15}H_{10}O_5$ ) bez dodatka generirajućeg sustava jasno prikazuje pik apigenina čije je vrijeme zadržavanja 7,36 minuta, a mali pik vidljiv na 11,19 minuta čini samo 2,6 % površine osnovnog pika i to je vjerojatno neko onečišćenje (Slika 7).



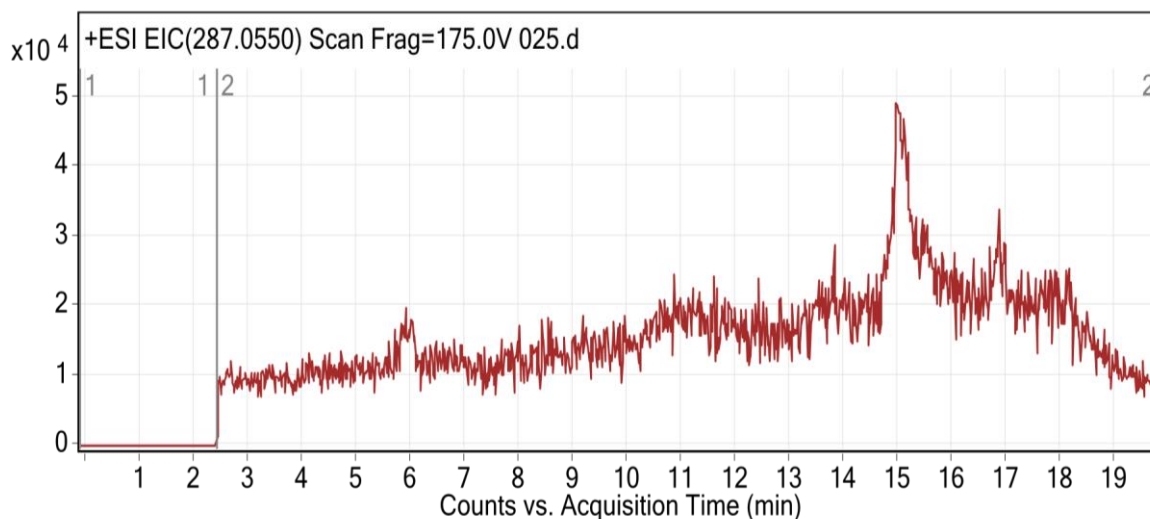
**Slika 7.** UV kromatogram inkubacijske smjese za apigenin bez dodanog generirajućeg sustava.

Prisutnost jednog analita, u ovom slučaju apigenina, dokazuje se tako da se odabere molekulska masa i dobije kromatogram izdvojenog iona (eng. *Extracted Ion Chromatogram*, EIC). Ako je pik u kromatogramu prisutan, analit s odabranom molekulskom masom postoji u smjesi, ukoliko je više pikova na kromatogramu izdvojenog iona to znači da postoji više spojeva s istom masom, a različite strukture, dakle u tom slučaju dokazala bi se prisutnost strukturnih izomera u smjesi.

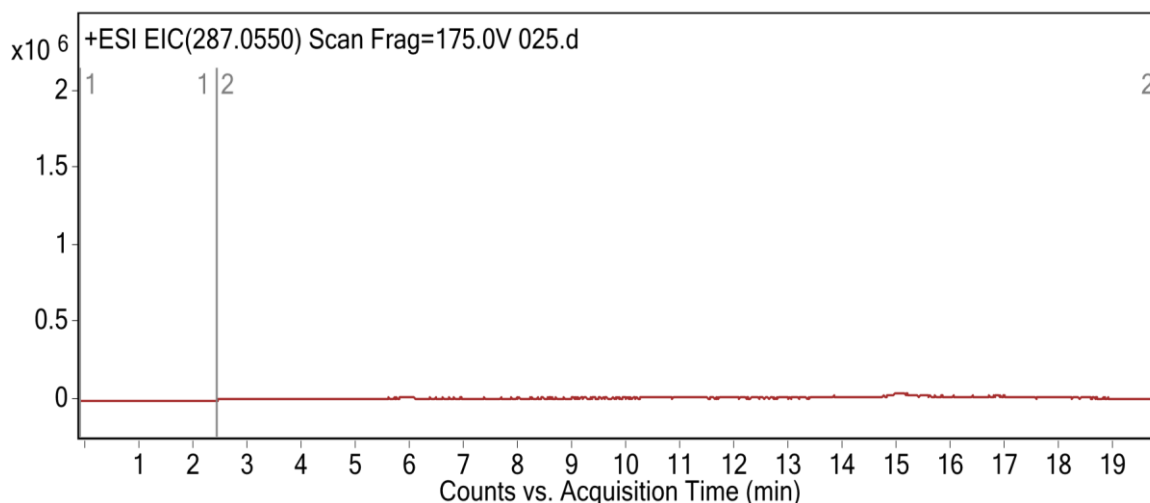
Slika 8 prikazuje kromatogram izdvojenog iona apigenina iz kojeg se vidi da je vrijeme zadržavanja 7,36 minuta, a zadana molekulska masa od 271,0600 odgovara masi apigenina. Slika 9 i Slika 10, koje se razlikuju u redu veličine, prikazu kromatograme izdvojenog iona za metabolit apigenina (luteolin) čija je molekulska masa 287,0550. Budući da generirajući sustav pokreće reakciju, a on još nije dodan, metabolita u smjesi još uvijek nema pa tako ni pika u kromatogramu.



**Slika 8.** Kromatogram izdvojenog iona apigenina ( $m/z = 271,0600$ ) inkubacijske smjese za apigenin bez dodanog generirajućeg sustava.



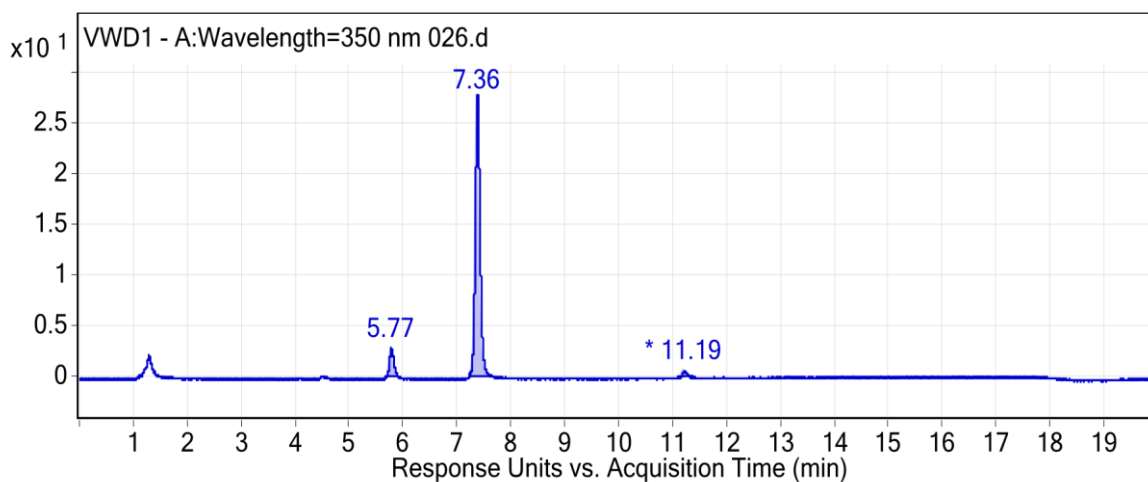
**Slika 9.** Kromatogram izdvojenog iona luteolina ( $m/z = 287,0550$ ) inkubacijske smjese za apigenin bez dodanog generirajućeg sustava.



**Slika 10.** Kromatogram izdvojenog iona luteolina ( $m/z = 287,0550$ ) inkubacijske smjese za apigenin bez dodanog generirajućeg sustava.

Nakon što se doda generirajući sustav u smjesu, omogućeno je pokretanje reakcija biotransformacije i metaboliti bi trebali biti detektirani na kromatogramima.

UV kromatogram inkubacijske smjese za apigenin s dodanim generirajućim sustava ima novi pik s vremenom zadržavanja od 5,77 minuta i površinom od 10,16 % u odnosu na glavni pik što nije zanemarivo i može se pretpostaviti da se radi o metabolitu (Slika 11; Tablica 4).

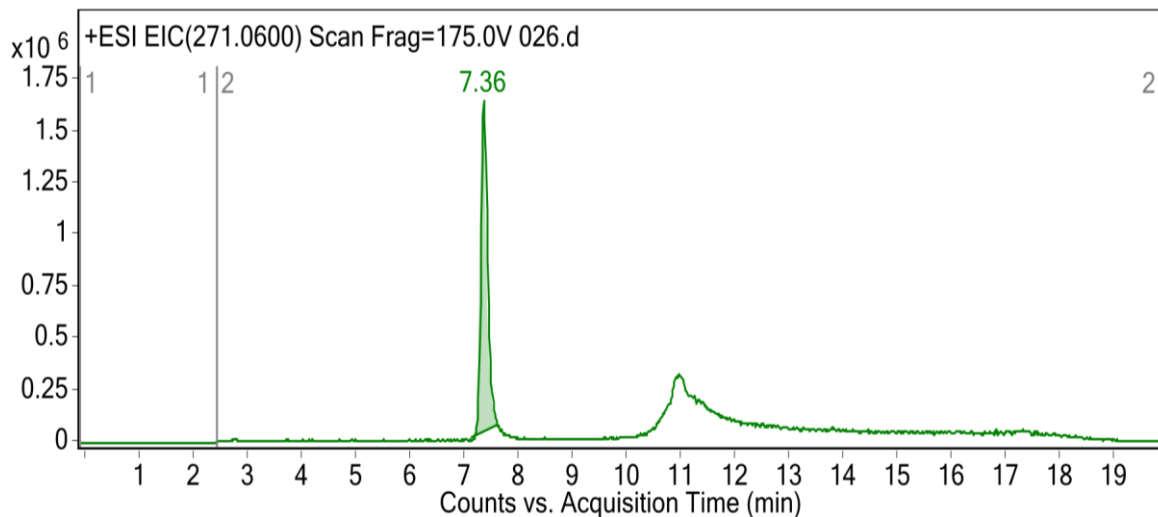


**Slika 11.** UV kromatogram inkubacijske smjese za apigenin s dodanim generirajućim sustavom.

**Tablica 4.** Vremena zadržavanja pikova u UV kromatogramu i površine

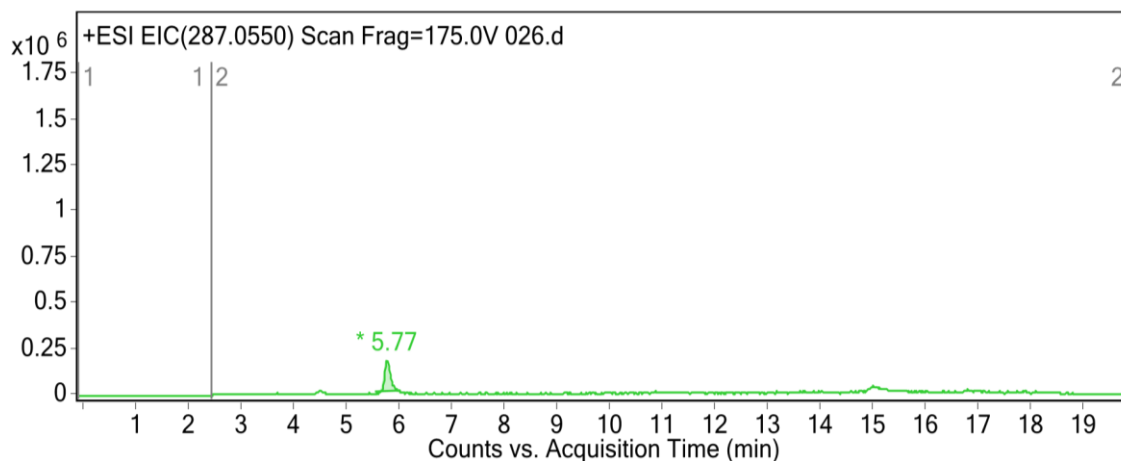
Pik	Početak pika	Vrijeme zadržavanja	Kraj pika	Visina pika	Površina	Površina %
1	5.67	5.77	5.91	2.98	17.75	10.16
2	7.23	7.36	7.65	27.82	174.77	100
3	11.08	11.19	11.39	0.8	4.9	2.8

Kromatogram izdvojenog iona za apigenin s dodanim generirajućim sustavom ne razlikuje se kvalitativno od onog bez dodatka generirajućeg sustava (Slika 12).

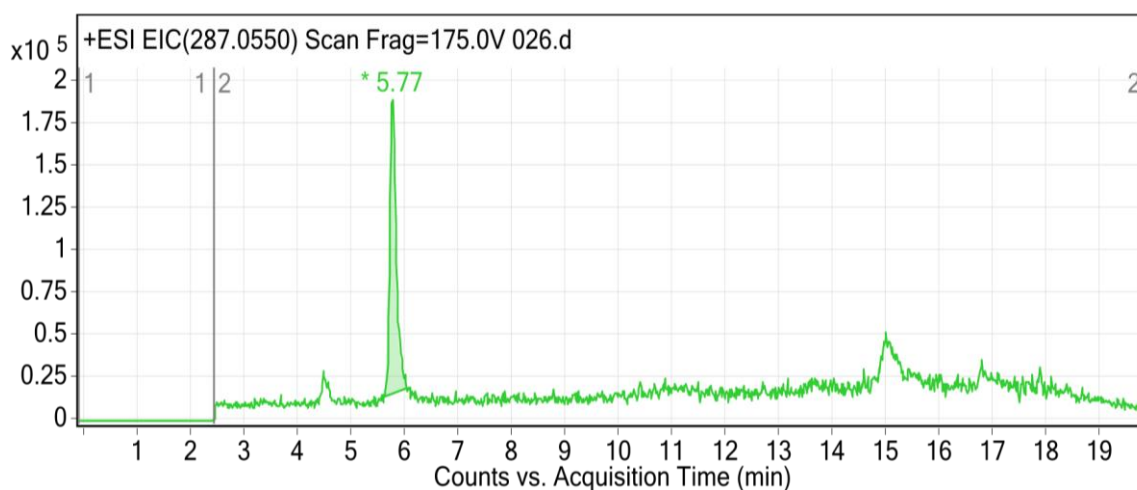


**Slika 12.** Kromatogram izdvojenog iona apigenina ( $m/z = 271,0600$ ) inkubacijske smjese za apigenin s dodanim generirajućim sustavom.

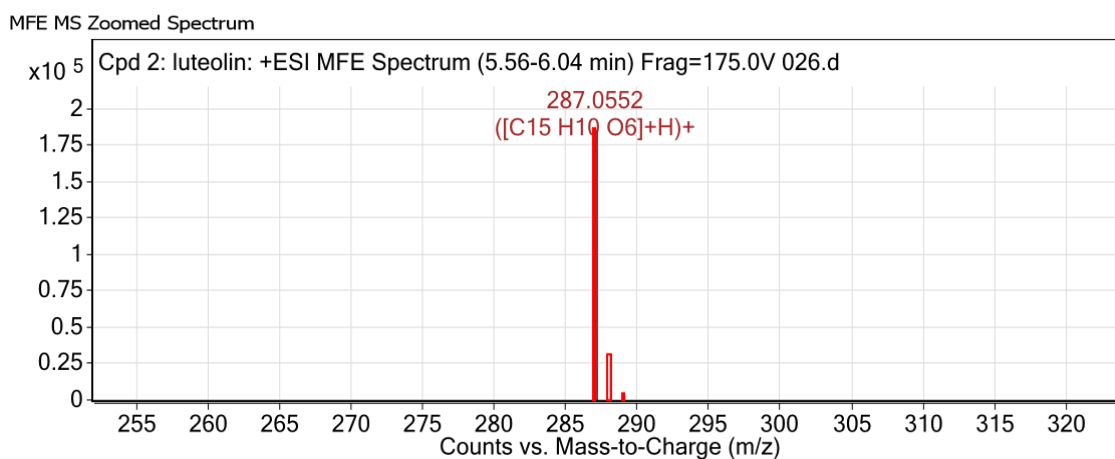
Kromatogram izdvojenog iona za luteolin ( $C_{15}H_{10}O_6$ ) bez dodatka generirajućeg sustava nije imao pik. Slika 13 i Slika 14, razlikuju se u redu veličine, prikazuju kromatograme za isti ion s dodanim generirajućim sustavom. Pik je prisutan, što znači da CYP1A2 metabolizira apigenin i kao metabolit daje luteolin koji ima vrijeme zadržavanja 5,77 minuta, a molekulsku masu 287,0550. Slika 15 prikazuje spektar izdvojenog iona luteolina s dodanim generirajućim sustavom gdje je prikazano malo odstupanje masa zbog izotopa i izotopnih udjela (Tablica 5).



**Slika 13.** Kromatogram izdvojenog iona luteolin ( $m/z = 287,0550$ ) inkubacijske smjese za apigenin s dodanim generirajućim sustavom.



**Slika 14.** Kromatogram izdvojenog iona luteolin ( $m/z = 287,0550$ ) inkubacijske smjese za apigenin s dodanim generirajućim sustavom.

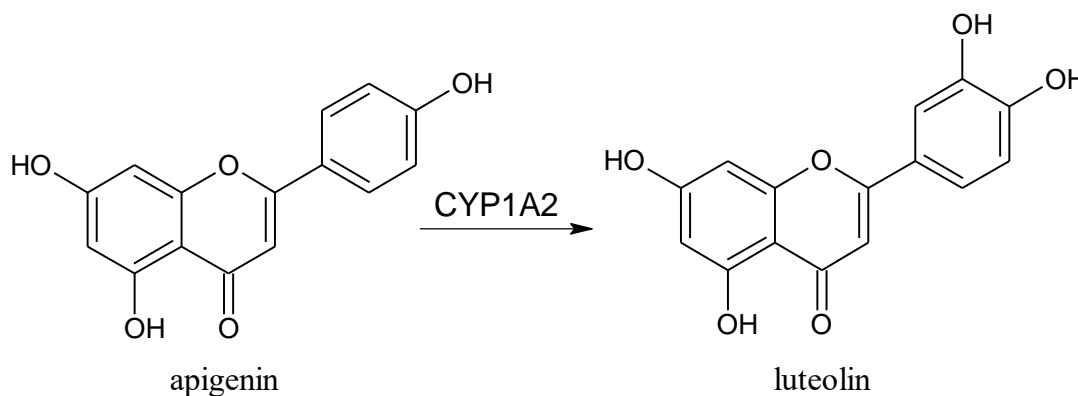


**Slika 15.** Kromatogram izdvojenog iona za luteolin nakon dodatka generirajućeg sustava.

**Tablica 5.** Popis pikova prikanih na Slici 15

<i>m/z</i>	Naboj (Z)	Površina	Formula	Ioni
287.0552	1	185926.77	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	(M+H) <sup>+</sup>
288.0582	1	31714.69	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	(M+H) <sup>+</sup>
289.0603	1	4717.58	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	(M+H) <sup>+</sup>

Usporedi li se molekulska formula i masa apigenina (C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>, *m/z* = 271,0600) i luteolina (C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>6</sub>, *m/z* = 287,0550) može se doći do zaključka da je razlika u masama 15,995 što odgovara upravo atomu kisika koji je za jedan veći u molekuli luteolina. Prema tome hidroksilacija je reakcija koje se odvija tijekom biotransformacijom apigenina (Slika 16).



**Slika 16.** Metabolizam apigenina posredovan CYP1A2

Apigenin i luteolin su najprisutniji predstavnici flavona u prehrani i u literaturi im se pripisuju različite farmakološke aktivnosti uz antioksidativno djelovanje (Erlund, 2004).

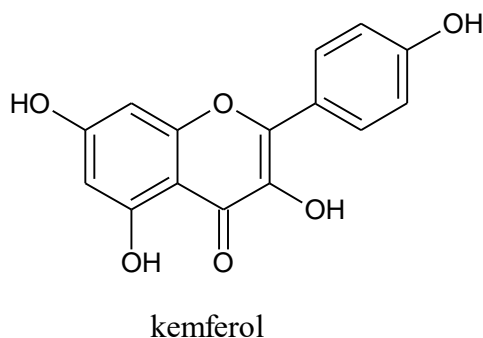
Apigenin pokazuje snažno antibakterijsko djelovanje, dokazana je i inhibitorna aktivnost protiv bakterije *Escherichia Coli*. Osim antibakterijskog djelovanja pokazalo se da djeluju i na virusnu transkripciju te da je u nekoj mjeri i kompetitivni ligand za benzodiazepinsko vezno mjesto. Povezuje ga se s hepatoprotektivnim učincima što može biti važno jer različite kronične bolesti poput dijabetesa mogu dovesti do razvoja kliničkih manifestacija jetre (Hodek, 2012; Kumar i Pandey, 2013). U studiji koja je istraživala učinke apigenina na faktor rasta tumora, zaključeno je da inhibira faktor rasta, ali inhibicija snažno ovisi o koncentraciji. Također sprečava kolonizaciju kulture zdravih stanica sa stanicama karcinoma. Koliki je značaj ovog *in vivo* treba još istražiti (Caltagirone i sur., 2000). I apigenin i luteolin su se pokazali citotoksičnima za

ljudske embrijske fibroblaste pluća zbog sposobnosti stvaranja intracelularnog ROS-a (Hodek, 2012). Oba flavonoida utječu i na funkciju imunološkog sustava i upalnih stanica te posreduju protuupalni i analgetski učinak.

Koliki je značaj svih ovih aktivnosti *in vivo* je upitno i potrebna su daljnja istraživanja kako bi saznali značaj, ali neosporivo je da flavonoidi poput apigenina i luteolina pokazuju veliki potencijal.

## 4.2. KEMFEROL

Inkubacijska smjesa za kemferol s dodanim generirajućim sustavom nije sadržavala metabolite kemferola. Može se zaključiti da se kemferol (Slika 17) ne metabolizira s CYP1A2.



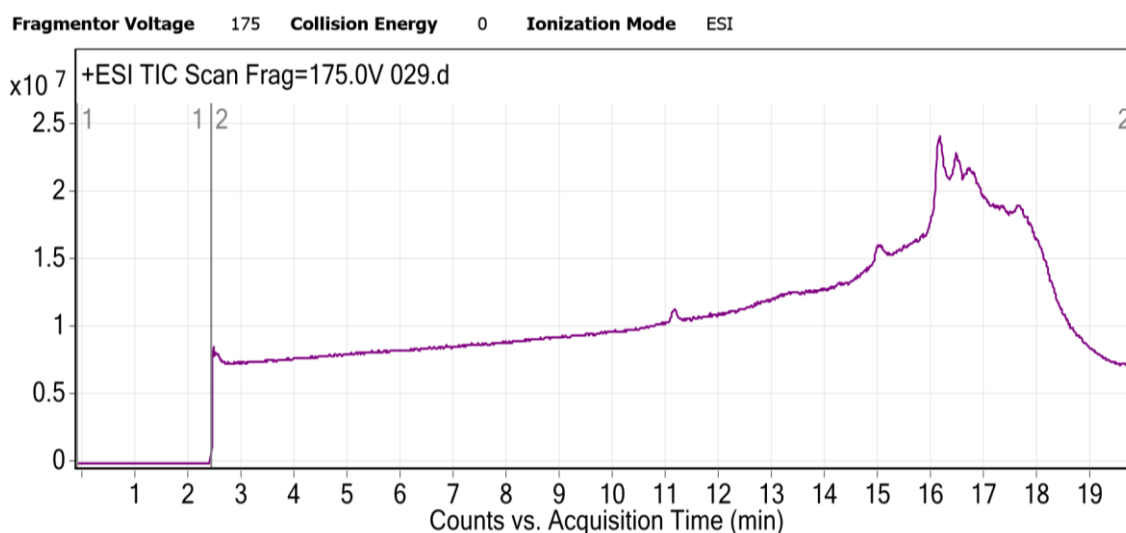
**Slika 17.** Struktura kemferola

Postoji studija u kojoj je istraživana je inhibitorna aktivnost kemferola na CYP1A1, CYP1A2 i CYP1B1. Pokazalo se da kemferol inhibira enzim CYP1A2, a koji od načina inhibicije je u pitanju nije poznato (Chang i sur., 2006).

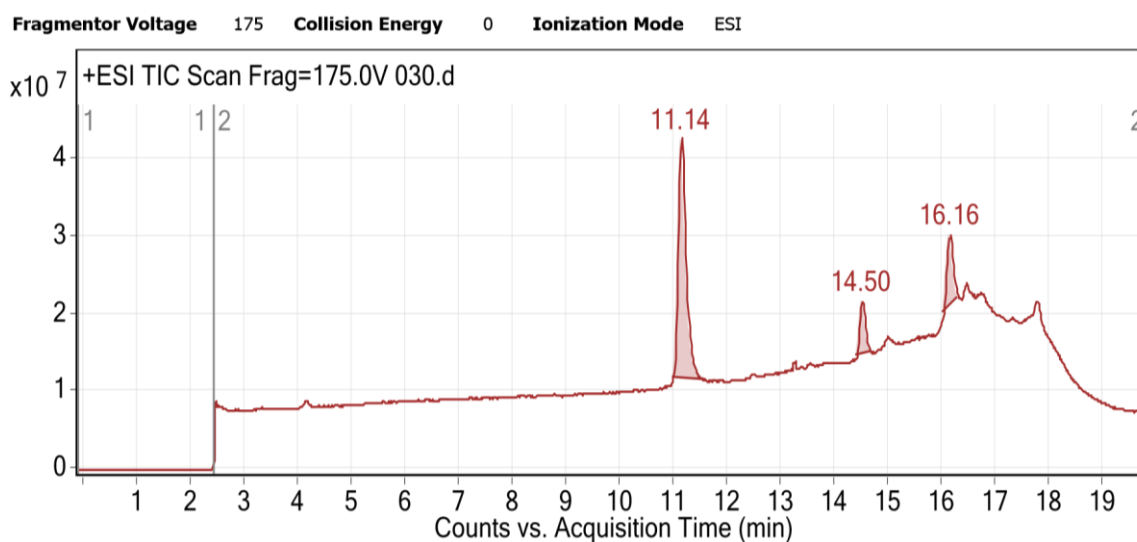


## 4.3.FLAVON

TIC (eng. *Total Ion Chromatogram*) obično služi za orijentaciju i na njemu se često ne vide značajne razlike prije i nakon dodatka generirajućeg sustava što nije slučaj kod ovog flavonoida. Slika 18 prikazuje TIC za inkubacijsku smjesu flavona prije dodatka generirajućeg sustava, a Slika 19 TIC za inkubacijsku smjesu flavona s dodanim generirajućim sustavom.



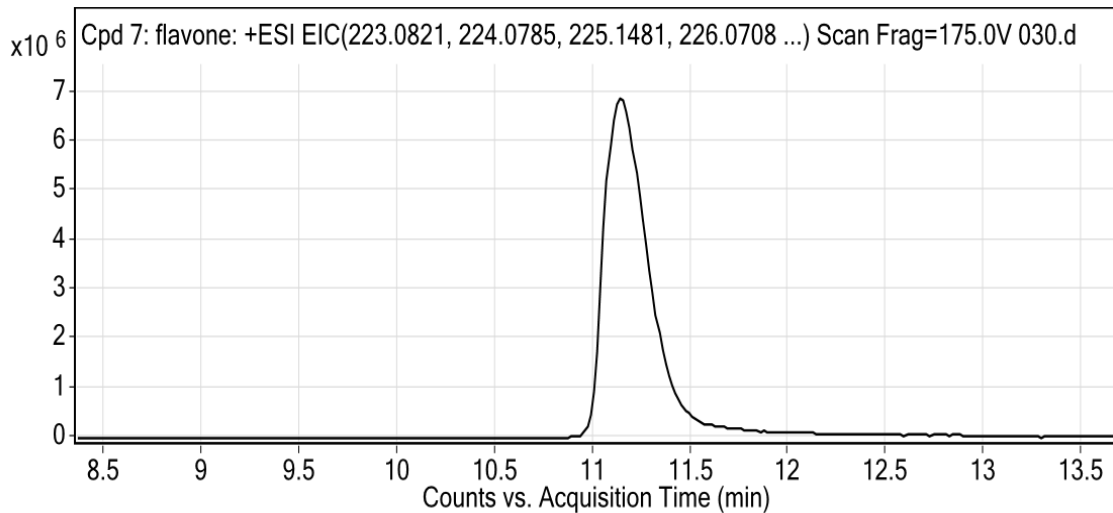
**Slika 18.** TIC za inkubacijsku smjesu flavona bez dodatka generirajućeg sustava.



**Slika 19.** TIC za inkubacijsku smjesu flavona s dodanim generirajućim sustavom.

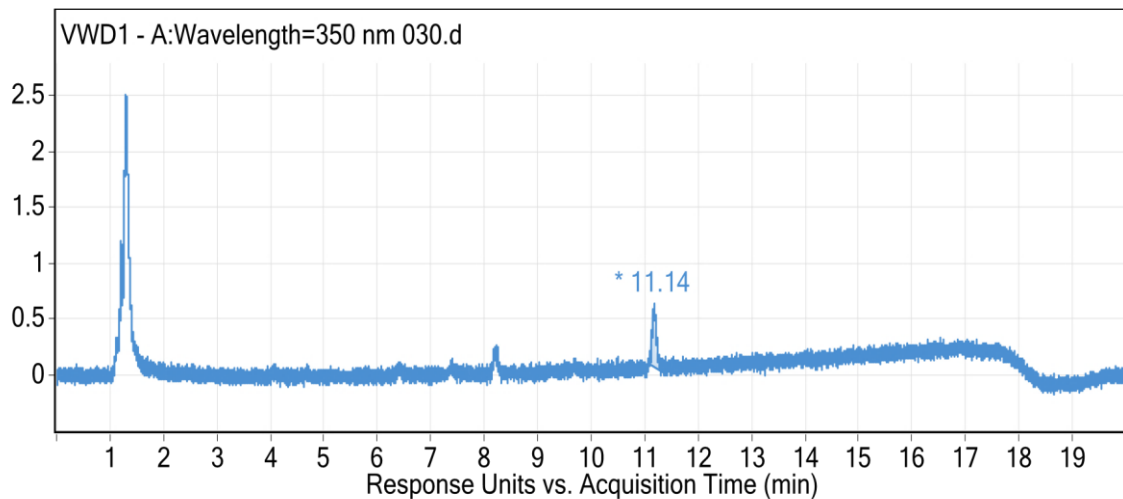
Razlika između ta dva kromatograma je vidljiva, nastali su novi pikovi i vjerojatno su prisutni i neki koje nije u ovom orijentacijskom prikazu moguće vidjeti.

Flavon ima molekulsku formulu  $C_{15}H_{10}O_2$ , a vrijeme zadržavanja 11,16 minuta i  $m/z = 223,0753$  što se lijepo vidi na kromatogramu izdvojenog iona (Slika 20).



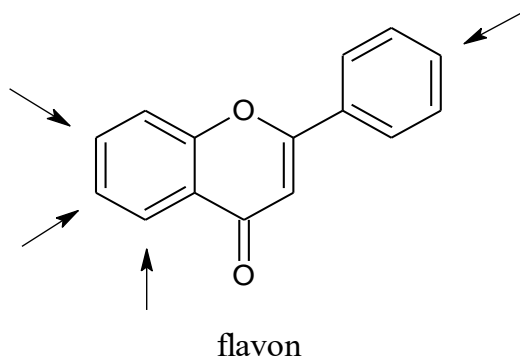
**Slika 20.** Kromatogram izdvojenog iona za flavon nakon s dodanim generirajućim sustavom

UV kromatogram flavona s dodanim generirajućim sustavom nije najpregledniji pa se ne može zaključiti koliko je metabolita nastalo, ali naznake pikova osim pika flavona su prisutne (Slika 21).



**Slika 21.** UV kromatogram inkubacijske smjese za flavon s dodanim generirajućim sustavom.

Budući da se iz ovih dobivenih podataka ne može puno zaključiti o metabolitima, pretpostavlja se da su u reakciji biotransformacije flavonoida prisutne reakcije hidroksilacije aromatskih prstenova (Slika 22).

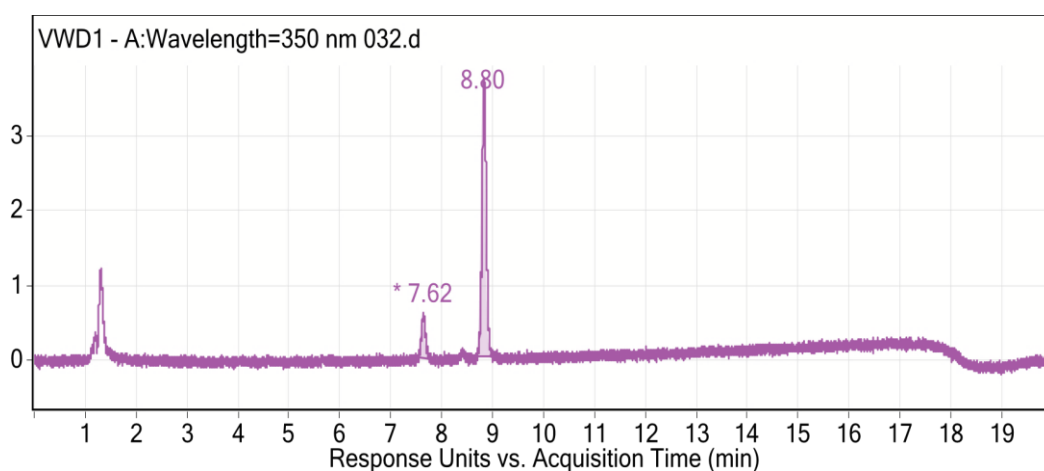


**Slika 22.** Flavon i pretpostavljena mjesta na kojima dolazi do hidroksilacije flavona

Za flavon je opaženo da ima antibakterijsko djelovanje, iako ukoliko dolazi do hidroksilacije njegovi metaboliti pokazuju značajno veći raspon farmakoloških aktivnosti (Kumar i Pandey, 2013).

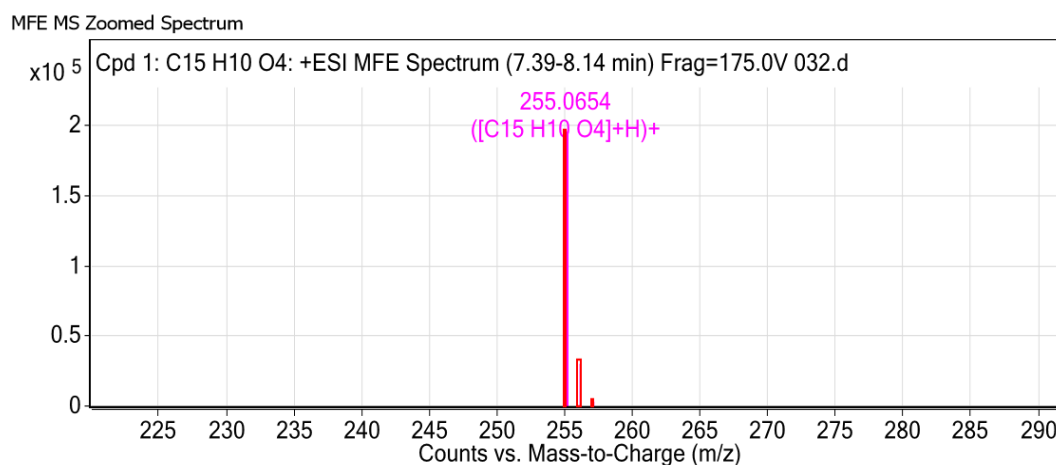
#### 4.4. 7-HIDROKSIFLAVON

UV kromatogram inkubacijske smjese za 7-hidroksiflavon s dodanim generirajućim sustavom prikazuje matični spoj s retencijskim vremenom od 8,80 minuta i još jedan manji pik s retencijskim vremenom 7,62 minute koji je pik metabolita (Slika 23).

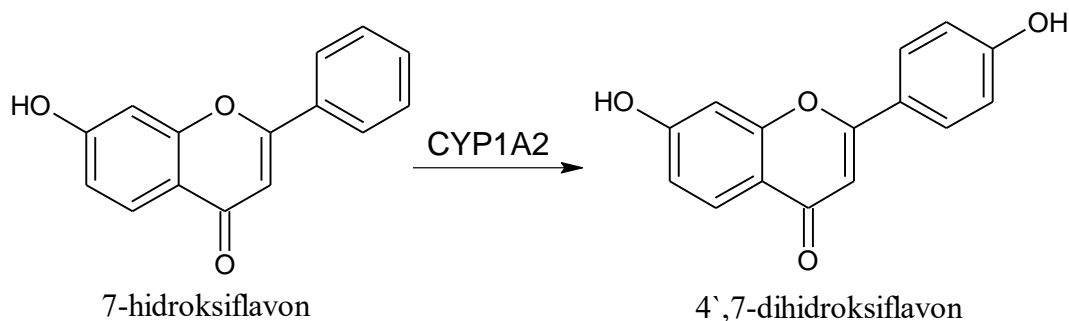


**Slika 23.** UV kromatogram inkubacijske smjese za 7-hidroksiflavon s dodanim generirajućim sustavom.

7-hidroksiflavon ima formulu  $C_{15}H_{10}O_3$ , a  $m/z = 239,0703$ , a Slika 24 prikazuje spektar izdvojenog iona za nepoznati metabolit za kojeg znamo da je formule  $C_{15}H_{10}O_4$  i  $m/z = 255,0654$ . Razliku u formulama, a prati ih i promjena mase upućuje da se radi o reakciji hidroksilacije 7-hidroksiflavona. Vjerojatno se hidroksilira prsten B na položaju 4' (Slika 25).



**Slika 24.** Spektar izdvojenog iona nepoznatog metabolita 7-hidroksiflavona ( $m/z = 255,0654$ ) u inkubacijskoj smjesi za 7-hidroksiflavon s dodanim generirajućim sustavom.

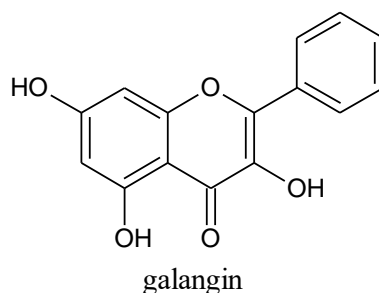


**Slika 25.** Pretpostavljeni metabolizam 7-hidroksiflavona s CYP1A2

7-hidroksiflavon ima antioksidativni učinak i štiti membrane od lipidne peroksidacije (Chaudhuri i sur., 2009). Također je ispitan protiv enterovirusa 71 (EV71) gdje je pokazao aktivnost inhibicijom replikacije virusne RNA, dakle posjeduje i antivirusnu aktivnost (Wang i sur, 2014).

## 4.5. GALANGIN

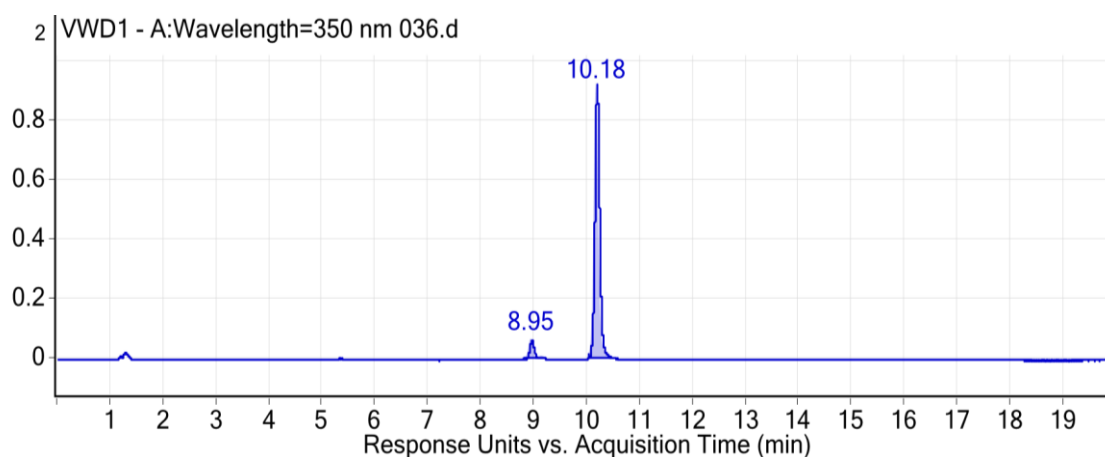
Inkubacijska smjesa za galangin s dodanim generirajućim sustavom nije sadržavala metabolite. Može se zaključiti da se galangin (Slika 26) ne metabolizira s CYP1A2. Iako je u literaturi pronađena informacije da se galangin metabolizira s CYP1A2 i u manjoj mjeri s CYP2C9 do kemferola (Otaka i Walle, 2002).



**Slika 26.** Strukturna formula galangina

## 4.6. 3,7-DIHIDROKSIFLAVON

UV kromatogram inkubacijske smjese za 3,7-dihidroksiflavon s dodanim generirajućim sustavom prikazuje pik 3,7-dihidroksiflavona s vremenom zadržavanja 10,18 minuta i manji pik, koji odgovara metabolitu, s vremenom zadržavanja 8,95 minuta (Slika 27). Tablica 6 daje informacije o formulama spojeva i molekulskoj masi iz kojih se može zaključiti da se ovaj flavonoid metabolizira s CYP1A2 na način da dolazi do reakcija hidroksilacije.

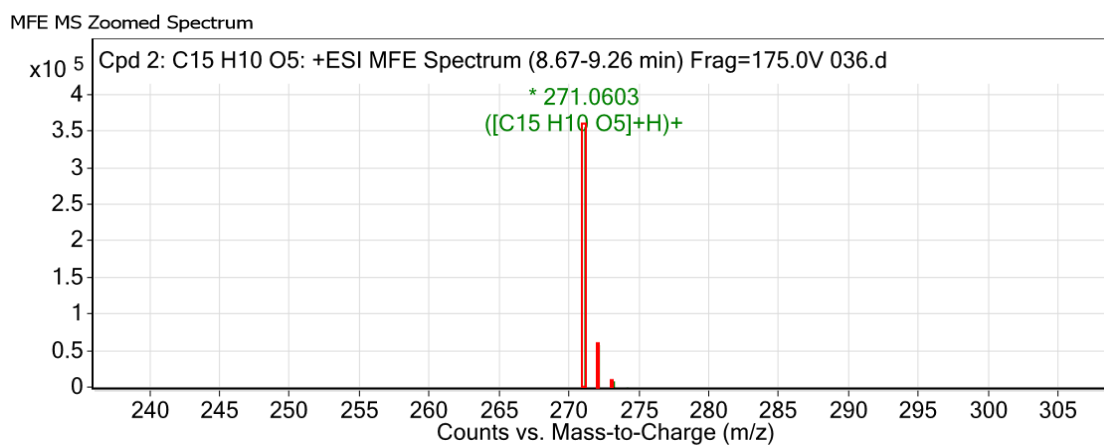


**Slika 27.** UV kromatogram inkubacijske smjese za 3,7-dihidroksiflavon s dodanim generirajućim sustavom.

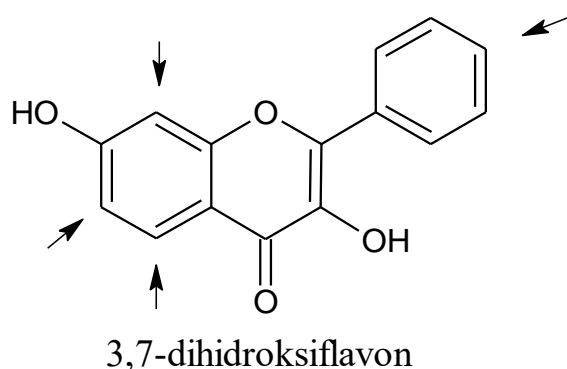
**Tablica 6.** Osnovne informacije o spojevima prikazanih na Slici 27

Spoj	Vrijeme zadržavanja	Masa	Ime spoja	Formula
Cpd 2: C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	8.95	270.053		C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>
Cpd 4: 3,7-dihydroxyflavone	10.18	254.058	3,7-dihidroksiflavon	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>

Slika 28 prikazuje spektar izdvojenog iona metabolita za kojeg se pretpostavlja da je nastao hidroksilacijom A prstena 3,7-dihidroksiflavona, iako su moguće i hidroksilacije na drugim mjestima (Slika 29).



**Slika 28.** Spektar izdvojenog iona metabolita ( $m/z = 271,0603$ ) inkubacijske smjese za 3,7-dihidroksiflavon s dodanim generirajućim sustavom.

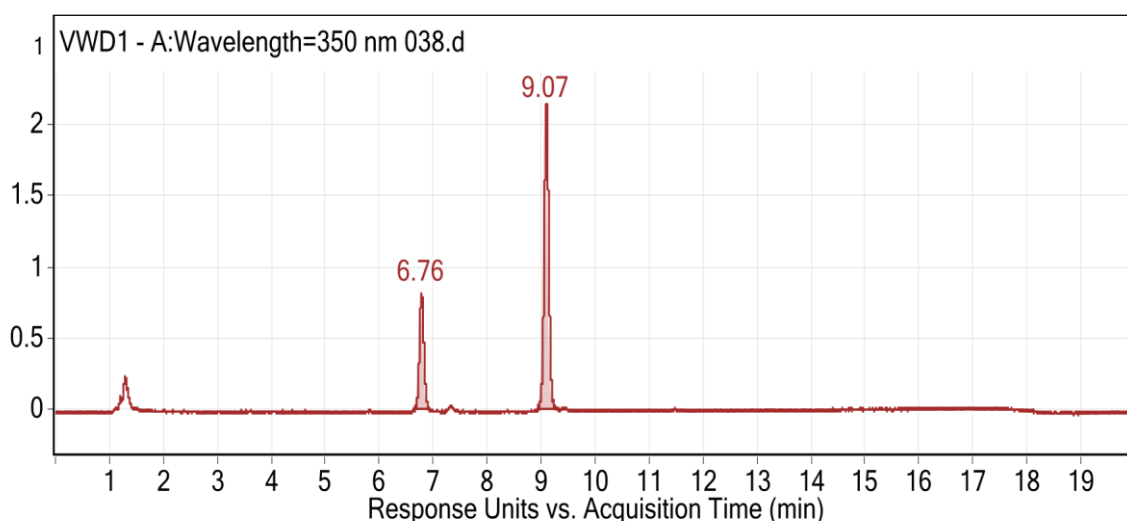


**Slika 29.** Pretpostavljeni metabolizam 3,7-dihidroksiflavona

3,7-dihidroksiflavon pokazuje antikarcinogenu aktivnost. U jednoj studiji poslužio je kao početni spoj iz kojeg su sintetizirani derivati i za koje je onda procjenjena *in vitro* inhibitorna aktivnost tumorskih stanica. Derivati s kondenziranim furanskim i piranskim prstenom su pokazali povećanje inhibitorne aktivnosti u odnosu na početni spoj (Neves i sur., 2011).

## 4.7. 6-HIDROKSIFLAVON

Na UV kromatogramu inkubacijske smjese za 6-hidroksiflavon s dodanim generirajućim sustavom mogu se zapaziti dva pika, gdje veći ima vrijeme zadržavanja 9,07 minuta, a manji 6,76 minuta (Slika 30).



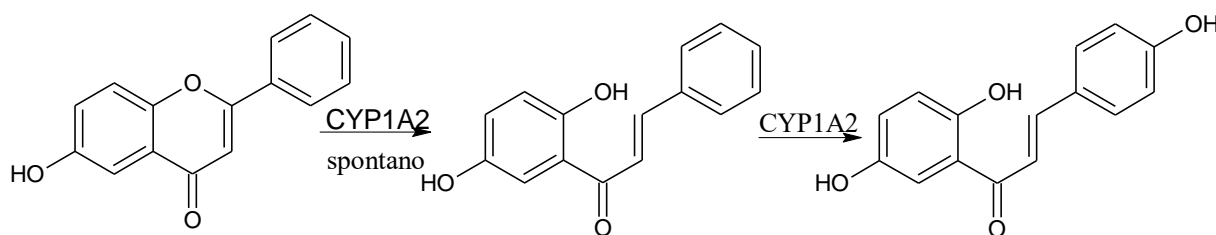
**Slika 30.** UV kromatogram inkubacijske smjese za 3,7-dihidroksiflavon s dodanim generirajućim sustavom.

Tablica 7 daje informacije o formulama spojeva i molekularnoj masi spojeva nađenih na kromatogramu. Iz tih informacija se može zaključiti da ni jedan od spojeva nije 6-hidroksiflavon čija je molekularna masa 238,0630, a molekularna formula  $C_{15}H_{10}O_3$ .

**Tablica 7.** Informacije o spojevima prikazane kromatogramom

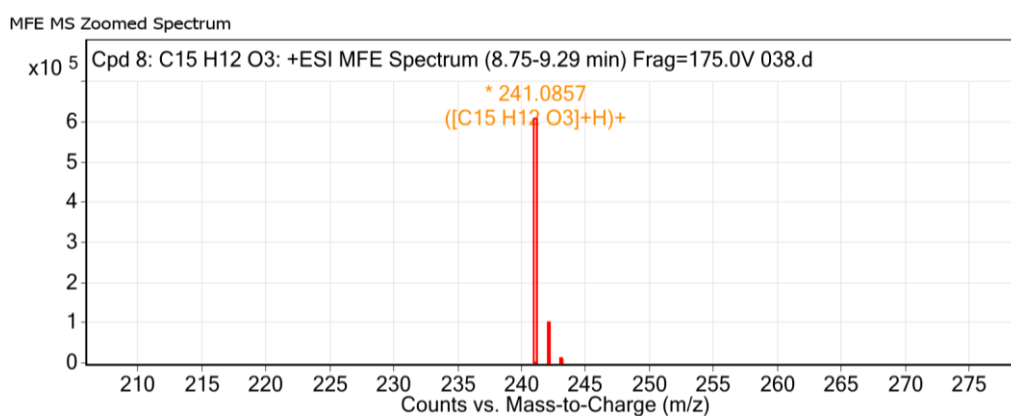
Spoj	Vrijeme zadržavanja	Masa	Formula
Cpd 4: $C_{15}H_{12}O_4$	6.76	256.0736	$C_{15}H_{12}O_4$
Cpd 8: $C_{15}H_{12}O_3$	9.07	240.0784	$C_{15}H_{12}O_3$

Kod 6-hidroksiflavona spontano, i bez prisutstva generirajućeg sustava, dolazi do pucanja prstena C. Drugi produkt nastaje reakcijom hidroksilacije tog spoja (Slika 31).

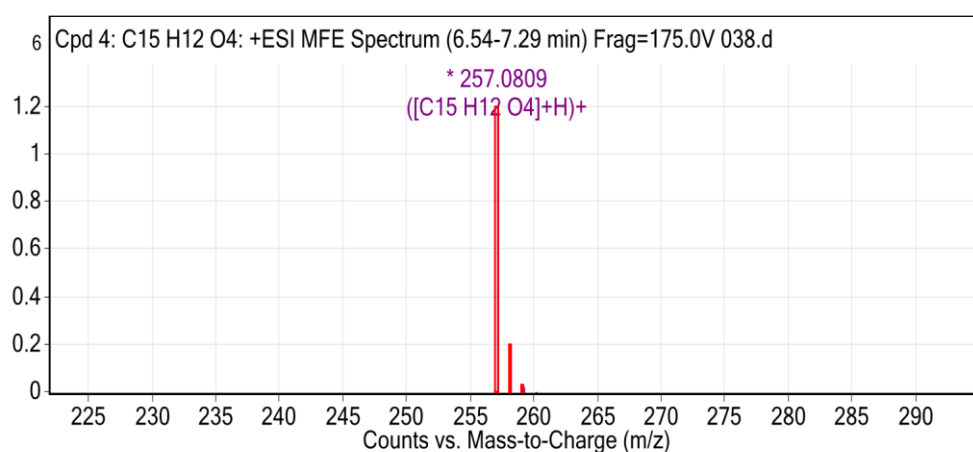


**Slika 31.** Pretpostavljeni metabolizam 6-hidroksiflavona s CYP1A2

Slika 32 i Slika 32 prikazuju spektre izvojenog iona za „raspadni produkt 6-hidroksiflavona“ ( $m/z = 241,0857$ ) i njegov hidroksilirani metabolit ( $m/z = 257,0809$ ).



**Slika 32.** Spektar izdvojenog iona „raspadnog produkta 6-hidroksiflavona“ ( $m/z = 241,0857$ ) inkubacijske smjese za 6-hidroksiflavon s dodanim generirajućim sustavom.



**MS Spectrum Peak List**

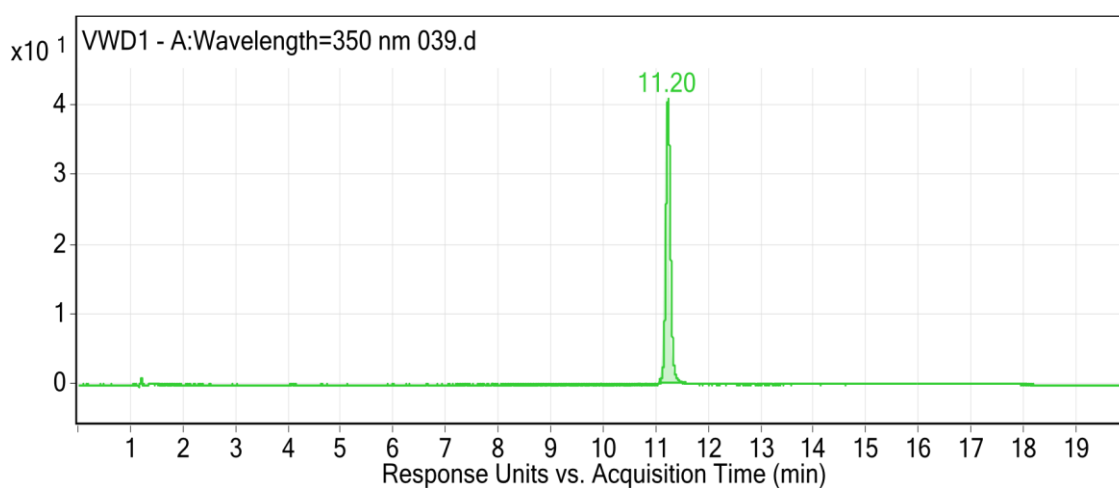
**Slika 33.** Spektar izdvojenog iona hidroksilirani metabolita 6-hidroksiflavona ( $m/z = 257,0809$ ) inkubacijske smjese za 6-hidroksiflavon s dodanim generirajućim sustavom.



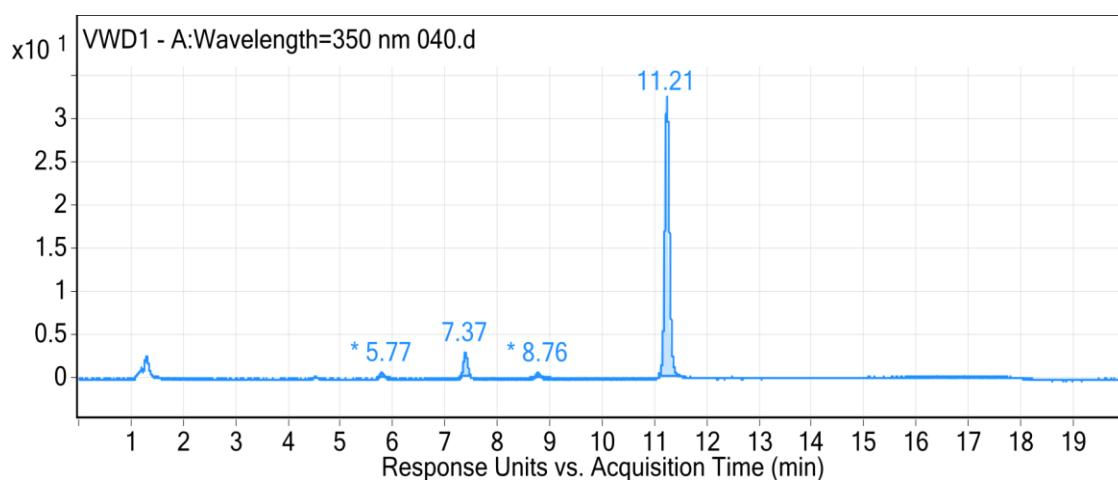
6-hidroksiflavin može se vezati na benzodiazepinsko vezno mjesto na receptoru tipa A gama aminomaslačne kiseline (GABA) i djelovati anksiolitički bez popratnih učinaka (Ren i sur., 2010). U ispitivanju antiagregatornog učinka, 6-hidroksiflavonu je pripisan ovaj učinak (Bojić i sur., 2011).

## 4.8. AKACETIN

Usporedbom UV kromatograma inkubacijske smjese za akacetin bez dodanog generirajućeg sustava (Slika 34) i s dodanim generirajućeg sustava (Slika 35) uočeni su novi pikovi.



**Slika 34.** UV kromatogram inkubacijske smjese za akacetin bez dodanog generirajućeg sustava.

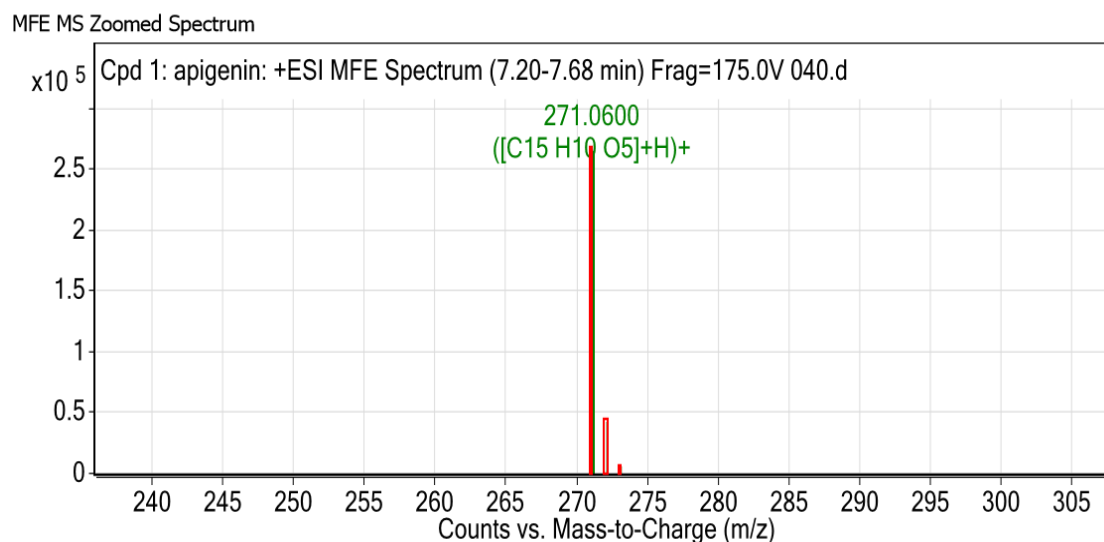


**Slika 35.** UV kromatogram inkubacijske smjese za akacetin s dodanim generirajućim sustavom.

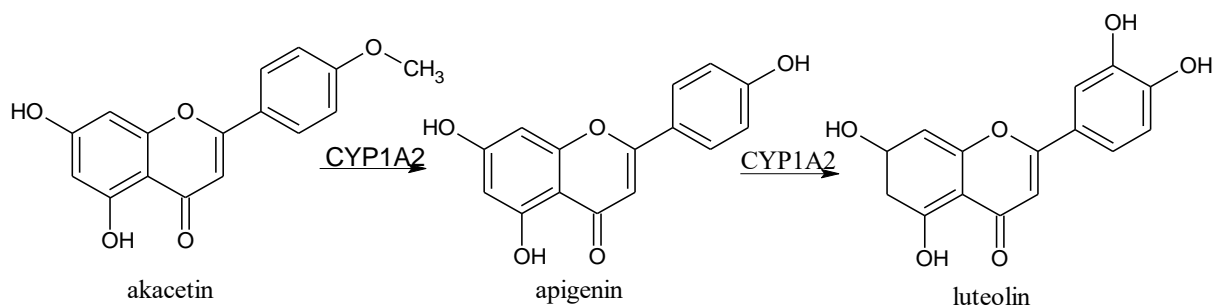
Pik s vremenom zadržavanja od 11,21 minuta pripada akacetinu, pik s vremenom zadržavanja od 7,37 minuta je sigurno metabolit i to apigenin, a ostala dva manja pika imaju premalu površinu da bi se razmatrali. Budući da je metabolit akacetina apigenin, on se isto metabolizira s CYP1A2, što je prikazano u 4.1. poglavlju, i kao metabolit daje luteolin koji ima vrijeme zadržavanja 5,77 minuta. Tako da jedan od pikova s UV kromatograma koji nije nadalje razmatran vjerojatno pripada luteolinu. Tablica 8 pokazuje osnovne podatke za apigenin i akacetin iz kojih se može zaključiti da je došlo do demetilacije akacetina (Slika 37). Demetilacijom nastaje apigenin (Slika 36) koji se može dalje hidroksilirati i dati luteolin.

**Tablica 8.** Informacije o akacetinu i apigeninu

Spoj	Vrijeme zadržavanja	Masa	Ime spoja	Formula
Cpd 1: apigenin	7.37	270.0528	apigenin	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>
Cpd 3: akacetin	11.21	284.0685	akacetin	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>



**Slika 36.** Spektar izdvojenog iona apigenina inkubacijske smjese akacetina s dodanim generirajućim sustavom.

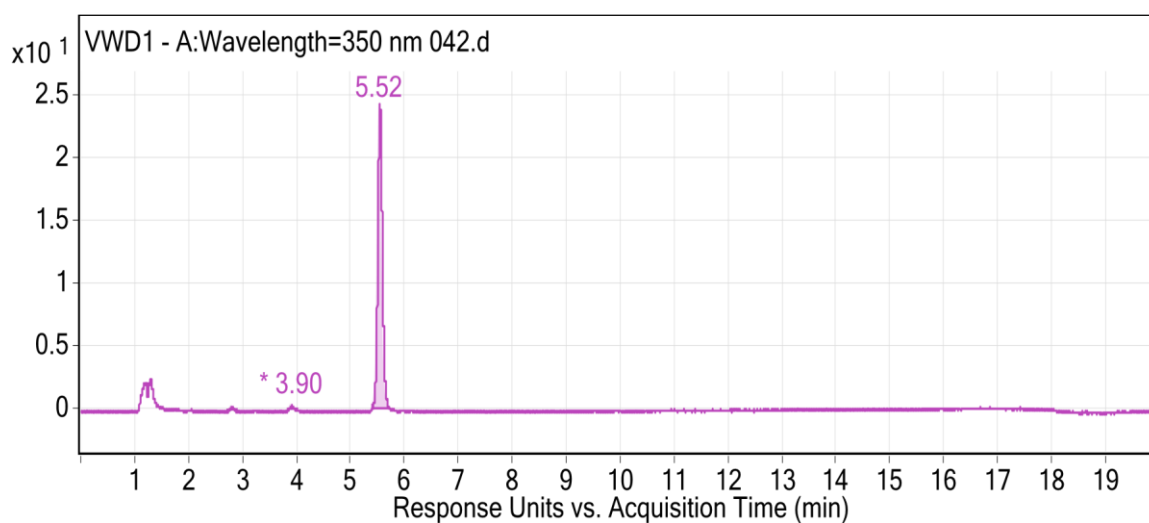


**Slika 37.** Pretpostavljeni metaoblizam akacetina posredovan CYP1A2

Akacetin pokazuje antiagregacijski kao i antikarcinogeni potencijal. Akacetin i apigenin posreduju u sprečavanju aktivacije HIV-1 putem mehanizma koji vjerojatno uključuje inhibiciju virusne transkripcije (Bojić i sur., 2011; Kumar i Pandey, 2013).

## 4.9. NARINGENIN

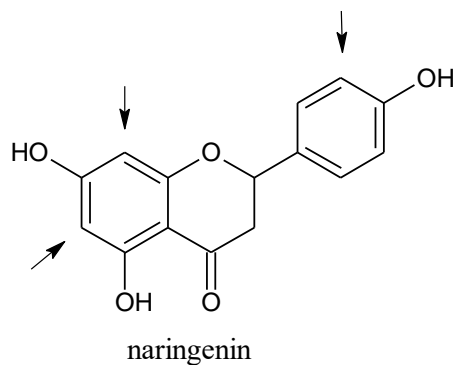
UV kromatogram inkubacijske smjese za naringenin s dodanim generirajućim sustavom sadrži dva pika (Slika 38). Jedan pripada naringeninu, a drugi njegovom metabolitu. Informacije o tim spojevima prikazuje Tablica 9. Usporedbom razlika formula i mase može se zaključiti da se radi o reakciji hidroksilacije naringenina, doduše položaj hidroksilacije nije moguće zaključiti, vjerojatno se odvija na položaju 3', 6 ili 8 (Slika 39). Spektar iona metabolita prikazan je na Slici 40.



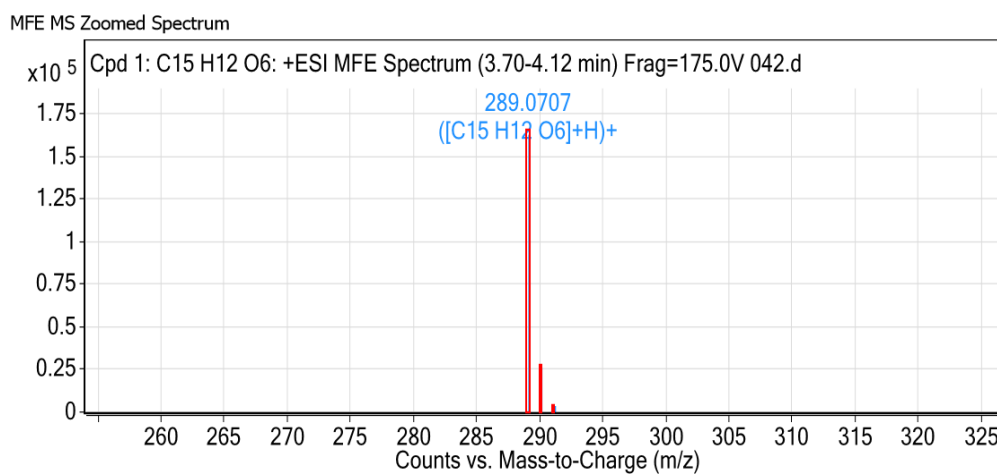
**Slika 38.** UV kromatogram inkubacijske smjese za naringenin s dodanim generirajućim sustavom.

**Tablica 9.** Informacije o naringenu i metabolitu

Spoj	Vrijeme zadržavanja	Masa	Ime spoja	Formula
Cpd 1: C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	3.89	288.0635		C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>
Cpd 5: naringenin	5.53	272.0686	naringenin	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>



**Slika 39.** Naringenin i moguća mjesta hidroksilacije

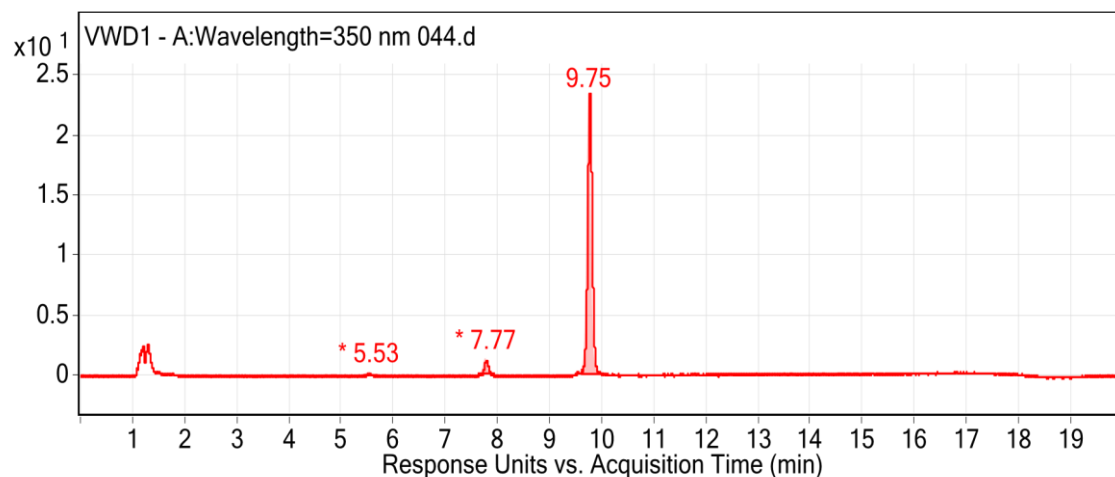


**Slika 40.** Spektar izdvojenog iona metabolita inkubacijske smjese za naringenin s dodanim generirajućim sustavom.

Za naringenin su u literaturi opisani mnogi učinci. Ima protuupalno djelovanje, hepatoprotektivno djelovanje, antiagregatorno djelovanje, veže se za estrogene receptore, djeluje na metabolizam lipida, posjeduje antioksidativnu aktivnost, a viši unos naringenina povezan je s nižom učestalosti cerebrovaskularnih bolesti i astme. Naringenin ima intenzivnu antibakterijsku aktivnost i zbog mogućeg utjecaja na fluidnost membrane može djelovati protiv bakterija poput *Staphylococcus aureus* (MRSA) i streptokoka koji su otporni na meticilin (Bojić i sur., 2011; Erlund, 2004; Kumar i Pandey, 2013).

## 4.10. SAKURANETIN

UV kromatogram inkubacijske smjese sakuranetina s dodanim generirajućim sustavom pokazuje tri pika, od kojih jedan s vremenom zadržavanja od 9,75 minuta pripada sakuranetinu, a ostala dva metabolitima (Slika 41). Tablica 10 daje informacije o nađenim spojevima.

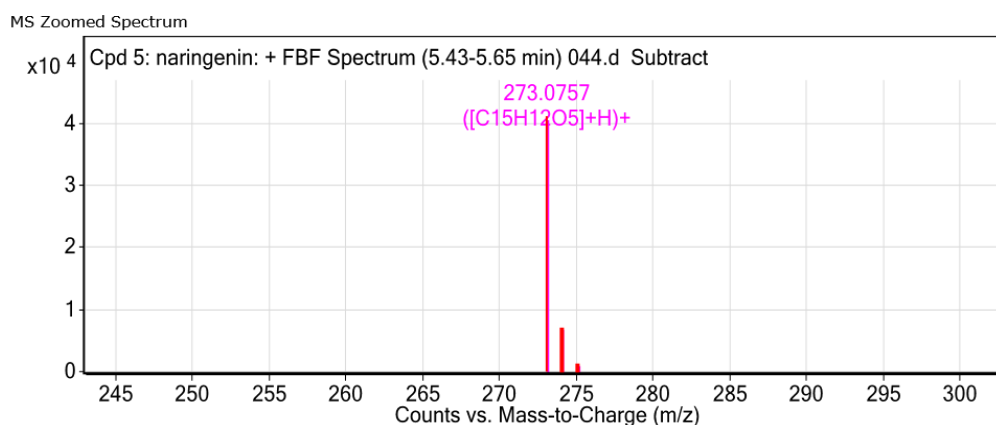


**Slika 41.** UV kromatogram inkubacijske smjese sakuranetina s dodanim generirajućim sustavom.

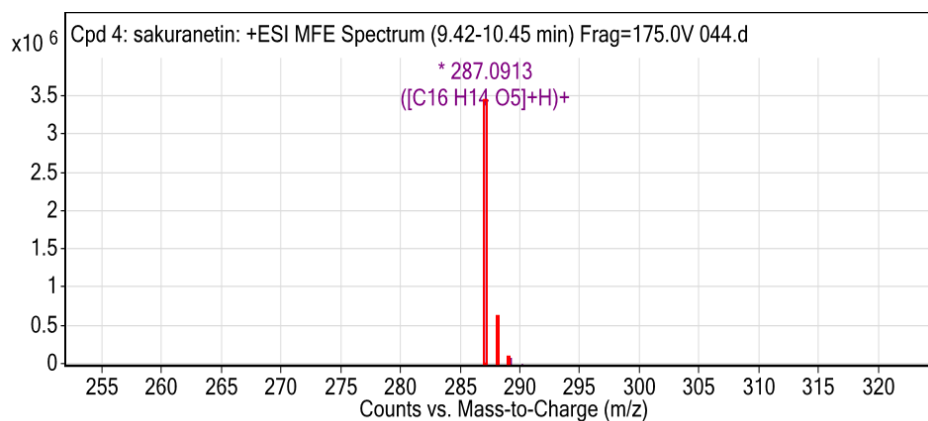
**Tablica 10.** Informacije o sakuranetinu i metabolitima

Spoj	Vrijeme zadržavanja	Masa	Ime spoja	Formula
Cpd 5: naringenin	5.53	272.0684	naringenin	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>
Cpd 1: C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	7.76	302.079		C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>
Cpd 4: sakuranetin	9.75	286.084	sakuranetin	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>5</sub>

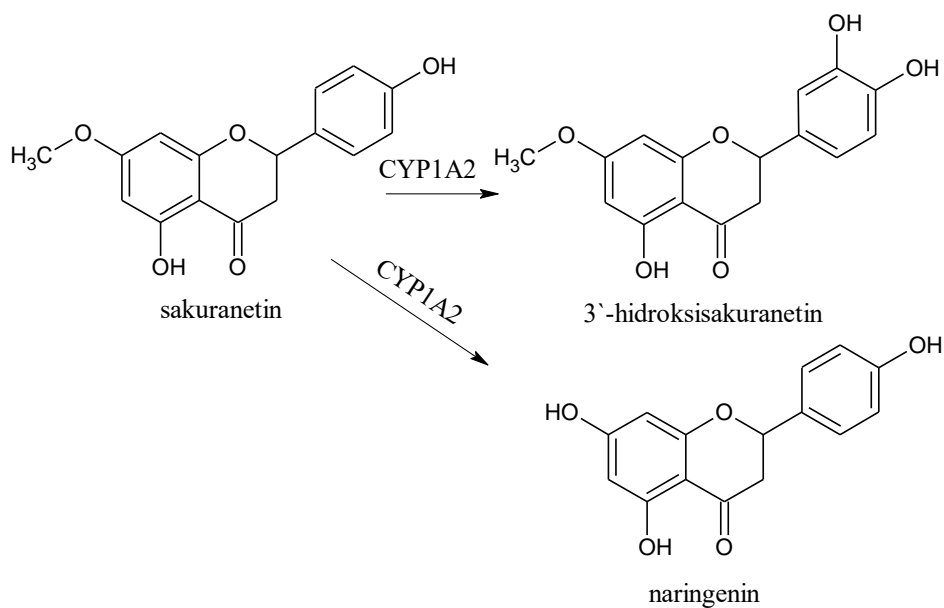
Naringenin kao metabolit sakuranetina nastaje demetilacijom metoksi skupine na položaju 7, razlika u masi i formula ukazuju na reakciju demetilacije (Slika 42). Drugi metabolit je nastao reakcijom hidroksilacije budući da mu formula sadrži atom kisika više, a masa je 15,995 veća od sakuranetina što odgovara kisiku. Vjerojatno dolazi do hidroksilacije B prstena na položaju 3' (Slika 43). Sakuranetin se metabolizira s CYP1A2, a pretpostavljene reakcije sakuranetina prikazane su na Slici 44.



**Slika 42.** Spektar izdvojenog iona naringenina ( $m/z=273,0757$ ) inkubacijske smjese za sakuranetin s dodanim generirajućim sustavom



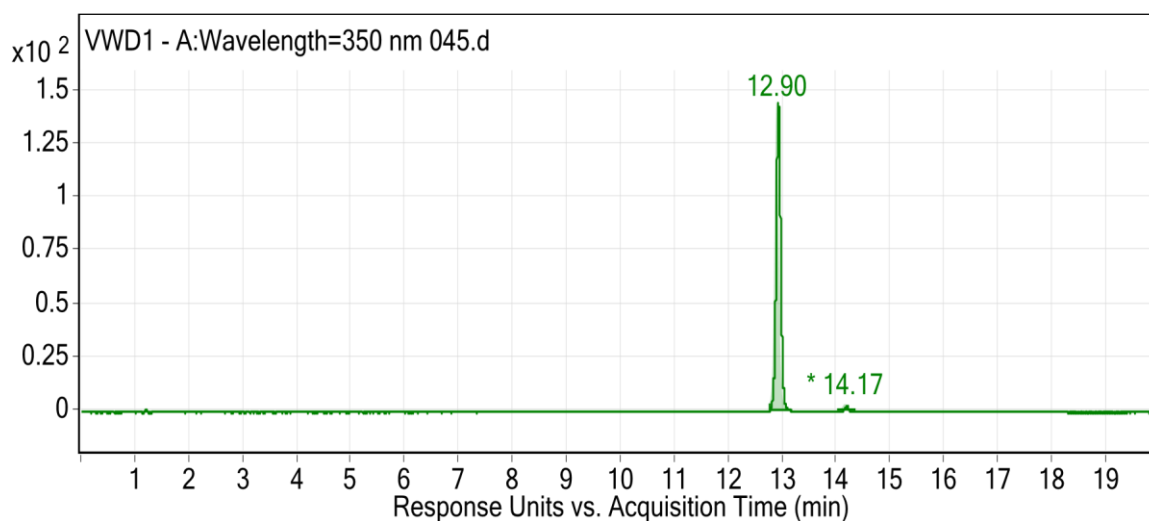
**Slika 43.** Spektar izdvojenog iona metabolita naringenina ( $m/z=287,0913$ ) inkubacijske smjese za sakuranetin s dodanim generirajućim sustavom.



**Slika 44.** Pretpostavljeni metabolizam sakuranetina posredovan CYP1A2

## 4.11. TANGERETIN

UV kromatogram inkubacijske smjese za tangeretin bez dodanog generirajućeg sustava pokazuje dva pika, jedan s vremenom zadržavanja od 12,90 minuta, kojeg bi se lako moglo prepisati tangeretinu, i jedan manji površine svega 1,74 % glavnog pika s vremenom zadržavanja od 14,17 minuta (Slika 45).

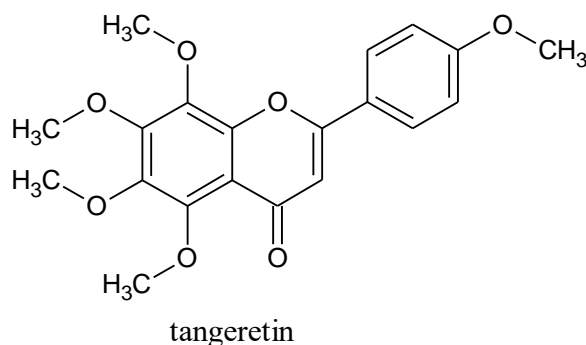


**Slika 45.** UV kromatogram inkubacijske smjese za tangeretin bez dodanog generirajućeg sustava.

Provjerom koji su spojevi u pitanju iza tih pikova pokazalo se da su prisutne tri komponente i da pik na 12,90 zapravo čine dva spoja (Tablica 11). Dakle ovo je inkubacija bez generirajućeg sustava i već su primjećena dva spoja uz tangeretin. Vjerojatno dolazi do spontanog raspada spoja iz nepoznatog razloga. Slika 46 prikazuje strukturnu formulu tangeretina.

**Tablica 11.** Informacije o pronađenim spojevima bez dodanog generirajućeg sustava

Spoj	Vrijeme zadržavanja	Masa	Ime spoja	Formula
Cpd 8: C <sub>18</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	12.9	342.0739		C <sub>18</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>
Cpd 10: tangeretin	12.93	372.1209	tangeretin	C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> O <sub>7</sub>
Cpd 13: C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>7</sub>	14.16	358.1048		C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>7</sub>

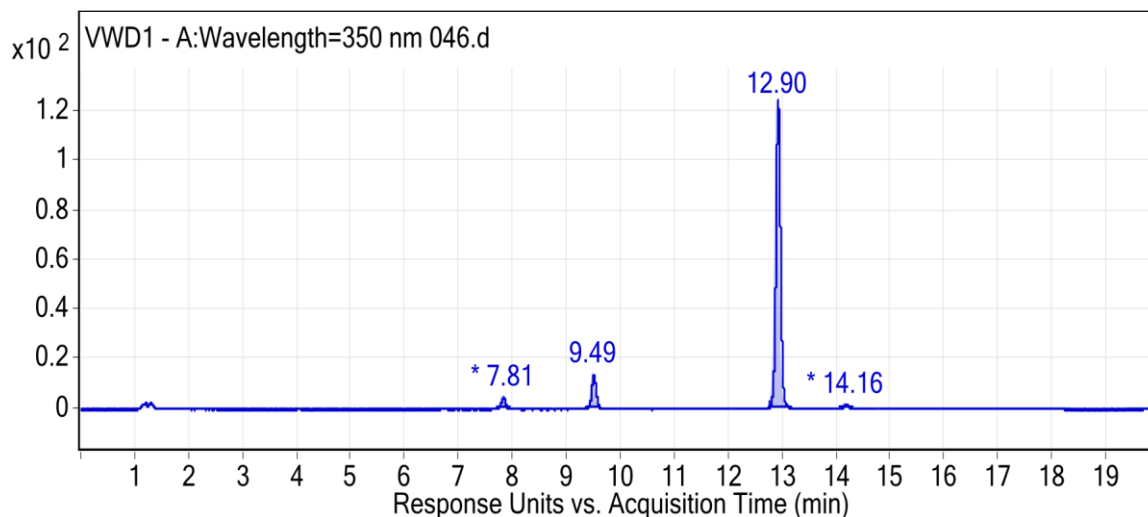


**Slika 46.** Strukturna formula tangeretina

Jedan od metabolita ovog raspada ima formulu C<sub>19</sub>H<sub>18</sub>O<sub>7</sub> i od tangeretina se razlikuje za jednu metilnu skupinu, dakle došlo je do reakcije demetilacije. Drugi metabolit je kompleksniji, za njega se može zaključiti da je izgubio dvije metilne skupine, ali i još dodatna dva ugljika pa postoji mogućnost nastanka kinona na prstenu A.

Nakon dodanog generirajućeg sustava u inkubacijsku smjesu tangeretina vidljivi su novi pikovi i pronađena tri nova metabolita uz već postojeće (Slika 47; Tablica 12).





**Slika 47.** UV kromatogram inkubacijske smjese za tangeretin s dodanim generirajućim sustavom.

**Tablica 12.** Informacije o pronađenim spojevima s dodanim generirajućim sustavom (osjenčani spojevi su primjećeni i bez dodanog generirajućeg sustava)

Spoj	Vrijeme zadržavanja	Masa	Ime spoja	Formula
Cpd 1: C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>	7.81	374.1001		C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>
Cpd 3: C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>7</sub>	9.49	358.1052		C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>7</sub>
Cpd 10: C <sub>18</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	12.9	342.0737		C <sub>18</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>
Cpd 11: C <sub>19</sub> H <sub>17</sub> O <sub>7</sub>	12.9	357.097		C <sub>19</sub> H <sub>17</sub> O <sub>7</sub>
Cpd 13: tangeretin	12.92	372.1207	Tangeretin	C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> O <sub>7</sub>
Cpd 16: C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>7</sub>	14.16	358.1054		C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>7</sub>

Metabolit s formulom C<sub>19</sub>H<sub>18</sub>O<sub>8</sub> vjerojatno je nastalo demetilacijom pa hidroksilacijom ili izravno hidroksilacijom raspadnog produkta. Ta reakcija se vjerojatno zbiva na prstenu B.

Metabolit s formulom C<sub>19</sub>H<sub>18</sub>O<sub>7</sub> je demetilirani. Budući da imamo dva metabolita s istom formulom, ova demetilacija se zbiva na drugom mjestu što nije neobično budući da tangeretin sadrži 5 metoksi skupina.

Metabolit s formulom C<sub>19</sub>H<sub>17</sub>O<sub>7</sub> je izgubio metoksi skupini i jedan vodik, vjerojatno je ovo demetilacija na B.

## **5. ZAKLJUČAK**

Većina ljudi je svakodnevno izložena flavonoida pa je njihov utjecaj na zdravlje važan. Dobar su izvor prirodnih antioksidansa koji neutraliziraju štetne učinke slobodnih radikala, a posjeduju i niz drugih promovirajućih učinaka na zdravlje. Budući da je malo studija o metabolizmu i metabolitima flavonoida, ovo istraživanje je ispitalo metabolizam 11 flavonoida posredovan CYP1A2.

Flavonoidi su analizirani tekućinskom kromatografijom spregnutom sa spektrometrijom masa (MS) i UV-VIS detektorom koja je omogućila pouzdanu detekciju metabolita flavonoida. Apigenin, kemferol, flavon, 7-hidroksiflavon, galangin, 3,7-dihidroksiflavon, 6-hidroksiflavon, akacetin, naringenin, sakuranetin i tangeretin su analizirani flavonoidi, a za kemferol i galangin je utvrđeno da se ne metaboliziraju s CYP1A2 budući da nisu nastali metaboliti nakon dodatka generirajućeg sustava. Za ostalih 9 se pokazalo da se metaboliziraju ovim enzimom budući da su uočeni metaboliti, a to je važna informacija za potencijalne interakcije, ali i daljnja istraživanja. Uočene reakcije kojima nastaju metaboliti su reakcije demetilacije i reakcije hidroksilacije, a do tog zaključka se dolazi usporedbom kromatograma bez i s dodanim generirajućim sustavom, kao i usporedbom vremena potrebnog za eluciju, molekulskih formula i promjene mase iz čega se zaključuje nastali metabolit.

Prema tome ovo istraživanje je dalo uvid u metabolizam i identitete metabolita odabranih flavonoida nakon biotransformacije s CYP1A2.

## **6. LITERATURA**

Basics of LC/MS, 1998., <https://www.agilent.com/cs/library/support/documents/a05296.pdf>, pristupljeno 2.5.2018.

Beecher GR. Overview of Dietary Flavonoids: Nomenclature, Occurrence and Intake. *The Journal of Nutrition*, 2003, 133, 3248S-3254S.

Bojić M, Debeljak Ž, Tomičić M, Medić-Šarić M, Tomić S. Evaluation of antiaggregatory activity of flavonoid aglycone series. *Nutrition Journal*, 2011, 10, Article 73.

Breinholt VM, Offord EA, Brouwer C, Nielsen SE, Brøsen K, Friedberg T. In vitro investigation of cytochrome P450-mediated metabolism of dietary flavonoids. *Food and Chemical Toxicology*, 2002, 40, 609-616.

Caltagirone S, Rossi C, Poggi A, Ranelletti FO, Natali PG, Brunetti M, Aiello FB, Piantelli M. Flavonoids apigenin and quercetin inhibit melanoma growth and metastatic potential. *International Journal of Cancer*, 2000, 87, 595-600.

Cassidy A, Minihane AM. The role of metabolism (and the microbiome) in defining the clinical efficacy of dietary flavonoids. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2017, 105, 10-22.

Chang TKH, Chen J, Yeung E. Effect of Ginkgo biloba extract on procarcinogen bioactivating human CYP1 enzymes: Identification of isoramnetin, kaempferol, and quercetin as potent inhibitors of CYP1B1. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2006, 213, 18-26.

Chaudhuri S, Pahari B, Sengupta PK. Ground and excited state proton transfer and antioxidant activity of 7-hydroxyflavone in model membranes: Absorption and fluorescence spectroscopic studies. *Biophysical Chemistry*, 2009, 139, 29-36.

CYP1A2 allele nomenclature, 2007., <https://www.pharmvar.org/htdocs/archive/cyp1a2.htm>, pristupljeno 16.04.2018.

Dvorak Z. Transcriptional Regulation of Human Drug- Metabolizing Cytochrome P450 Enzymes. U: *Metabolism of Drugs and Other Xenobiotics*. Anzenbacher P, Zanger UM, urednici, Weinheim, Wiley-VCH, 2012, str. 543-582.

Erlund I. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutrition Research*, 2004, 24, 851-874.

Guengerich FP. Cytochrome P450s and Other Enzymes in Drug Metabolism and Toxicity. *The AAPS Journal*, 2006, 8, E101-111.

Guengerich FP. Human Cytochrome P450 Enzymes. U: Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry, 4rd ed. Ortiz de Montellano PR, urednik, New York, Springer International Publishing, 2015, str. 42-47.

Guessous I, Dobrinas M, Kutalik Z, Pruijm M, Ehret G, Maillard M, Bergmann S, Beckmann JS, Cusi D, Rizzi F, Cappuccio F, Cornuz J, Paccaud F, Mooser V, Gaspoz JM, Waeber G, Burnier M, Vollenweider P, Eap CB, Bochud M. Caffeine intake and CYP1A2 variants associated with high caffeine intake protect non-smokers from hypertension. *Human Molecular Genetics*, 2012, 21, 3283-3292.

Havsteen BH. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology and Therapeutics*, 2002, 96, 67-202.

High performance liquid chromatography - HPLC, 2007., <https://www.chemguide.co.uk/analysis/chromatography/hplc.html>, pristupljeno 2.5.2018.

Hodek P. Flavonoids. U: Metabolism of Drugs and Other Xenobiotics. Anzenbacher P, Zanger UM, urednici, Weinheim, Wiley-VCH, 2012, str. 223-259.

Kumar S, Pandey AK. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal*, 2013, 14, 333-345.

Mass Spectrometry and fundamental LC/MS, 2014., <http://www.ecs.umass.edu/eve/background/methods/chemical/Openlit/Chromacademy%20LCMS%20Intro.pdf>, pristupljeno 3.5.2018.

Medicinal flowers and their uses, 2016., <https://www.proflowers.com/blog/medicinal-flowers-and-uses>, pristupljeno 24.4.2018.

Merve A, Gül Ö. The genetic profiles of CYP1A1, CYP1A2 and CYP2E1 enzymes as susceptibility factor in xenobiotic toxicity in Turkish population. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 2017, 25, 294-297.

Neves MP, Cidade H, Pinto M, Silva AMS, Gales L, Damas MD, Lima RT, Vasconcelos MH, Nascimento MJ. Prenylated derivatives of baicalein and 3,7-dihydroxyflavone: Synthesis and study of their effects on tumor cell lines growth, cell cycle and apoptosis. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2011, 46, 2562-2574.

Otake Y, Walle T. Oxidation of the Flavonoids Galangin and Kaempferide by Human Liver Microsomes and CYP1A1, CYP1A2, and CYP2C9. *Drug metabolism and disposition*, 2002, 30, 103-105.

Pietta P, Gardana C. Flavonoids in Herbs. U: Flavonoids in Health and Disease. Rice-Evans CA, Packer L, urednici, New York, Marcel Dekker, 2003, str. 43-71.

Ren L, Wang F, Xu Z, Chan WM, Zhao C, Xue H. GABA<sub>A</sub> receptor subtype selectivity underlying anxiolytic effect of 6-hydroxyflavone. *Biochemical Pharmacology*, 2010, 79, 1337-1344.

Rendić S, Medić-Šarić M. Enzimi citokrom P450. U: Metabolizam lijekova i odabranih ksenobiotika. Medić-Šarić M, urednica, Zagreb, Medicinska naklada, 2013, str. 132-157.

Rendić S. Uloga i značaj metaboličkih reakcija kataliziranih enzimima citokrom P450 (CYP) kod bioloških djelovanja lijekova. *Medicus*, 1995, 4, 49-66.

Sachse C, Bhambra U, Smith G, Lightfoot TJ, Barrett JH, Scollay J, Garner RC, Boobis AR, Wolf CR, Gooderham NJ. 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 of Clinical Pharmacology*, 2003, 55, 68-76.

Shirley KL, Hon YY, Penzak SR, Lam YWF, Spratlin V, Jann MW. Correlation of Cytochrome P450 (CYP) 1A2 Activity Using Caffeine Phenotyping and Olanzapine Disposition in Healthy Volunteers. *Neuropsychopharmacology*, 2003, 28, 961-966.

Striborova M, Levova K, Barta F, Shi Z, Frei E, Schmeiser HH, Nebert DW, Phillips DH, Arlt VM. Bioactivation versus Detoxication of the Urothelial Carcinogen Aristolochic Acid I by Human Cytochrome P450 1A1 i 1A2. *Toxicological Sciences*, 2012, 125, 345-358.

Wang J, Su H, Zhang T, Du S, Cui S, Yang F, Jin Q. Inhibition of Enterovirus 71 Replication by 7-Hydroxyflavone and Diisopropyl-flavon-7-yl Phosphate. *Journal Plos*, 2014, 10, 25-35.

Tiwari SC, Husain N. Biological activities and role of flavonoids in human health- A review. *Indian Journal of Scientific Research*, 2017, 12, 193-196.

Zanger UM, Schwab M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacology and Therapeutics*, 2013, 138, 103-141.



## **7. SAŽETAK/SUMMARY**

## 7.1. SAŽETAK

Flavonoidi su velika grupa sekundarnih metabolita biljaka, a poznati su po svojim pozitivnim učincima na zdravlje. Osnovna struktura flavonoida sačinjena je od dva benzenska prstena povezana s heterocikličkim piranskim prstenom. Veliki broj spojeva flavonoida proizlazi iz supstitucije osnovnog flavonoidnog kostura s različitim kombinacijama višestrukih hidroksi i metoksi skupina. Većina ljudi svakodnevno je izložena flavonoidima pa je njihov utjecaj na ljudsko zdravlje važan. Dokazano je da imaju antibakterijsko, antivirusno, hepatoprotektivno, antitrombotsko i protuupalno djelovanje, a najbolje je istraženo njihovo antioksidativno svojstvo. Iako flavonoidi osiguravaju brojne povoljne učinke na zdravlje, oni su ksenobiotici pa ih je potrebno primjenjivati s određenim oprezom. Metabolizam flavonoida ide preko faze 1 i faze 2 biotransformacije kao i kod drugih ksenobiotika, na primjer lijekova. U fazi 1 metabolizma ksenobiotika ključnu ulogu ima citokrom P450, a pokazalo se da citokrom P450 1A2 (CYP1A2) ima glavnu ulogu u hidroksilaciji i demetilaciji flavonoida.

Ovaj rad baziran je na istraživanju metabolizma flavonoida posredovanog s CYP1A2 kako bi proširili znanja o metabolizmu i metabolitima. Ispitan je metabolizam 11 flavonoida, a za pronalazak metabolita tih flavonoida korištena je tekućinska kromatografija spregnuta sa spektrometrijom masa (LC/MS) i UV-VIS detektor. Metaboliti su pronađeni kod 9 ispitanih flavonoida čime je dokazano da je u njihov metabolizam uključen CYP1A2 enzim. Važnost ove informacije leži u tome što flavonoidi i mnogi prepisani lijekovi dijele metaboličke procese faze 1 i faze 2 te je moguće da flavonoidi u određenoj mjeri utječu na metabolizam lijekova i potrebu za promjenom doziranja istih.

## 7.2. SUMMARY

Flavonoids are a large group of secondary metabolites of plants known for their beneficial effects on human health. Their structure is based on two benzene rings linked with a heterocyclic pyrane ring. The large number of flavonoid compounds is made from various combinations of substitution of the basic flavonoid skeleton with multiple hydroxyl and methoxyl groups. Humans are exposed to flavonoids on a daily basis and their impact on human health is of relevance. They have been found to have antimicrobial, antiviral, antihepatotoxic, antiplatelet and anti-inflammatory activities, but the best described property is antioxidant capacity. Although flavonoids provide numerous beneficial properties to human health, they are xenobiotics, so they have to be used with caution. Metabolism of flavonoids goes via phase 1 and phase 2 biotransformation, which is similar to other xenobiotics such as drugs. Cytochrome P450 play a key role in phase 1 metabolism of xenobiotics and it has been shown that cytochrome P450 1A2 (CYP1A2) has a major role in hydroxylation and demethylation of flavonoids.

This thesis is based on research of flavonoids metabolism mediated by CYP1A2 for the purpose of expanding knowledge about flavonoid metabolism and metabolites. In this study, the interest was focused on metabolism of 11 flavonoids mediated by CYP1A2. Liquid chromatography mass spectrometry (LC/MS) and UV-VIS detector was used to find the metabolites of flavonoids. Of the 11 analysed flavonoids, 9 showed the tendency of biotransformation which proves the presence of enzyme CYP1A2 in their metabolism. This is important information because the flavonoids and many prescribed medications share phase 1 and phase 2 metabolic processes. Therefore, it is possible that flavonoids have an effect on drug metabolism and dosing amounts.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Farmacija  
Zavod za farmaceutsku kemiju  
Ante Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### Metabolizam flavonoida posredovan citokromom P450 1A2

**Marija Bardić**

#### SAŽETAK

Flavonoidi su velika grupa sekundarnih metabolita biljaka, a poznati su po svojim pozitivnim učincima na zdravlje. Osnovna struktura flavonoida sačinjena je od dva benzenska prstena povezana s heterocikličkim piranskim prstenom. Veliki broj spojeva flavonoida proizlazi iz supstitucije osnovnog flavonoidnog kostura s različitim kombinacijama višestrukih hidroksi i metoksi skupina. Većina ljudi svakodnevno je izložena flavonoidima pa je njihov utjecaj na ljudsko zdravlje važan. Dokazano je da imaju antibakterijsko, antivirusno, hepatoprotektivno, antitrombotsko i protuupalno djelovanje, a najbolje je istraženo njihovo antioksidativno svojstvo. Iako flavonoidi osiguravaju brojne povoljne učinke na zdravlje, oni su ksenobiotici pa ih je potrebno primjenjivati s određenim oprezom. Metabolizam flavonoida ide preko faze 1 i faze 2 biotransformacije kao i kod drugih ksenobiotika, na primjer lijekova. U fazi 1 metabolizma ksenobiotika ključnu ulogu ima citokrom P450, a pokazalo se da citokrom P450 1A2 (CYP1A2) ima glavnu ulogu u hidroksilaciji i demetilaciji flavonoida. Ovaj rad baziran je na istraživanju metabolizma flavonoida posredovanog s CYP1A2 kako bi proširili znanja o metabolizmu i metabolitima. Ispitan je metabolizam 11 flavonoida, a za pronalazak metabolita tih flavonoida korištena je tekućinska kromatografija spregnuta sa spektrometrijom masa (LC/MS) i UV-VIS detektor. Metaboliti su pronađeni kod 9 ispitanih flavonoida čime je dokazano da je u njihov metabolizam uključen CYP1A2 enzim. Važnost ove informacije leži u tome što flavonoidi i mnogi prepisani lijekovi dijele metaboličke procese faze 1 i faze 2 te je moguće da flavonoidi u određenoj mjeri utječu na metabolizam lijekova i potrebu za promjenom doziranja istih.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 62 stranica, 47 grafičkih prikaza, 12 tablica i 33 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Flavonoidi, CYP1A2, metabolizam

Mentor: **Dr. sc. Mirza Bojić**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Mirza Bojić**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*

**Dr. sc. Željko Maleš**, *redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*

**Dr. sc. Željka Korade**, *redovita profesorica Sveučilišta u Nebrasci*

Rad prihvaćen: svibanj 2018.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Pharmacy  
Department of Pharmaceutical Chemistry  
Ante Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### Metabolism of flavonoids mediated by cytochrome P450 1A2

**Marija Bardić**

#### SUMMARY

Flavonoids are a large group of secondary metabolites of plants known for their beneficial effects on human health. Their structure is based on two benzene rings linked with a heterocyclic pyrane ring. The large number of flavonoid compounds is made from various combinations of substitution of the basic flavonoid skeleton with multiple hydroxyl and methoxyl groups. Humans are exposed to flavonoids on a daily basis and their impact on human health is of relevance. They have been found to have antimicrobial, antiviral, antihepatotoxic, antiplatelet and anti-inflammatory activities, but the best described property is antioxidant capacity. Although flavonoids provide numerous beneficial properties to human health, they are xenobiotics, so they have to be used with caution. Metabolism of flavonoids goes via phase 1 and phase 2 biotransformation, which is similar to other xenobiotics such as drugs. Cytochrome P450 play a key role in phase 1 metabolism of xenobiotics and it has been shown that cytochrome P450 1A2 (CYP1A2) has a major role in hydroxylation and demethylation of flavonoids. This thesis is based on research of flavonoids metabolism mediated by CYP1A2 for the purpose of expanding knowledge about flavonoid metabolism and metabolites. In this study, the interest was focused on metabolism of 11 flavonoids mediated by CYP1A2. Liquid chromatography mass spectrometry (LC/MS) and UV-VIS detector was used to found the metabolites of flavonoids. Of the 11 analysed flavonoids, 9 showed the tendency of biotransformation which proves the presence of enzyme CYP1A2 in their metabolism. This is important information because the flavonoids and many prescribed medications share phase 1 and phase 2 metabolic processes. Therefore, it is possible that flavonoids have an effect on drug metabolism and dosing amounts.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 62 pages, 47 figures, 12 tables and 33 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Flavonoids, CYP1A2, metabolism

Mentor: **Mirza Bojić, Ph.D.**, *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Mirza Bojić, Ph.D.**, *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

**Željko Maleš, Ph.D.**, *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

**Željka Korade, Ph.D.**, *Full Professor*, University of Nebraska

The thesis was accepted: May 2018.