

Praćenje metabolizma aglikona flavonoida posredovanog enzimima citokrom P450

Lozić, Mirela

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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:163:454903>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**



Repository / Repozitorij:

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



Mirela Lozić

**Praćenje metabolizma aglikona flavonoida
posredovanog enzimima citokrom P450**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2017.

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

Zahvaljujem se mentoru doc. dr. sc. Mirzi Bojiću na stručnom vodstvu, pomoći i savjetima pri izradi ovog rada, Goranu Benkoviću, mag.pharm., za pomoći pri interpretaciji rezultata, te HALMED-u gdje je učinjen dio eksperimentalnog dijela ovog rada. Rad je izrađen u sklopu HRZZ projekta UIP-2014-09-5704.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. CITOKROM P450 I METABOLIZAM LIJEKOVA	2
1.1.1. P450 1A2	3
1.1.2. P450 2A6	4
1.1.3. P450 2B6.....	5
1.1.4. P450 2C8.....	5
1.1.5. P450 2C9.....	7
1.1.6. P450 2C19.....	8
1.1.7. P450 2D6	9
1.1.8. P450 2E1	10
1.1.9. P450 3A	10
1.2. FLAVONOIDI.....	13
1.2.1. Farmakološki učinci flavonoida.....	15
2. OBRAZLOŽENJE TEME	17
3. MATERIJALI I METODE.....	19
3.1. MATERIJALI.....	20
3.1.1. Reagensi.....	20
3.1.2. Pribor.....	21
3.2. METODE.....	22
3.3. POSTUPAK.....	24
4. REZULTATI.....	25
4.1. APIGENIN	26
4.2. KEMFEROL.....	28
4.3. FLAVON	31
4.4. 7-HIDROKSIFLAVON.....	35
4.5. GALANGIN	37
4.6. 3,7-HIDROKSIFLAVON.....	39
4.7. 6-HIDROKSIFLAVON.....	41
4.8. AKACETIN.....	45
4.9. NARINGENIN	48
4.10. SAKURANETIN.....	50

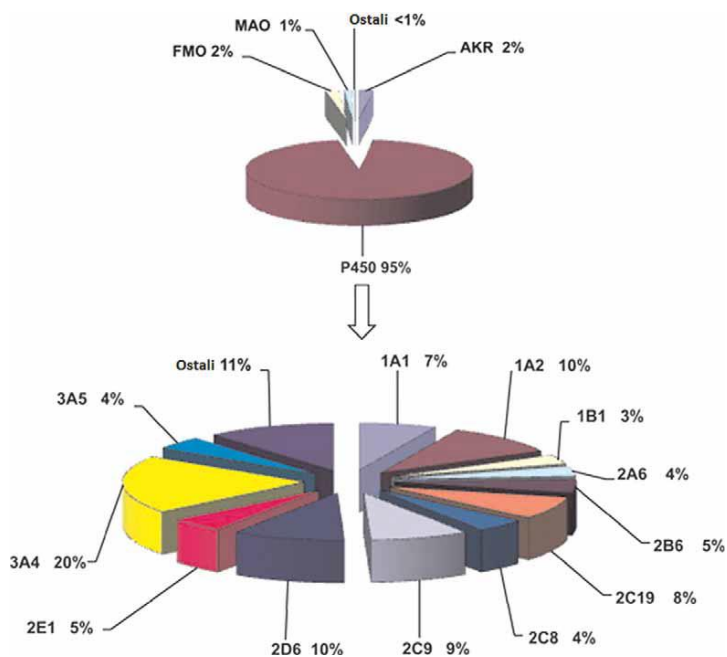
4.11. TANGERETIN	53
5. RASPRAVA.....	55
6. ZAKLJUČAK	61
7. LITERATURA.....	63
8. SAŽETAK/SUMMARY	72
8.1. SAŽETAK	73
8.2. SUMMARY.....	74
9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/ BASIC DOCUMENTATION CARD	75

1. UVOD

1.1. CITOKROM P450 I METABOLIZAM LIJEKOVA

Hrana je izvor energije i građevnih jedinica (ugljikohidrata, masti, bjelančevina) te nutrijenata neophodnih za normalno funkcioniranje organizma (vitamini i minerali). Prehranom se uz neophodne sastavnice unosi i niz tvari stranih organizmu – ksenobiotika (grč. *xenos* – stran, *bios* – život). Evolucijski se razvio čitav niz enzimskih sustava kojima je cilj te strane tvari prevesti (metabolizirati) u vodotopljiv oblik pogodan za izlučivanje. Dominantni enzimi u metabolizmu ksenobiotika, a time i lijekova, su citokromi P450. Udio citokroma P450 u ukupnom metabolizmu lijekova je 74%, nakon čega slijede uridin-difosfat-glukuronozil transferaze (UGT) s 15% (Guengerich, 2015). P450 enzimi su najznačajniji enzimi u reakcijama I faze (oksidacije i redukcije), a UGT enzimi u reakcijama II faze (konjugacije). Visokom udjelu tih enzima u ukupnom metabolizmu pridonosi smještaj na membranama endoplazmatskog retikuluma pa tako produkt citokroma P450 postaje supstrat UGT-a.

Iz godine u godinu rastu spoznaje o metabolizmu, pa se tako i brojke o udjelu pojedinih enzima u ukupnom metabolizmu mijenjaju. Rendić i Guengerich su u nedavnoj studiji metaboličkih reakcija ksenobiotika zaključili da citokromi P450 sudjeluju u 95% reakcija oksidacija i redukcija (slika 1.). Zanimljivo je da se udio CYP3A potporodice smanjio (s 46% na 24%), no i dalje P450 3A4 ostaje najznačajniji P450 enzim s udjelom od 20% (Rendić i Guengerich, 2015).

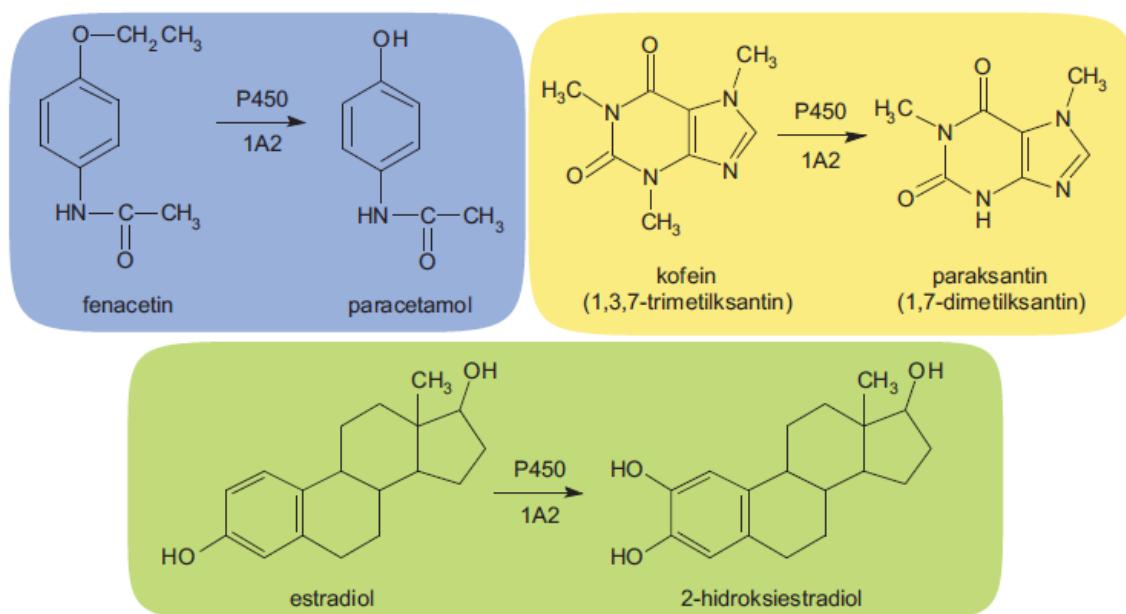


Slika 1. Udio citokroma P450 u reakcijama oksidacija i redukcija, temeljen na broju reakcija koje kataliziraju pojedini enzimi (Skraćenice: P450 – citokrom P450, AKR – aldo-keto reduktaze, FMO – flavinmonooksigenaze, MAO – monoaminoksidaze) (Rendić i Guengerich, 2015).

1.1.1. P450 1A2

Enzim P450 1A2 eksprimiran je primarno u jetri s udjelom od 6–12% i visokom varijabilnošću do 40 puta. Lista supstrata je ekstenzivna te uključuje klozapin, ciklobenzaprin, duloksetin, fluvoksamin, haloperidol, imipramin, meksiletin, nabumeton, naproksen, olanzapin, riluzol, takrin, teofilin, tizanidin, triamteren, zileuton, zolmitriptan. Najčešće primjenjivani marker supstrati su kofein koji se *N*³-demetilacijom prevodi u paraksantin i fenacetin koji *O*-deetilacijom prelazi u aktivni oblik paracetamol (slika 2.). Endogeni supstrati ovog enzima su 17 α -estradiol i estron koji su podložni hidroksilaciji na položaju 2. P450 1A2 je uključen i u bioaktivaciju kancerogena kao što je aristolohična kiselina, čija se bioaktivacija povezuje s nefropatijama i urotelijalnim karcinomom (Stiborova i sur., 2012).

Lijekovi inhibitori P450 1A2 obuhvaćaju, između ostalih, cimetidin, fluorokinolone, fluvoksamin i tiklopidin. U *in vitro* modelima se koriste i inhibitori furafilin te γ -naftoflavon.



Slika 2. Odabrane reakcije P450 1A2: *O*-deetilacija fenacetina, *N*³-demetilacija kofeina i 2-hidroksilacija estradiola.

Pušenje inducira ekspresiju P450 1A2. Pojačana ekspresija ovog enzima povezuje se s povećanim rizikom raka debelog crijeva, no pojačana ekspresija P450 1A2 praćena je i povećanom aktivnošću *N*-acetiltransferaze (Lang i sur., 1994). Primjer povezanosti aktivnosti s toksičnošću predstavlja fenacetin. Ukoliko je aktivnost P450 1A2 smanjena, reakcija deacetilacije postaje dominantna što rezultira nastankom kinonimina koji se povezuju s pojavom methemoglobinemije (Fischbach i Lenk, 1985).

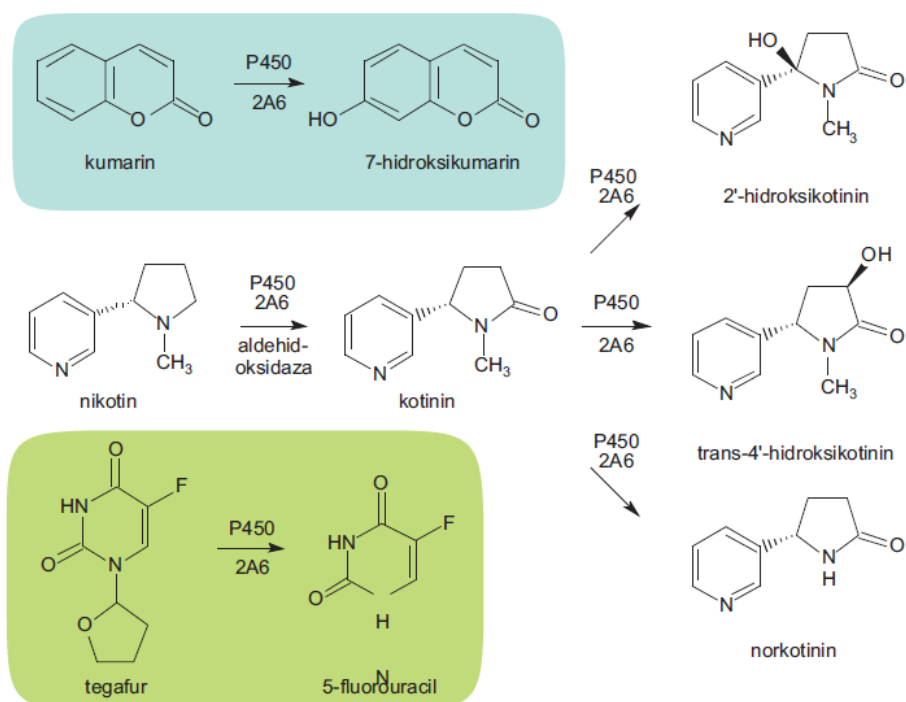
1.1.2. P450 2A6

Citokrom P450 2A6 eksprimiran je u jetri i podložan je visokoj varijabilnosti udjela u ukupnoj ekspresiji P450 (do 13%) (Zhao i sur., 2012). Ovaj je enzim uključen u oksidaciju nikotina; prevodi nikotin u kotinin te katalizira hidroksilaciju nikotina na položaju 2' (slika 3.) (Rendić i Medić-Šarić, 2013). U osoba sa smanjenom aktivnošću P450 2A6 smanjen je metabolizam nikotina pa postoji manji rizik od nastanka karcinoma (Pianezza i sur., 1998).

Marker reakcija ovog enzima je hidroksilacija kumarina na položaju 7 (slika 3.), a primjenjuje se i u *in vivo* dijagnostici (Rautio i sur., 1992). P450 2A6 prevodi paraksantin (glavni metabolit kofeina nastao djelovanjem P450 1A2) u 1,7-dimetilmokraćnu kiselinu te aktivira tegafur u 5-fluorouracil (slika 3.). Pilokarpin, bilirubin i metronidazol također predstavljaju supstrate P450 2A6.

Prirodni spojevi 8-metoksiporsalen i mentofuran te tuberkulostatik izonijazid su o metabolizmu ovisni inaktivatori P450 2A6. Od prirodnih spojeva značajan broj flavonoida inhibira P450 2A6.

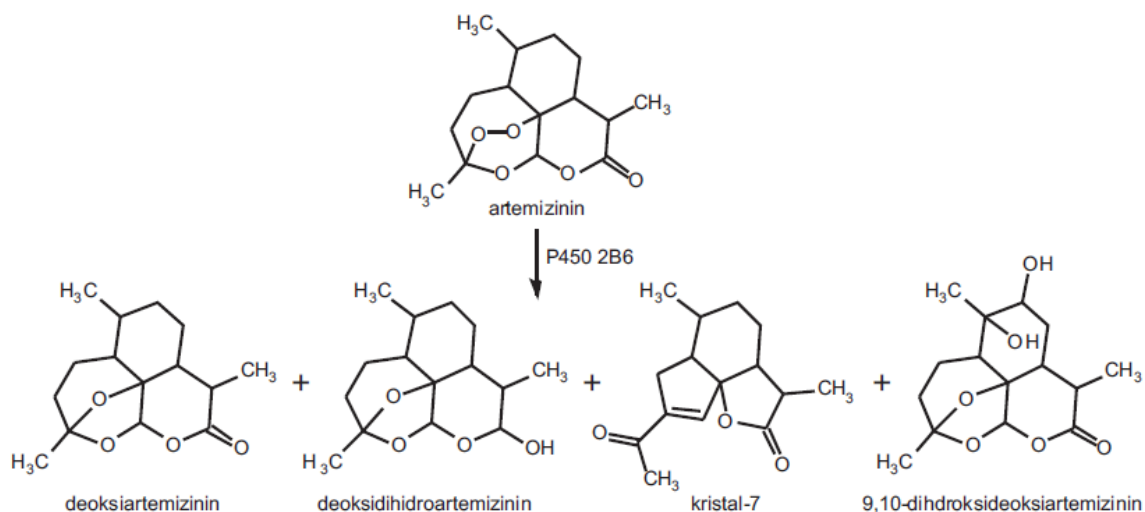
Toksičnost halotana povezuje se s nastankom slobodnih radikala djelovanjem P450 2A6 što za posljedicu ima peroksidaciju lipida (Minoda i Kharasch, 2001). Ovaj je enzim također uključen u bioaktivaciju policikličkih aromatskih ugljikovodika i arilamina (Shimada i sur., 2013).



Slika 3. Neke reakcije citokroma P450 2A6: hidroksilacija kumarina, oksidacija nikotina i dealkilacija 5-fluorouracila.

1.1.3. P450 2B6

Citokrom P450 2B6 eksprimiran je u jetri, a manjim dijelom i u plućima (Hukkanen i sur., 2002). Supstrati uključuju artemizinin (slika 4.), bupropion, ciklofosamid, efavirenz, ifosfamid i metadon, s tim da bupropion predstavlja marker supstrat *in vitro*, a efavirenz *in vivo* (Ward i sur., 2003; Gerin i sur., 2013).

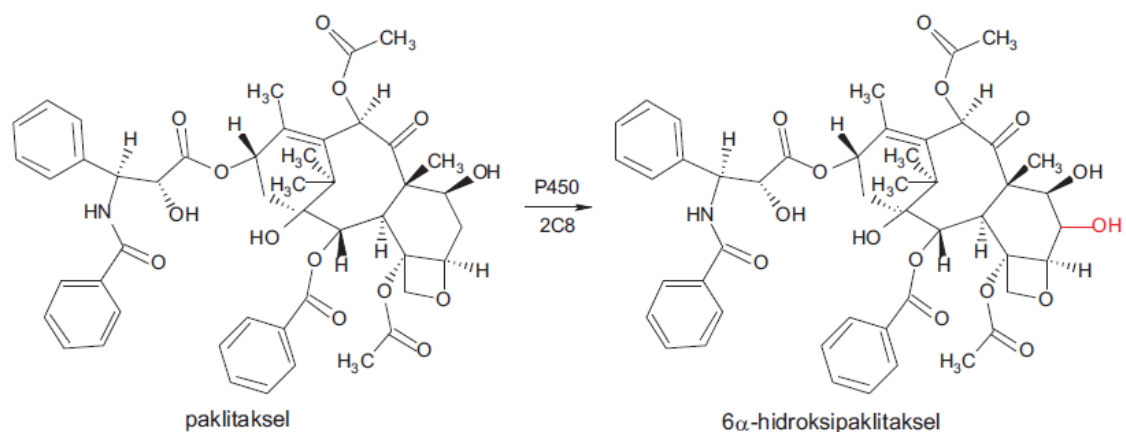


Slika 4. Produkti biotransformacije artemizininina katalitičkim djelovanjem P450 2B6.

17 α -etinilestradiol je ireverzibilni inhibitor koji se veže za apoprotein P450 2A6, a duloksetin je reverzibilni i vremenski ovisan inhibitor P450 2A6 (Kent i sur., 2008; Chan i sur., 2011). Lista ostalih inhibitora je također značajna, a uključuje: tiotepu, tiklopidin, klopidogrel, metadon, sibutramin, ritonavir i sok grejpa. Fenobarbiton, fenitoin i rifampin induciraju ekspresiju P450 2B6.

1.1.4. P450 2C8

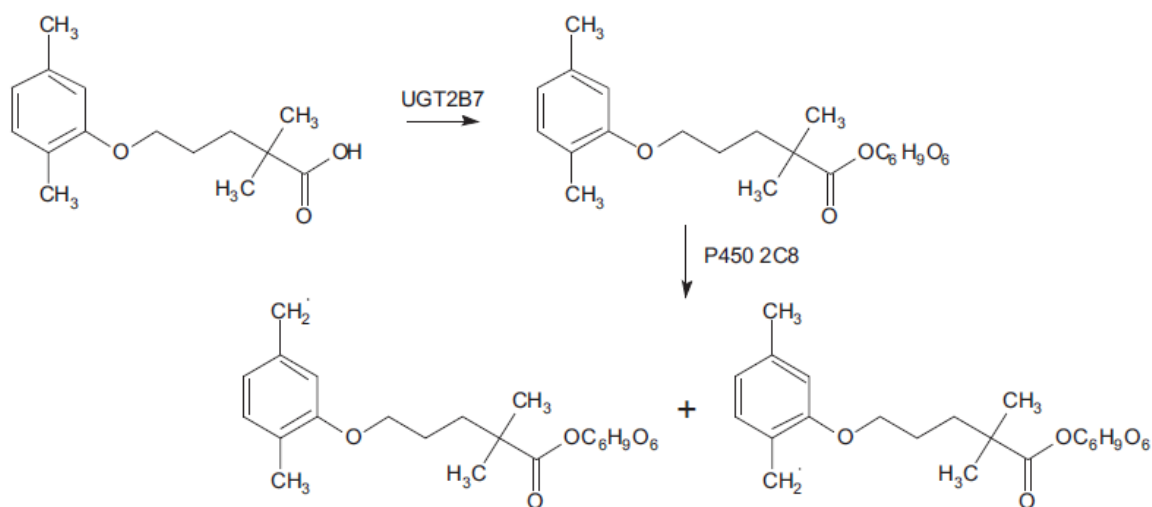
Potporodica 2C intenzivno se proučavala i doživjela je niz revizija, da bi se utvrdilo postojanje 4 enzima u ljudi: 2C8, 2C9, 2C18 i 2C19. P450 2C8 je izoliran iz jetre, ali je prisutan i u bubrezima. Iako se smatra da je smješten na endoplazmatskom retikulumu, značajan dio se nalazi i u mitohondrijima. U ukupnom metabolizmu ne sudjeluje kao P450 2C9 i 2C19, međutim neki od značajnijih supstrata su: paklitaksel (slika 5.), torasemid, amodiakin, cerivastatin, repaglinid, montelukast, troglitazon, pioglitazon, roziglitazon, verapamil, imatinib i retinoična kiselina (Leo i sur., 1998).



Slika 5. Hidroksilacija paklitaksela djelovanjem citokroma P450 2C8.

Neki flavonoidi (naringenin, kaempferol, kvercetin) i α -naftoflavon su pokazali inhibiciju metabolizma paklitaksela. Neki od inhibitora s kliničkom značajnošću su gemfibrozil (ireverzibilna inhibicija alkilacijom hema), montelukast i nilotinib.

Inhibicija gemfibrozilom je zanimljiva jer prethodi reakcija glukuronidacije (obrnuti redoslijed reakcija I. i II. faze, slika 6.), a nastali slobodni radikali se kovalentno vežu na hem (Baer i sur., 2009; Honkalammi i sur., 2012).

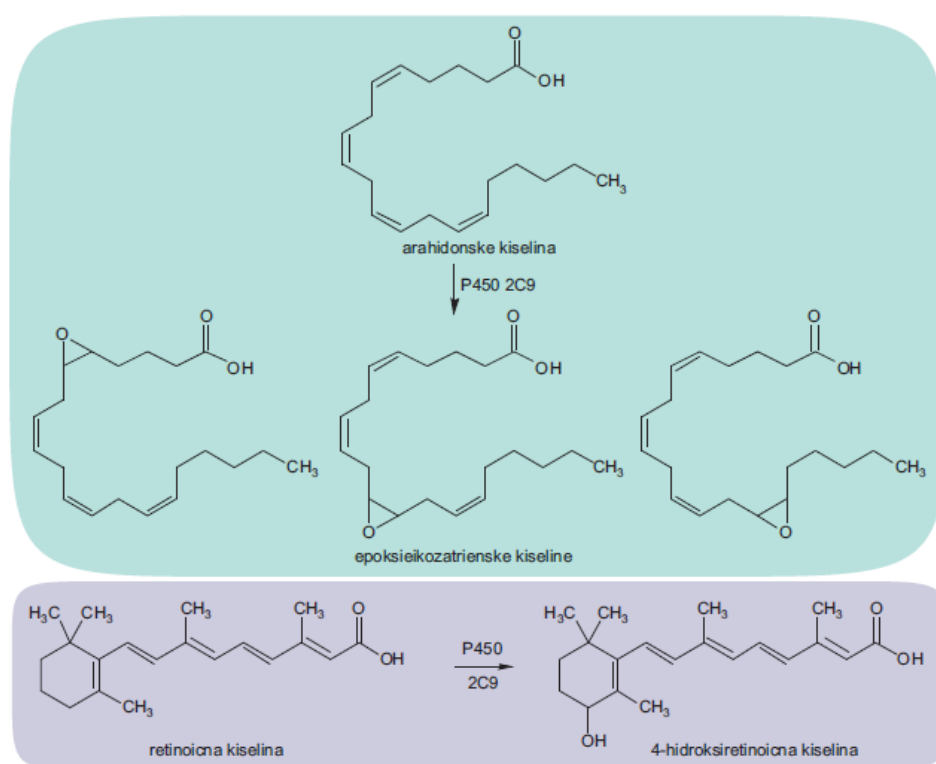


Slika 6. Ireverzibilna inhibicija citokroma P450 2C8 gemfibrozilom.

Cerivastatin je s tržišta povučen zbog pojave rabdmiolize koja se povezala s genetskim varijacijama P450 2C8 i inhibicijom gemfibrozilom (Ishikawa i sur., 2004; Kaspera i sur., 2010).

1.1.5. P450 2C9

Citokrom P450 2C9 značajno sudjeluje u metabolizmu lijekova. Otkriven je kao oksidaza heksobarbitala i tolbutamida, a smješten je u jetri te manjim dijelom u tankom crijevu, aorti i koronarnim arterijama, što upućuje na moguću uključenost u pojavu hipertenzije i drugih kardiovaskularnih bolesti. Supstrati su mu: diklofenak, ibuprofen, piroksikam, tolbutamid, glipizid, losartan, irbesartan, celekoksib, fluvastatin, naproksen, fenitoin, roziglitazon, sulfametoksazol, tamoksifen, tolbutamid, torsemid i varfarin. P450 2C9 je uključen i u epoksidaciju arahidonske i linoleinske kiseline te hidroksilaciju *trans*-retinoične kiseline na položaju 4 (slika 7.).



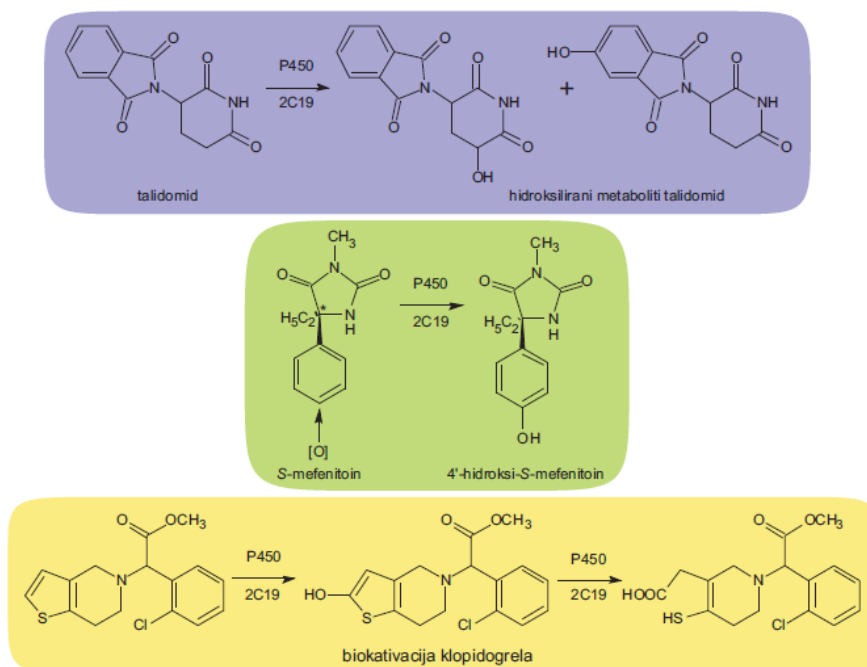
Slika 7. Oksidacije lipofilnih supstancija (arahidonske i retinoične kiseline) djelovanjem P450 2C9.

Najznačajniji marker aktivnosti P450 2C9 je tolbutamin (i *in vivo* i *in vitro*). Ovaj enzim katalizira i hidroksilaciju oralnog kontraceptiva 17 α -etinilestradiola na položaju 2. Lijekovi inhibitori su flukonazol, amiodaron i izonijazid. Sulfafenazol je kompetitivni inhibitor, a tijenilinska kiselina ireverzibilni inaktivator. Smatra se da tijenilinska kiselina S-oksidacijom daje reaktivni intermedijer s P450 2C9 stvarajući neoantigen i uzrokujući produkciju protutijela i posljedično autoimunu reakciju (Beaune i sur., 1987; Dansette i sur., 1992). Genetski

polimorfizam ovog enzima povezuje se s potrebom individualizacije terapije varfarinom (Higashi i sur., 2002). Induktori ovog enzima su rifampin i sekobarbiton.

1.1.6. P450 2C19

Citokrom P450 2C19 eksprimiran je u jetri, s relativno malim udjelom do 5%. Klasičan primjer reakcije katalizirane ovim enzimom je 4'-hidroksilacija *S*-mefenitoina (slika 8.). P450 2C19 metabolizira i inhibitore protonске crpke (izuzetak je esomeprazol); primijećeno je da pacijenti s niskom aktivnošću ovog enzima koji primjenjuju omeprazol pokazuju bolji odgovor na terapiju ulkusa (Chiba i sur., 1993; Karam i sur., 1996). Hidroksilacija *R*-varfarina na položaju 8' značajno pridonosi ukupnom metabolizmu lijeka i razlici u individualnom odgovoru na terapiju (Wienkers i sur., 1996).



Slika 8. Reakcije katalizirane citokromom P450 2C19: hidroksilacija talidomida, hidroksilacija *S*-mefenitoina i oksidacija klopidoigrela.

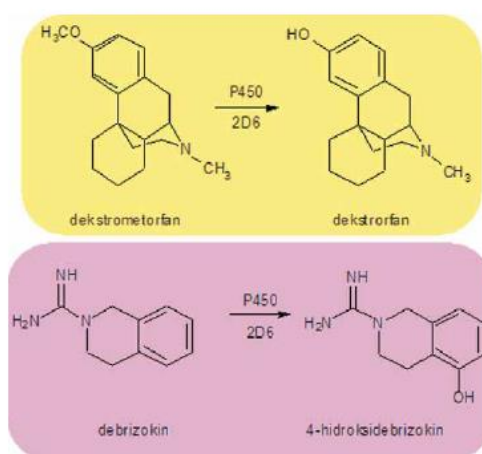
Zloglasni talidomid danas doživljava uskrснуće u istraživanjima antitumorskog potencijala, a P450 2C19 katalizira 5 i 5'-hidroksilaciju talidomida (Ando i sur., 1996). P450 2C19 katalizira oksidaciju steroida progesterona (položaj 21) i testosterona (položaj 17). Jedan od najproučavanijih supstrata je klopidoigrel koji se aktivira djelovanjem P450 2C19 (Kazui i sur., 2010). Iako su rezultati kliničkih ispitivanja oprečni, smatra se da je genotipizacija u slučaju terapije klopidoigrelom opravdana (Sorich i sur., 2013). Ostali značajniji supstrati su lanzoprazol, pantoprazol, rabeprazol, diazepam, fenitoin, fenobarbiton, amitriptilin,

klomipramin, ciklofosamid, vorikonazol i escitalopram. Aktivnost ovog enzima inhibiraju esomeprazol, fluoksetin, fluvoksamin, ketokonazol, lanzoprazol, omeprazol, tiklopidin, kanabinoidi i sok grejpa. Također se smatra da rifampicin može inducirati ekspresiju ovog enzima. Genetske varijacije P450 2C19 su učestale posebice u Azijata pa farmaceutske kompanije izbjegavaju razvoj supstrata ovog enzima.

1.1.7. P450 2D6

Citokrom P450 2D6 je nakon 3A4 jedan od najznačajnijih enzima uključenih u metabolizam lijekova, iako mu je udio oko 5% od ukupno eksprimiranih citokroma P450. Osim u jetri značajna količina se nalazi i u plućima i mozgu. Premda je P450 2D6 izoliran iz mikrosoma (endoplazmatski retikulum), može se nalaziti i na membranama mitohondrija i te koristiti adrenodoksin kao izvor elektrona. Za razliku od ostalih citokroma P450 2D6 nije inducibilan.

Genetski polimorfizam P450 2D6 je primijećen na antihipertenzivu debrizokinu (slika 9.), a ako je ovaj enzim najzaslužniji za metabolizam ksenobiotika, posljedice genetskog polimorfizma mogu biti i smrtne. Na taj je način primijećena kardiotoksičnost tamoksifena kod ultrabrzih metabolizatora (Elkalioubie i sur., 2011), a u 2004. i smrt novorođenčeta zbog intoksikacije majke kodeinom (zbog P450 2D6 katalizirane *O*-demetilacije u morfin) (Gasche i sur., 2004).



Slika 9. Marker reakcije P450 2D6: *O*-demetilacija dekstrometorfana i hidroksilacija debrizokina.

Zanimljivo je da dio populacije nema funkcionalnog P450 2D6 bez značajnijih posljedica što upućuje na nepostojanje fiziološkog supstrata. Lijekovi supstrati P450 2D6 obuhvaćaju *S*-metoprolol, propafenon, timolol, amitriptilin, klomipramin, desipramin,

imipramin, paroksetin, haloperidol, risperidon, tioridazin, aripiprazol, kodein, dekstrometorfan, duloksetin, flekainid, meksiletin, ondansetron, tamoksifen i venlafaksin.

Biljke su glavni izvor morfina, no već dugi niz godina poznato je da i sisavci produciraju opioide u subfarmakološkim koncentracijama. Njihova uloga u organizmu nije razjašnjena, no Kramlinger i sur. su pokazali da i ljudi mogu sintetizirati morfin (Kramlinger i sur., 2015). P450 2D6 katalizira pretvorbu *R*-retikulina u salutaridin, tebaina u oripavin i kodeina u morfin. Marker reakcija P450 2D6 je *O*-demetilacija dekstrometorfana.

Marker inhibitor P450 2D6 je kinidin (zanimljivo je da sam kinidin nije supstrat ovog enzima), a inhibicija je reverzibilna i kompetitivna. Značajniji inhibitori P450 2D6 su bupropion, fluoksetin, paroksetin, kinidin, duloksetin, amiodaron, cimetidin, klorfeniramin, doksepin, haloperidol, metadon, mibefradil i ritonavir.

1.1.8. P450 2E1

P450 2E1 je prvi put opisan kao mikrosomalna oksidaza etanola, iako sa skepsom jer je etanol hidrofilna tvar, a citokromi P450 načelno preferiraju hidrofobne supstrate. Ovaj je enzim eksprimiran u jetri, plućima, jednjaku, tankom crijevu, mozgu, nazalnoj mukozi i gušterači, a zanimljivo je da njegova ekspresija u jetri počinje nekoliko sati nakon rođenja (Vieira i sur., 1996). *In vitro* marker aktivnosti P450 2E1 je 4-nitrofenol koji se prevodi u 4-nitrokatehol, a *in vivo* se primjenjuje klorzoksazon. P450 2E1 primarno katalizira biotransformacije malih molekula kao što su benzen, kloroform, diklormetan, etilen dibromid i vinil-klorid. Manji je broj lijekova kataliziran djelovanjem P450 2E1, a lista supstrata obuhvaća enfluran, halotan, izofluran, metoksifluran, sevofluran, paracetamol, klorzoksazon, etanol, *N,N*-dimetilformamid i teofilin. Etanol i izonijazid su i supstrati i induktori P450 2E1. Otapala koja su supstrati P450 2E1 ujedno su i inhibitori ovog enzima. Značajan broj spojeva sa sumporom u strukturi, koji su izolirani iz povrća kao što su češnjak, luk i biljke iz porodice Brassicaceae, inhibira P450 2E1. Učinak je analogan dietilditiokarbamatu, razgradnom produktu disulfirama (antabus).

1.1.9. P450 3A

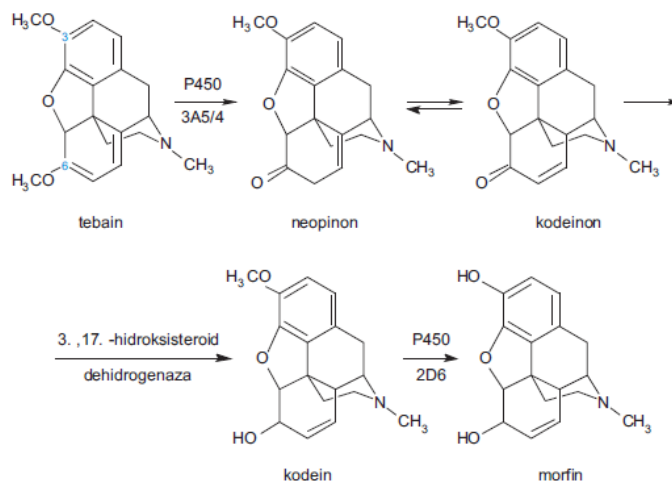
Citokrom P450 3A potporodica katalizira biotransformaciju oko polovice lijekova koji se danas nalaze na tržištu, a najznačajniju ulogu ima enzim P450 3A4. Lista supstrata P450 3A4 je ekstenzivna, a obuhvaća klaritromicin, eritromicin, telitromicin, kinidin, alprazolam, diazepam, midazolam, triazolam, ciklosporin, takrolimus, indinavir, ritonavir, sakvinavir, cisaprid, astemizol, klorfeniramin, amlodipin, diltiazem, felodipin, nifedipin, nisoldipin,

nitrendipin, verapamil, atorvastatin, lovastatin, simvastatin, boceprevir, buspiron, imatinib, haloperidol, metadon, pimozid, kinin, sildenafil, tamoksifen, telaprevir, trazodon i vinkristin. Marker reakcije citokroma P450 3A4 su oksidacija nifedipina, 6 β -hidroksilacija testosterona i 1'-hidroksilacija midazolama, a potonja se može primjenjivati i *in vivo*.

Kao što je i lista supstrata podugačka tako je i lista inhibitora značajna, a obuhvaća indinavir, nelfinavir, ritonavir, klaritromicin, itrakonazol, ketokonazol, nefazodon, eritromicin, verapamil, subokson, diltiazem, cimetidin, amiodaron, fluvoksamin, mibefradil i troleandomicin. Bergamotin i 6',7'-dihidroksibergamotin iz soka grejpa predstavljaju o mehanizmu ovisne inhibitore P450 3A4. U *in vitro* ispitivanjima inhibicija se najčešće postiže dodatkom makrolidnih antibiotika (eritromicin, troleandomicin) ili ketokonazola. Kontraceptivi koji sadrže acetilensku skupinu su ireverzibilni inhibitori citokroma P450 3A4, ali se njihov učinak inhibicije ne smatra značajnim jer se primjenjuju u malim dozama (Balogh i sur., 1998; He i sur., 1998). Ritonavir je jedan od najpotentnijih inhibitora P450 3A4 i primjenjuje se u kombinacijama s drugim inhibitorima proteaze u anti-HIV terapiji s ciljem smanjenja njihove doze, a posljedično i njihovih neželjenih učinaka (Zhou i sur., 2005).

Najznačajniji induktori P450 3A4 su karbamazepin, fenobarbiton, fenitoin, pioglitazon, rifabutin, rifampin, gospina trava i troglitazon. Primjena preparata na bazi gospine trave rezultirala je smanjenom djelotvornošću oralnih kontraceptiva i posljedičnim trudnoćama. Razlog je indukcija pregnanskog X-receptora glukokortikoida hipericinom i hiperforinom što za posljedicu ima pojačanu ekspresiju P450 3A4. Pojačana aktivnost P450 3A4 rezultira brзом eliminacijom 17-etinilestradiola (Henderson i sur., 2002). Iako citokrom P450 3A5 nema toliko značajan udio u metabolizmu lijekova kao P450 3A4, njegov značaj nije ništa manji jer je podložan genetskom polimorfizmu i postoji mogućnost značajnijih kliničkih interakcija, što se povezuje s lapatinibom (Hardy i sur., 2014).

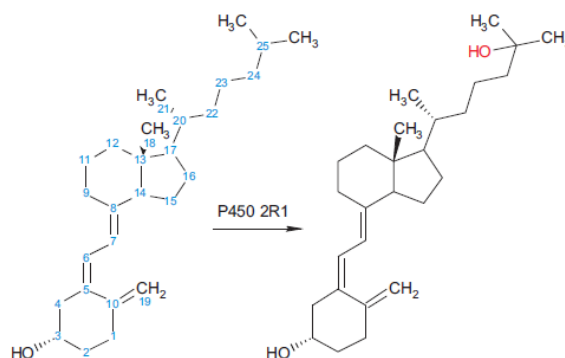
Iako se P450 3A5 i 3A4 preklapaju u pogledu supstrata, s desetak puta većom katalitičkom učinkovitošću 3A4, i tu postoje iznimke. U sklopu istraživanja biosintetskog puta morfina u ljudi pokazano je da P450 3A5 katalizira O⁶-demetilaciju tebaina s 10 puta većom katalitičkom učinkovitošću u odnosu na P450 3A4 (slika 10.). Razlog »čekanja« s opisom biosintetskog puta je nemogućnost izolacije međuprodukta kodeinona i morfinona što je riješeno primjenom morfinon reductaze koja prevodi ove supstrate u stabilni hidrokodon i hidromorfon (Kramlinger i sur., 2015).



Slika 10. Novopotvrđeni koraci u biosintezi morfina u sisavaca.

P450 3A7 se smatra glavnim enzimom odgovornim za metabolizam ksenobiotika u jetri fetusa. P450 3A43 je karakteriziran prije desetak godina, a na primjeru alprazolama je pokazano da ima veći značaj za metabolizam lijeka u mozgu nego P450 3A4 (Guengerich, 2015).

Citokromi P450 su neupitno najvažniji enzimi koji kataliziraju biotransformacije lijekova. Sekvenciranjem ljudskog genoma je otkriveno da u ljudi postoji 57 citokrom P450 enzima. Spoznaje o njihovoj ulozi rastu na dnevnoj bazi pa je nedavno utvrđeno da citokrom P450 2R1 predstavlja glavnu hidroksilazu vitamina D (slika 11.) (Cheng i sur., 2003; Zhu i sur., 2013; Strushkevich i sur., 2008). Područje biokemije i enzimologije citokroma P450 ostaje atraktivno, s mnogim otvorenim pitanjima na koja trebamo odgovoriti.



Slika 11. Hidroksilacija vitamina D₃.

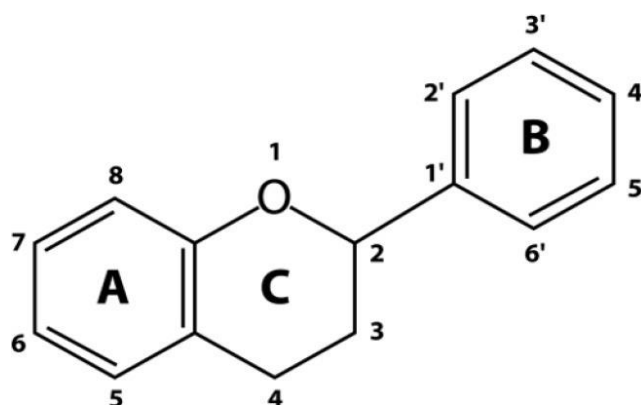
1.2. FLAVONOIDI

Flavonoidi su heterogena porodica polifenolnih spojeva niske molekularne mase koji se sintetiziraju u biljkama kao sekundarni biljni metaboliti. Nemaju ključnu ulogu u razvoju biljke, ali obavljaju važne funkcije kao što su privlačenje insekata, zaštitu biljke od mikroba i reguliraju rast biljnih stanica (Kumar i Pandey, 2013).

Flavonoidi se sintetiziraju iz fenilalanina, nalaze u gotovo u svim dijelovima biljaka, a svakako su najočitiji kao biljni pigmenti cvjetova i plodova. Botaničari koriste flavonoide za taksonomsku klasifikaciju. Flavonoidi reguliraju rast biljke dvojako inhibicijom egzocitaze auksinindolilolictene kiseline i indukcijom ekspresije gena, ali utječu i na druge biološke funkcije. Poznato je njihovo antimikrobno djelovanje tako što inhibiraju ili ubijaju mnoge bakterijske sojeve, inhibiraju važne virusne enzime (reverzna transkriptaza i proteaza), te uništavaju neke patogene protozoe. Ipak, njihova toksičnost na životinjske stanice je niska. Flavonoidi su glavne funkcionalne komponente mnogih biljnih pripravaka koji se primjenjuju od davnih vremena u medicini npr. propolisa i meda (Havsteen, 2002). Pripadaju fitospojevima (kemikalije koje proizvode biljke) te se nalaze u jestivom voću i povrću. Redovitom konzumacijom pojedini flavonoidi pokazuju potencijal modulacije ljudskog zdravlja tako da pomažu u prevenciji kroničnih i degenerativnih bolesti (Tripoli i sur., 2006). Velika konzumacija prehrambenih flavonoida općenito se smatra sigurnom, posebice zbog njihove niske bioraspoloživosti. Međutim, ukoliko se uzimaju istodobno s lijekovima mogu povećati toksičnost i to širokog raspona lijekova.

Flavonoidi se u ljudskom organizmu kao ksenobiotici podvrgavaju opsežnim biotransformacijama prvo u crijevnoj sluznici, a zatim u jetri. Tijekom i nakon intestinalne apsorpcije, flavonoidi se brzo i opsežno metaboliziraju u crijevnim i jetrenim stanicama tako da se vjerojatno pojavljuju kao metaboliti u krvotoku i urinu (Rothwell i sur., 2016). Biološke aktivnosti flavonoidnih metabolita vjerojatno će biti različite od onih njihovih roditeljskih spojeva (Lotito i sur., 2011).

Opću strukturu flavonoida karakterizira benzo- γ -piranska struktura (Medić-Šarić i sur., 2004). Sastoji se od tri prstena od kojih A i C pripadaju benzo- γ -piranu na kojem se većinom na položaju 2 nalazi fenil tj. prsten B (slika 12).



Slika 12. Opća struktura flavonoida.

Skupine flavonoida se razlikuju po položaju prstena B te supstituentima na prstenu C i njegovome stupnju oksidacije. Razlike među flavonoidima proizlaze iz različitih supstituenata na prstenu A i B. Prema molekularnoj strukturi, dijele se na 6 porodica: flavone, flavanone, flavonole, izoflavone, antocijanidine i flavan-3-ole ili katehine (Peterson i sur., 1998). Flavonoidi mogu postojati kao aglikoni, glikozidi ili metilirani derivati. Šećeri koji se nalaze u glikozidima mogu biti glukoza, ramnoza, glukoramnoza, galaktoza i arabinoza (Kumar i Pandey, 2013; Havsteen, 2002).

Tablica 1: Molekularne strukture 6 porodica flavonoida.

PORODICA	SKELET	PORODICA	SKELET
Antocijanidini		Flavanoni	
Katehini		Flavonoli	
Flavoni		Izoflavoni	

Nakon što se prehrambeni flavonoidi oslobode iz hrane žvakanjem njihova apsorpcija u tankom crijevu ovisit će o njihovim fizikalno-kemijskim svojstvima kao što su veličina molekule, konfiguracija, lipofilnost, topivost i pKa. Većina flavonoida, osim podklase katehina, prisutna je u biljkama vezana za šećere kao β -glikozidi. Poznato je da se aglikoni lako apsorbiraju u tankom crijevu, dok se flavonoidni glikozidi moraju prevesti u oblik aglikona (Hollman i sur., 1999).

1.2.1. Farmakološki učinci flavonoida

Flavonoidi su zanimljivi u istraživanjima u području farmacije zbog svojih farmakoloških učinaka. Povoljni farmakološki učinci flavonoida su antitrombotični, hipolipemični, antihipertenzivni, antimikrobni, antivirusni, antialergijski, antiulkusni, protuupalni, hepatoprotektivni, antiaterogeni, antineoplastični, učinci na antioksidacijski kapacitet i kapilarnu propusnost.

Flavonoidi su jaki antioksidansi slobodnih radikala zahvaljujući njihovoj hidrogen-donirajućoj sposobnosti, a fenolne grupe im služe kao izvor lako dostupnih vodikovih atoma (Burda i Oleszek, 2001; Di Majo i sur., 2005). Snaga učinka ovisi o strukturnoj vrsti flavonoida, stupnju hidroksilacije, drugim supstitucijama i konjugacijama i stupnju polimerizacije. Prema farmakokinetičkim studijama formacije aroksil radikala, kombinacija tri kemijska i strukturalna elementa su bitna za antioksidacijski kapacitet flavonoida: orto-dihidroksi struktura B prstena koja daje veliku stabilnost aroksil radikalima zbog vodikovih veza, 2,3-dvostruka veza odgovorna za delokalizaciju elektrona B prstena i prisutnost 3-(a) i 5-(b)-hidroksilnih struktura. Imaju antioksidativni učinak u hidrofilnom okruženju, dok u lipofilnom neki imaju smanjen kapacitet, a drugi obrnuto ponašanje i postaju prooksidansi.

Flavonoidi mogu inhibirati kinaze i fosfodiesteraze esencijalne za staničnu signalizaciju u upalnim procesima. Također utječu na aktivaciju brojnih stanica uključenih u imunski odgovor, uključujući T i B limfocite (Mantley i sur., 2001). Kombinacijom ovih dvaju svojstava ispoljavaju protuupalni učinak.

Flavonoidi pokazuju antiaterogenu aktivnost inhibirajući nastanak tromba u mnogim fazama njegove patogeneze. Djeluju hipolipemično samo u slučaju visoke koncentracije lipida. Istraživanje u Japanu pokazalo je recipročni odnos između unosa flavonoida i ukupne plazmatske koncentracije kolesterola (Choi i sur., 1991). Metoksilirani flavonoidi pokazuju veću antiagregacijsku aktivnost od hidroksiliranih spojeva, a aktivnost im je usporediva onom acetilsalicilne kiseline (Robbins, 1976).

Prehrambeni flavonoidi se smatraju kemopreventivnim ili antitumorskim agensima (Elangovan i sur., 1994; Hirano i sur., 1994; Kandaswami i sur., 1991). Epidemiološke studije upućuju na to da je dijeta bogata flavonima povezana sa smanjenim rizikom od određenih vrsta raka, osobito raka dojke, probavnog trakta, kože, prostate i određenih zloćudnih bolesti krvotvornog sustava (Shukla i Gupta, 2010). Antitumorski učinci mogu biti izraženi putem selektivne citotoksičnosti, antiproliferativnih učinaka i apoptoze. Flavonoidi mogu biti potencijalno uključeni u karcinogenezu putem indukcije oštećenja DNA, promocije razvoja tumora i proliferacije. Imaju sposobnost apsorpcije ultraljubičastog zračenja i na taj način štite DNA od oštećenja (Stepleton i Walbot, 1994). Isto tako dokazano je da imaju sposobnost neutralizacije slobodnih radikala kad se generiraju blizu DNA pa utječu na promociju mutacija (Shimoi i sur., 1994) ili reagiraju i direktno s karcinogenim agensom (Heo i sur., 1994).

Postoji važan odnos između strukture flavonoida i njihove aktivnosti. Istraživanja su pokazala da je preduvjet za antivirusnu aktivnost flavonoida povezan s neglikozidnim spojevima i hidrosilacija na položaju 3 (Middleton i sur., 2000).

Biološke aktivnosti flavonoida, uz njihove temeljne mehanizme djelovanja, oslanjaju se na aktivnost svojih metabolita zbog brze i opsežne biotransformacije. Informacije o tome koji se metaboliti pojavljuju u plazmi su ključne za pravilnu procjenu njihove biološke aktivnosti.

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Flavonoidi su heterogena porodica polifenolnih spojeva niske molekulske mase koji se sintetiziraju u biljkama kao sekundarni biljni metaboliti. Pripadaju fitospojevima te se nalaze u jestivom voću i povrću. Redovitom konzumacijom pojedini flavonoidi pokazuju potencijal modulacije ljudskog zdravlja tako da pomažu u prevenciji kroničnih i degenerativnih bolesti. Njihovi brojni farmakološki učinci čine ih zanimljivim za istraživanje u području farmacije.

Stanični mehanizmi njihovih brojnih bioloških učinaka i dalje su uvelike nepoznati. Biološke aktivnosti flavonoida, uz njihove temeljne mehanizme djelovanja, oslanjaju se na aktivnost svojih metabolita zbog brze i opsežne biotransformacije. Biološke aktivnosti flavonoidnih metabolita mogu biti različite od onih njihovih roditeljskih spojeva (Lotito i sur., 2011). Informacije o tome koji se metaboliti pojavljuju u plazmi su ključne za pravilnu procjenu njihove biološke aktivnosti.

Evolucijski se razvio čitav niz enzimskih sustava kojima je cilj ksenobiotike tj. strane tvari prevesti (metabolizirati) u vodotopljiv oblik pogodan za izlučivanje. Dominantni enzimi u metabolizmu ksenobiotika, a time i flavonoida, su citokromi P450.

Cilj ovog rada je *in vitro* postupcima utvrditi humane jetrene citokrome P450 odgovorne za biotransformaciju 30 odabranih flavonoida primjenom humanih jetrenih mikrosoma. Metoda kojom će se uzorci analizirati je obrnuto-fazna kromatografija visoke razlučivosti spregnuta s masenim spektrometrom kao detektorom. Područje biokemije i enzimologije citokroma P450 ostaje atraktivno, s mnogim otvorenim pitanjima na koja trebamo odgovoriti, uključujući metabolizam flavonoida koji je ispitan na relativno malom broju flavonoida. Ako bi se opisao metabolizam i utvrdili metaboliti odgovorni za brojne farmakološke učinke, to bi možda dovelo do razvoja novih i boljih lijekova od već postojećih na tržištu.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Reagensi

- 8,6 μM Humani jetreni enzimi komercijalno dostupni kao humani jetreni mikrosomi (HLM) 100 pmol
- 1 M kalijev fosfat pH 7,4
- Glukoza-6-fosfat
- NADP+
- 10^3 IU ml^{-1} Glukoza-6-fosfat dehidrogenaza
- Metanol
- Metilen klorid
- Acetonitril
- Destilirana voda
- Flavonoidi :
 - 3,6–dihidroksiflavon
 - 3,7–dihidroksiflavon
 - 6–hidroksiflavon
 - 7–hidroksiflavon
 - akacetin
 - apigenin
 - diosmetin
 - flavanon
 - flavon
 - galangin
 - genistein
 - hesperetin
 - izoramnetin
 - kaempferol
 - katehin
 - krizin
 - krizin-dimetileter
 - kvercetin
 - luteolin
 - miricetin

- morin
- naringenin
- pinocembrin
- pinocembrin-7-metileter
- prunetin
- ramnetin
- sakuranetin
- tamariksetin
- tangeretin
- tektokrizin

3.1.2. Pribor

- Staklene epruvete
- HPLC/MS sustav
- Vodena kupelj s mućkanjem na 37 °C
- Staklene viale
- Centrifuga



Slika 13. HPLC/MS sustav

3.2. METODE

Humani jetreni mikrosomi korišteni su kao izvor citokroma P450 za istraživanje metabolizma 30 odabranih flavonoida. Korišteni su komercijalno dostupni HLM dobiveni iz različitih uzoraka jetre kako bi se smanjio učinak biološke varijabilnosti. Kako bi se utvrdilo metaboliziraju li HLM neki od odabranih flavonoida, supstrat i produkti nastali metabolizmom nakon inkubacije praćeni su pomoću HPLC-UV-Vis-MS tehnike. Preliminarnim istraživanjem koje je provedeno ovom metodologijom potvrđeni su literaturni podaci primjerice za hidrosilaciju apigenina (Breinholt i sur. 2002), što ukazuje na prikladnost odabrane metodologije. Kao metabolit je pronađen luteolin koji je dokazan spektrometrijom masa. Q-TOF MS sustav korišten je za točno određivanje mase.

HPLC (engl. *High performance liquid chromatography* - HPLC) – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti je oblik kromatografije i jedan je od najmoćnijih alata u analitici. Ima sposobnost razdvajanja, identifikacije i kvantifikacije spojeva koji su prisutni u bilo kojem uzorku koji se može otopiti u tekućini. Danas se lako mogu identificirati spojevi u koncentracijama u tragovima kao što su dijelovi po trilijunu (ppt). HPLC se može primijeniti na bilo koji uzorak, poput lijekova, hrane, nutraceutika, kozmetike, ekoloških matrica, forenzičkih uzoraka i industrijskih kemikalija (www.waters.com). Princip rada je forsiranje prolaska analita ili smjese kroz kolonu pumpanjem tekuće mobilne faze pod visokim tlakom kroz kolonu. Mali volumen uzorka se unosi u tok mobilne faze i na temelju specifičnih kemijskih i fizikalnih interakcija, dolazi do različitog zadržavanja komponenata smjese. Vrijeme potrebno za potpuno eluiranje analita ovisi o njegovoj prirodi, stacionarnoj fazi i sastavu mobilne faze. Vrijeme u kojem se tvar eluira naziva se retencijsko vrijeme i karakteristično je za određenu tvar. Moguće je koristiti izokratno eluiranje gdje se ne mijenja sastav mobilne faze tijekom analize ili gradijentno eluiranje, što podrazumijeva promjenu sastava mobilne faze tijekom eluiranja. Kod obrnuto-fazne kromatografije koristi se nepolarna stacionarna faza i polarna mobilna faza. Retencijsko vrijeme je dulje što je tvar manje polarna. Dodatkom polarnih otapala u mobilnu fazu raste retencijsko vrijeme, a smanjuje se dodatkom nepolarnih otapala. Funkcionira na principu hidrofobnih interakcija, koje su rezultat odbijajućih sila između polarnog otapala, relativno nepolarne tvari koja se analizira i nepolarne stacionarne faze. Na brzinu eluiranja utječe pH, zbog mogućnosti promjene polarosti tvari. Detektor ima važnu ulogu detekcije komponenti koje izlaze iz kolone nakon eluiranja. Detektor generira električni signal koji je razmjernan intenzitetu neke osobine mobilne faze ili tvari koja se eluira (Settle, 1997). U ovom istraživanju korišten je UV-Vis kao detektor. Kromatogram je prikaz

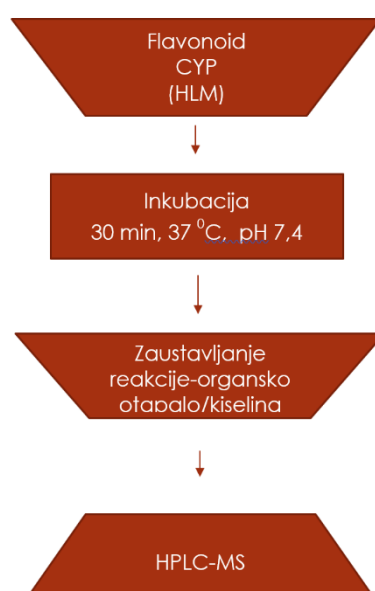
odvajanja koja se kemijski dogodila u HPLC sustavu. Serija vrhova ili peakova koja se dižu iz osnovne crte nacrtana je na vremenskoj osi. Svaki vrh predstavlja odgovor detektora za drugi spoj.

Masena spektrometrija (MS) je osjetljiva tehnika koja se koristi za detekciju, identifikaciju i kvantitativno određivanje molekula na osnovi njihovog omjera mase i naboja (m/z). MS je postao dragocjen u širokom rasponu polja i aplikacija zbog primjene za vrlo točno određivanje relativnih atomskih i relativnih molekularnih masa, elementarnoga sastava i bruto-formule kemijskih spojeva, izotopnoga sastava i strukture njihovih molekula, tragova primjesa, za ispitivanje ionskih i radikalskih reakcija u plinovitoj fazi, prijelaznoga stanja, fenomena ionizacije i dr. Svi maseni spektrometri imaju izvor iona, analizator mase i detektor iona. Priroda ovih komponenata varira ovisno o svrsi masenog spektrometra, vrsti potrebnih podataka i fizičkim svojstvima uzorka. Uzorci se pune u maseni spektrometar u tekućem, plinovitom ili sušenom obliku i zatim se ioniziraju izvorima iona (npr. APCI, DART, ESI) Ionski izvor stvara ione svojstvene ispitivanom uzorku i u električnom ih polju ubrzava, dok analizator (najčešće magnetsko polje) savija putanje različitih iona i tako ih razdvaja ovisno o omjeru njihove mase i naboja (m/z). Uobičajeni analizatori uključuju vrijeme leta (engl. *time of flight* - *TOF*), orbitrapove, kvadropole i ionske zamke, a svaka vrsta ima specifične karakteristike. Korišteni analizator tijekom istraživanja je hibridni Q-TOF (engl. *quadrupole-time of flight* - *Q-TOF*). Analizatori se mogu koristiti za odjeljivanje svih analita u uzorku za globalnu analizu ili se mogu koristiti kao filteri kako bi se izdvojili samo određeni ioni prema detektoru. U detektoru se razdvojeni ioni skupljaju i karakteriziraju. Mijenjanjem jakosti magnetskog polja mogu se redom registrirati ioni različitih masa, čime nastaje maseni spektar karakterističan za određeni kemijski spoj (www.thermofisher.com).

Za analizu složenih smjesa maseni se spektrometar izravno povezuje s plinskim ili tekućinskim kromatografom, u kojem se sastojci smjese, prije analize, prvo razdvajaju. HPLC/MS postaje nezamjenjiv alat u brojim poljima istraživanja. Pruža rješenja visoke pouzdanosti, produktivnosti i osjetljivosti, koja su tražena u područjima farmaceutske, prehrambene i kemijske industrije i analize okoliša.

3.3. POSTUPAK

U svaku epruvetu se stavlja destilirana voda, 1 M kalijev fosfat, HLM i odgovarajući uzorak flavonoida. Svaki uzorak flavonoida se stavlja u 3 epruvete. U jednu od tih epruveta, nakon preinkubacije, se dodaje destilirana voda, a u druge dvije NADPH generirajući sustav (GS). NADPH generirajući sustav se radi kombinirajući glukozu-6-fosfat, NADP⁺ i glukozu-6-fosfat dehidrogenazu u omjerima 100:50:2 i služi za započinjanje reakcije. Ukupni volumen u svakoj epruveti je 100 µL. Preinkubacija se odvija u kontroliranim uvjetima; kadici u vodenoj kupelji na 37°C pri pH 7,4 i traje 5 min. Zatim se dodaje destilirana voda ili GS i inkubira u istoj vodenoj kupelji 30 min. Nakon toga se mora zaustaviti reakcija dodatkom acetonitrila. Slijedi centrifugiranje 10 min na 3000 rpm da bi se odvojile faze. Nastali donji hidrofobni sloj se prebaci staklenom trbušastom pipetom u staklenu vialicu. Takav uzorak je spreman za HPLC/MS analizu. Temperatura kolone HPLC-a na kojoj se odvija analiza je 40 °C s protokom mobilne faze od 0,4 ml/min. Koristi se gradijentno eluiranje, što podrazumijeva promjenu sastava mobilne faze u toku eluiranja kombiniranjem dviju mobilnih faza. Mobilna faza A se napravi miješanjem vode, metanola i mravlje kiseline u omjeru 93:5:2, a mobilna faza B miješanjem istih supstanca u drugom omjeru, 3:95:2. Korištena je kolona Poroshell 120 EC-C18, dimenzija 100x3,0 mm, 2,7 µm. UV detektor HPLC-a mjeri pri valnoj duljini od 350 nm. Bitni uvjeti MS-QTOF (*Quadrupole time-of-flight mass spectrometer*) su ion pozitivni mod i ESI pozitivni mod.



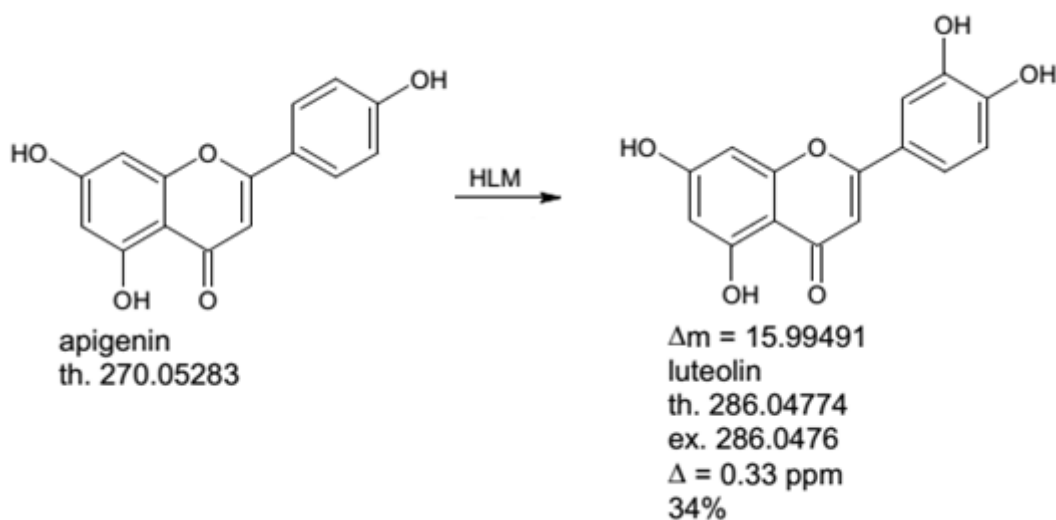
Slika 14. Shema metodologije analize uzoraka flavonoida.

4. REZULTATI

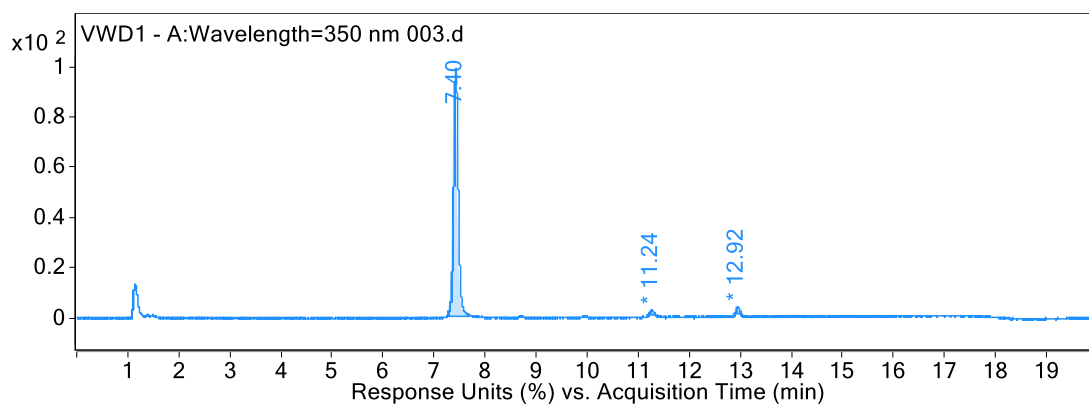
Istraživanje je pokazalo mnogo rezultata koji se dalje iznose. Slijede odabrani flavonoidi koji su dali bitnije rezultate. Ostali nisu ispitivani dalje od prvog kruga zbog nedostatka metabolita ili premalih koncentracija metabolita.

4.1. APIGENIN

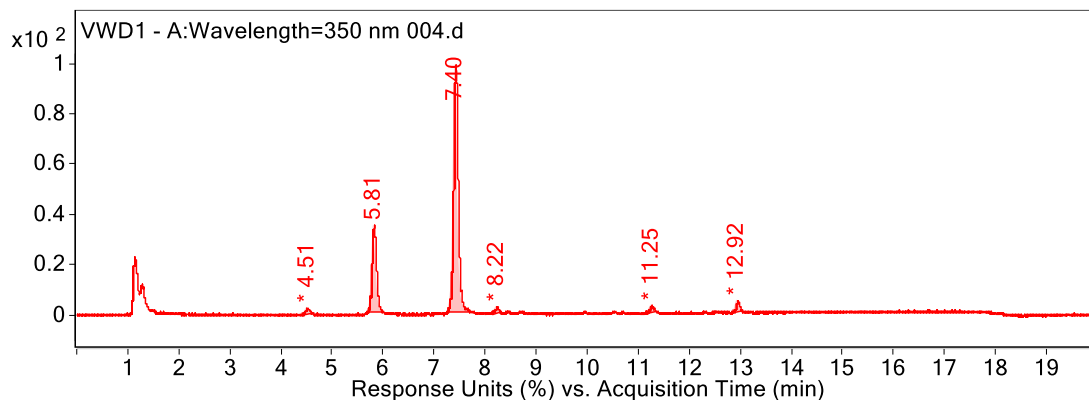
Apigenin se hidroksilira na 3' položaju B prstena i daje luteolin. Reakcijom nastaje 34% supstrata u odnosu na apigenin.



Slika 15. Metabolizam apigenina posredovan humanim jetrenim mikrosomima



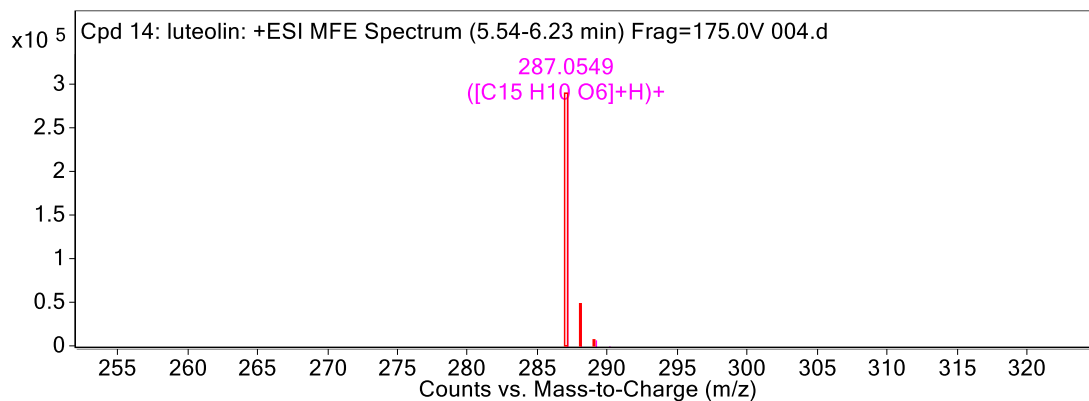
Slika 16. UV kromatogram inkubacijske smjese za apigenin bez dodanog generirajućeg sustava.



Slika 17. UV kromatogram inkubacijske smjese za apigenin s dodanim generirajućim sustavom.

Tablica 2. Informacije o pronađenom metabolitu

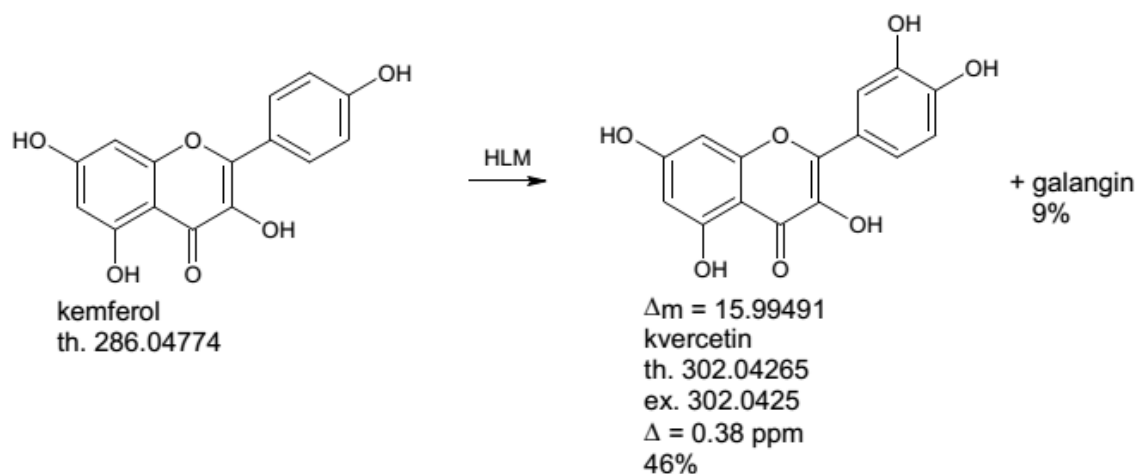
Oznaka spoja	Ime	m/z	RT	Masa
Cpd 14: luteolin	luteolin	287,0549	5,81	286,0476



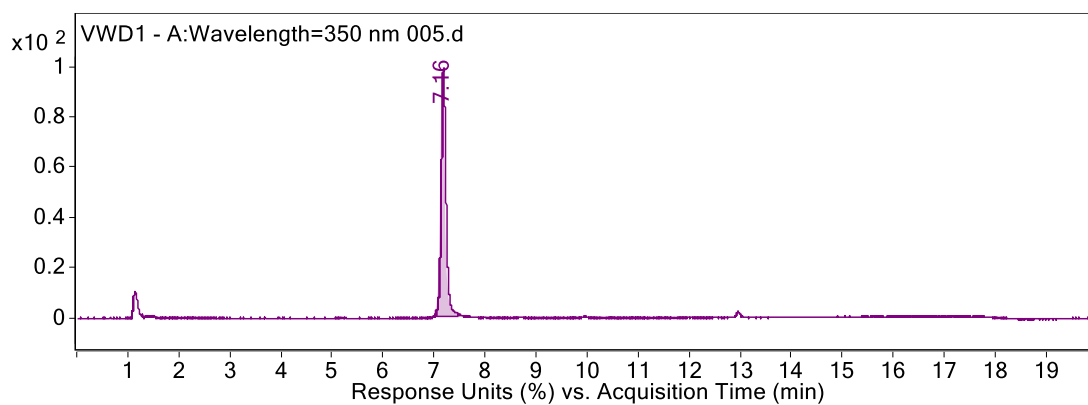
Slika 18. Spektar izdvojenog iona luteolina ($m/z = 287,055$) inkubacijske smjese za apigenin s dodanim generirajućim sustavom.

4.2. KEMFEROL

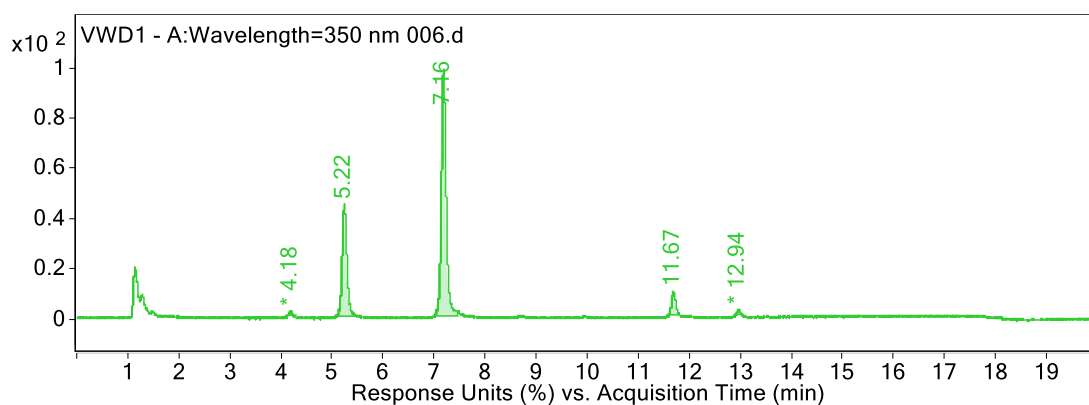
Kod kemferola su detektirana 2 metabolita, kvercetin i galangin, od kojih kvercetin ima znatno više, čak 46%.



Slika 19. Metabolizam kemferola posredovan humanim jetrenim mikrosomima



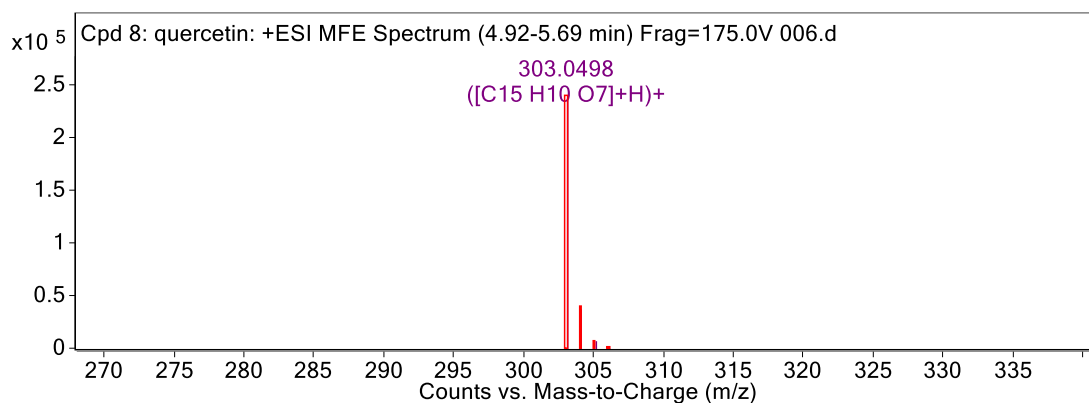
Slika 20. UV kromatogram inkubacijske smjese za kemferol bez dodanog generirajućeg sustava.



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

Tablica 3. Informacije o pronađenom metabolitu

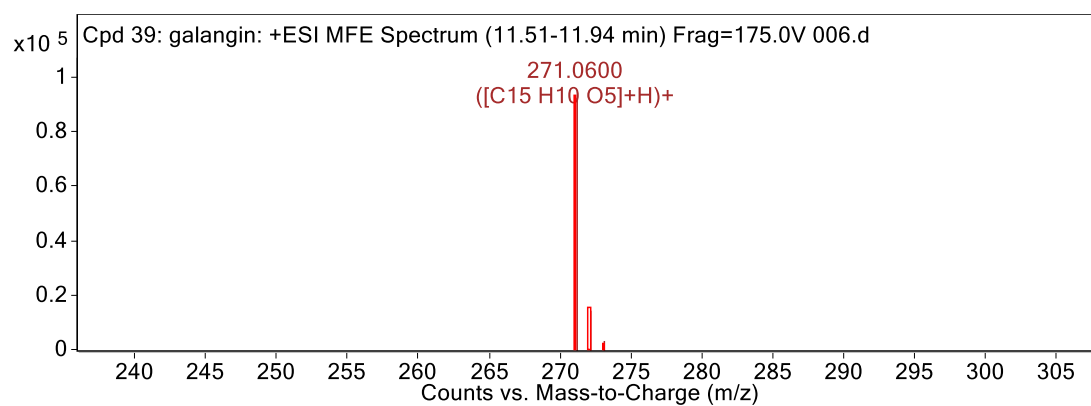
Oznaka spoja	Ime	m/z	RT	Masa
Cpd 8: kvercetin	kvercetin	303,0498	5,22	302,0425



Slika 22. Spektar izdvojenog iona kvercetina ($m/z = 303,0498$) inkubacijske smjese za kemferol s dodanim generirajućim sustavom.

Tablica 4. Informacije o pronađenom metabolitu

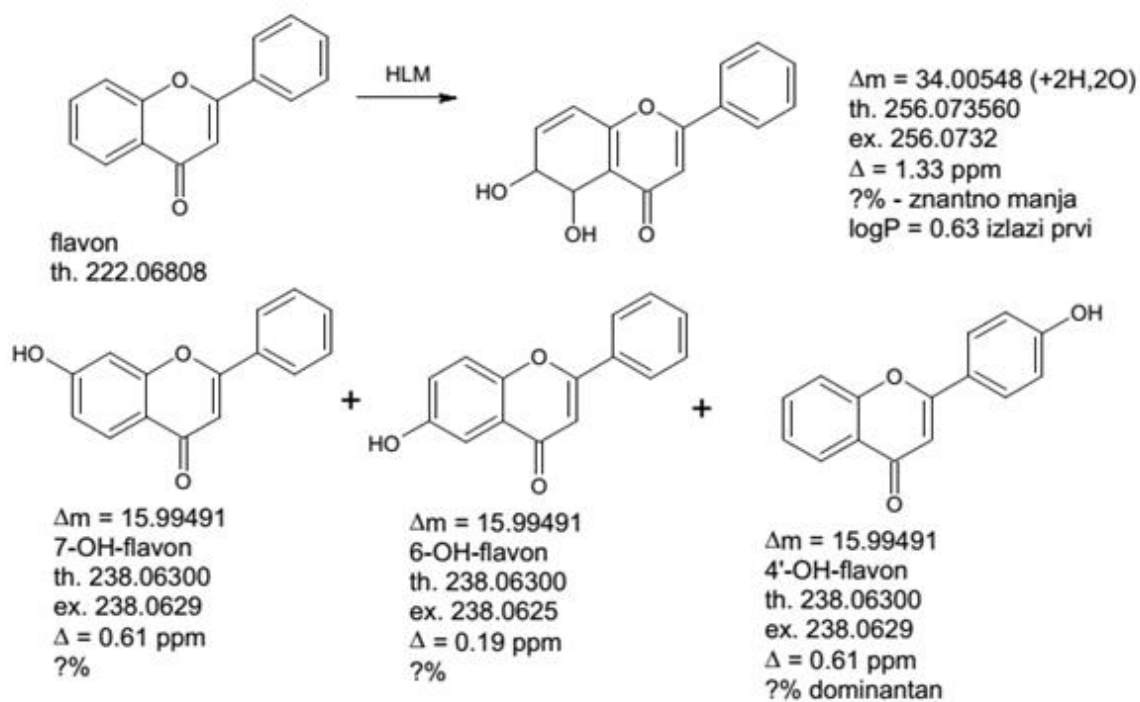
Oznaka spoja	Ime	m/z	RT	Masa
Cpd 39: galangin	galangin	271,06	11,66	270,0527



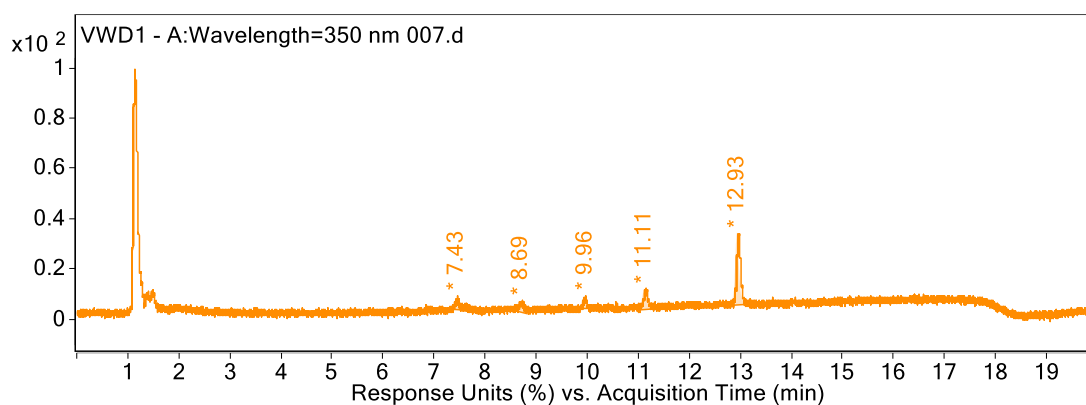
Slika 23. Spektar izdvojenog iona galangina ($m/z = 271,0600$) inkubacijske smjese za kemferol s dodanim generirajućim sustavom.

4.3. FLAVON

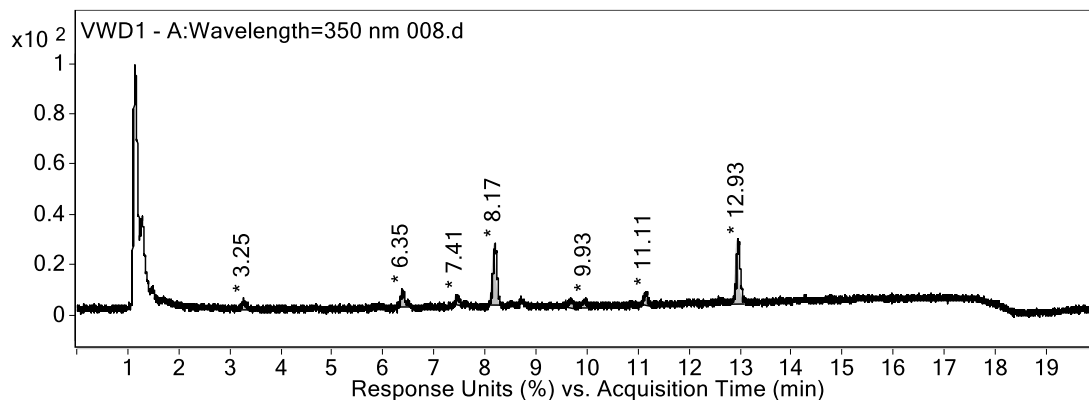
Flavonu su detektirana 4 minorna metabolita, svi jedva vidljivi na UV-Vis detektoru. Zadnje navedeni bi bio dominantan 4' hidroksilirani metabolit. Ostali su: dvostruko hidroksilirani metabolit na položajima 5 i 6 A prstena, metabolit hidroksilirani na 7 C atomu i zadnji na 6 C atomu.



Slika 24. Metabolizam flavona posredovan humanim jetrenim mikrosomima



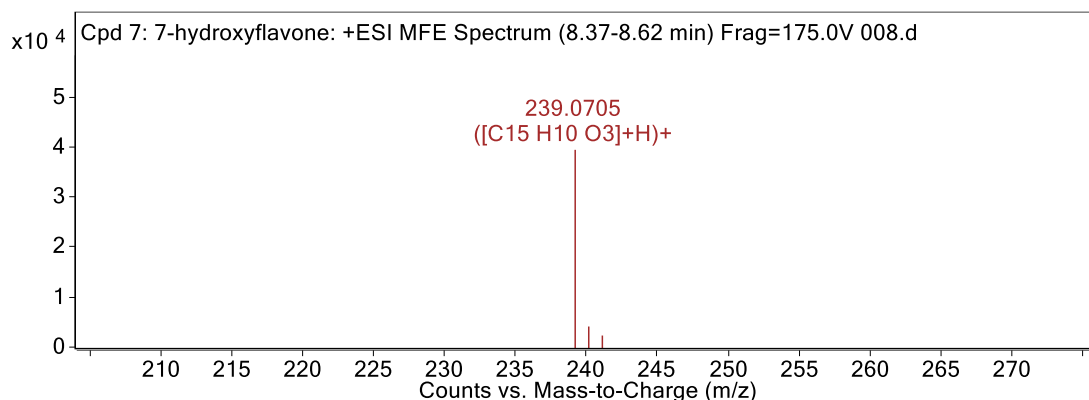
Slika 25. UV kromatogram inkubacijske smjese za flavon bez dodanog generirajućeg sustava.



Slika 26. UV kromatogram inkubacijske smjese za flavon s dodanim generirajućim sustavom.

Tablica 5. Informacije o pronađenom metabolitu

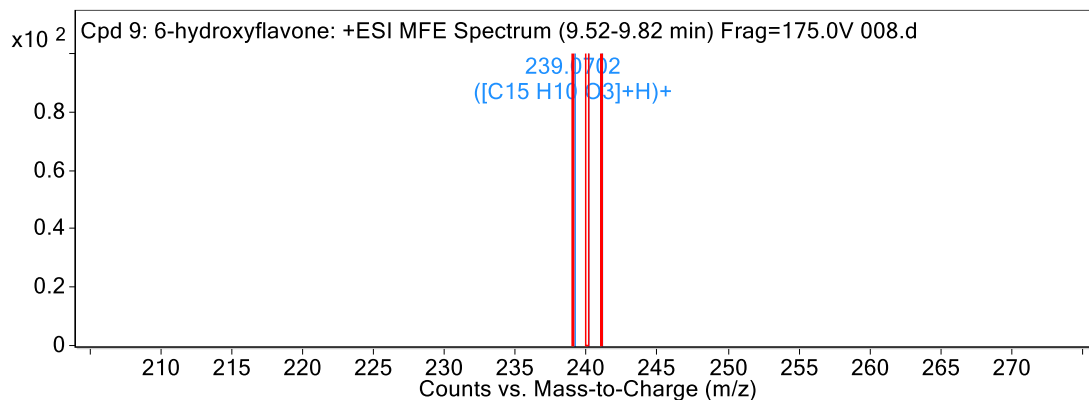
Oznaka spoja	Ime	<i>m/z</i>	RT	Masa
Cpd 7: 7-hydroxyflavone	7-hidroksiflavon	239,0705	8,47	238,0629



Slika 27. Spektar izdvojenog iona 7-hidroksiflavona ($m/z = 239.0705$) inkubacijske smjese za flavon s dodanim generirajućim sustavom.

Tablica 6. Informacije o pronađenom metabolitu

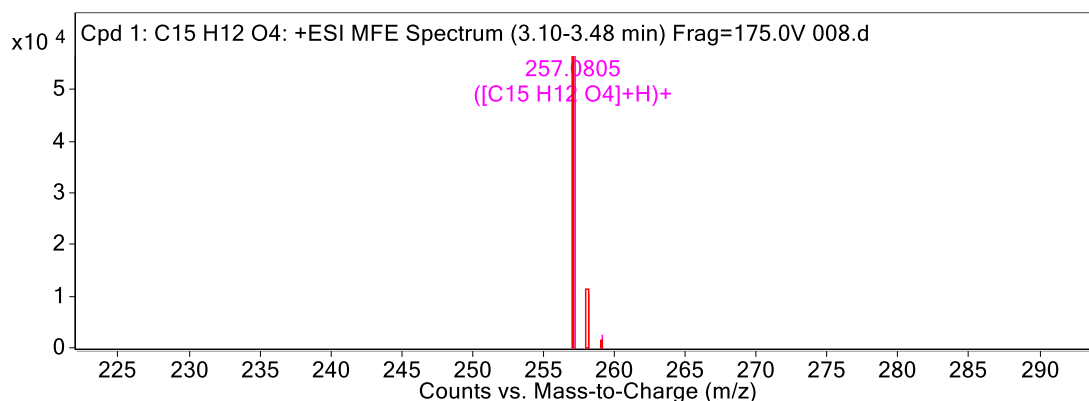
Oznaka spoja	Ime	<i>m/z</i>	RT	Masa
Cpd 9: 6-hydroxyflavone	6-hidroksiflavon	239,0702	9,65	238,0625



Slika 28. Spektar izdvojenog iona 6-hidroksiflavona ($m/z = 239.0702$) inkubacijske smjese za flavon s dodanim generirajućim sustavom.

Tablica 7. Informacije o pronađenom metabolitu

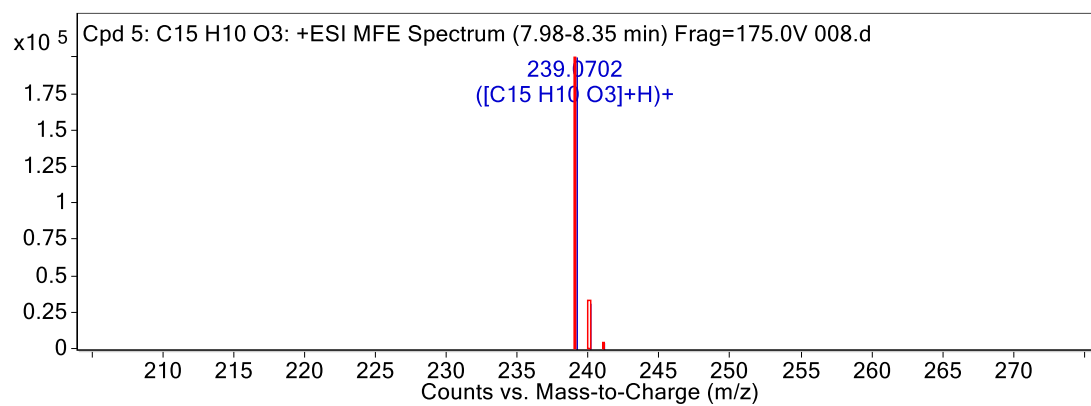
Oznaka spoja	m/z	RT	Masa
Cpd 1: C15 H12 O4	257,0805	3,25	256,0732



Slika 29. Spektar izdvojenog iona nepoznatog flavonoida ($m/z = 257,0805$) inkubacijske smjese za flavon s dodanim generirajućim sustavom.

Tablica 8. Informacije o pronađenom metabolitu

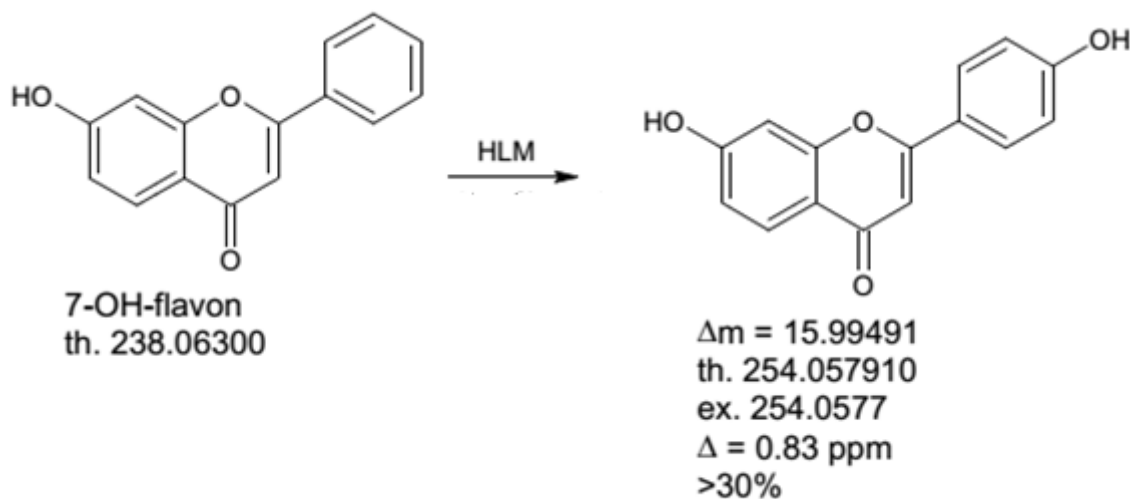
Oznaka spoja	Ime	m/z	RT	Masa
Cpd 5: C15 H10 O3	4'-hidroksiflavon	239,0702	8,16	238,0629



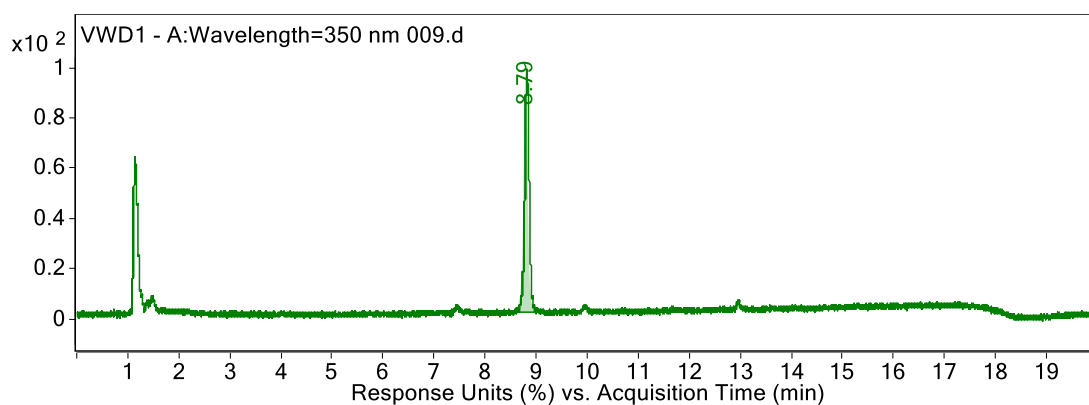
Slika 30. Spektar izdvojenog iona 4'-hidroksiflavona ($m/z = 239.0702$) inkubacijske smjese za flavon s dodanim generirajućim sustavom.

4.4. 7-HIDROKSIFLAVON

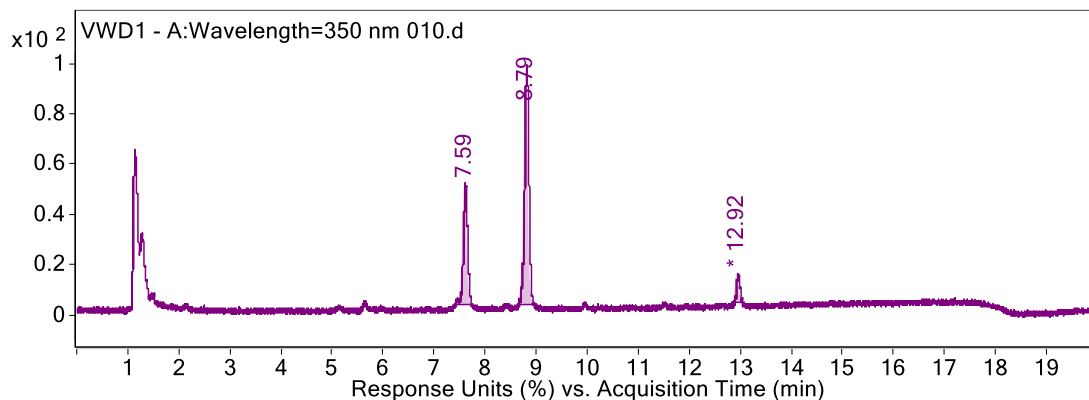
Kod 7-hidroksiflavona vjerojatno nastaje 4' hidroksilirani metabolit, sigurno ne nastaje krizin (5 hidroksilirani spoj), a ni 3,7 i 3,6 hidroksilirani spojevi. Količina metabolita je znatna (>30%).



Slika 31. Metabolizam 7-hidroksiflavona posredovan humanim jetrenim mikrosomima



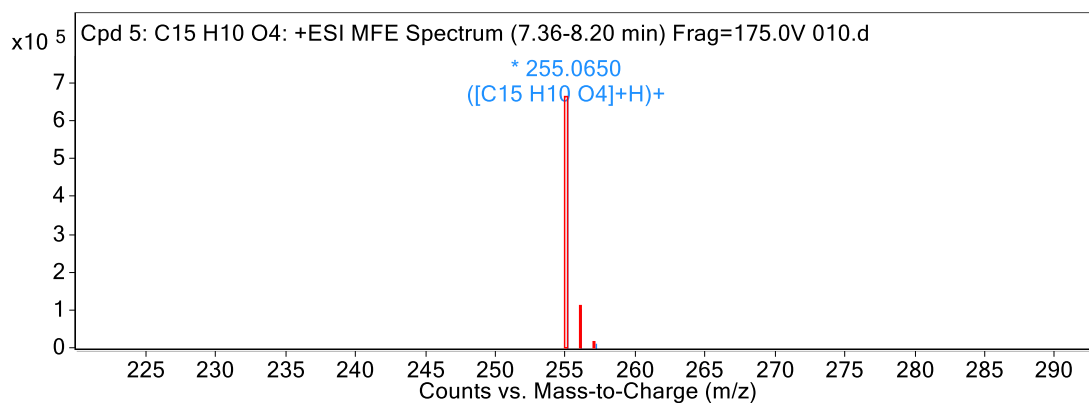
Slika 32. UV kromatogram inkubacijske smjese za 7-hidroksiflavon bez dodanog generirajućeg sustava.



Slika 33. UV kromatogram inkubacijske smjese za 7-hidroksiflavon s dodanim generirajućim sustavom.

Tablica 9. Informacije o pronađenom metabolitu

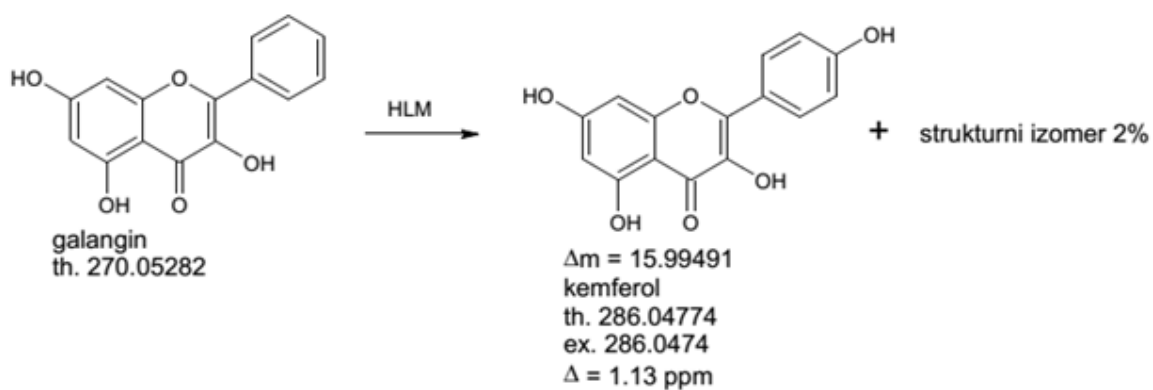
Oznaka spoja	m/z	RT	Masa
Cpd 5: C ₁₅ H ₁₀ O ₄	255,065	7,59	254,0577



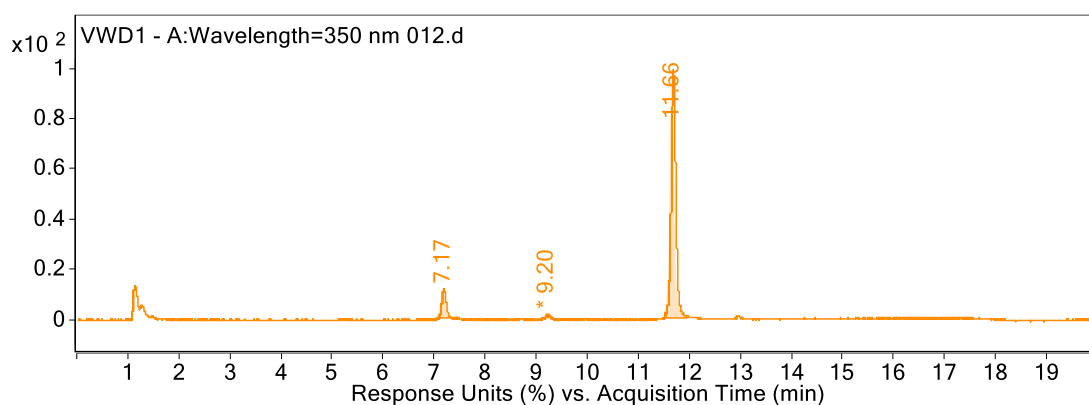
Slika 34. Spektar izdvojenog iona nepoznatog flavonoida ($m/z = 255.0650$) inkubacijske smjese za 7-hidroksiflavon s dodanim generirajućim sustavom.

4.5. GALANGIN

Galangin se jako slabo metabolizira dajući kemferol i njegov strukturni izomer koji pokazuju samo naznaku pika.



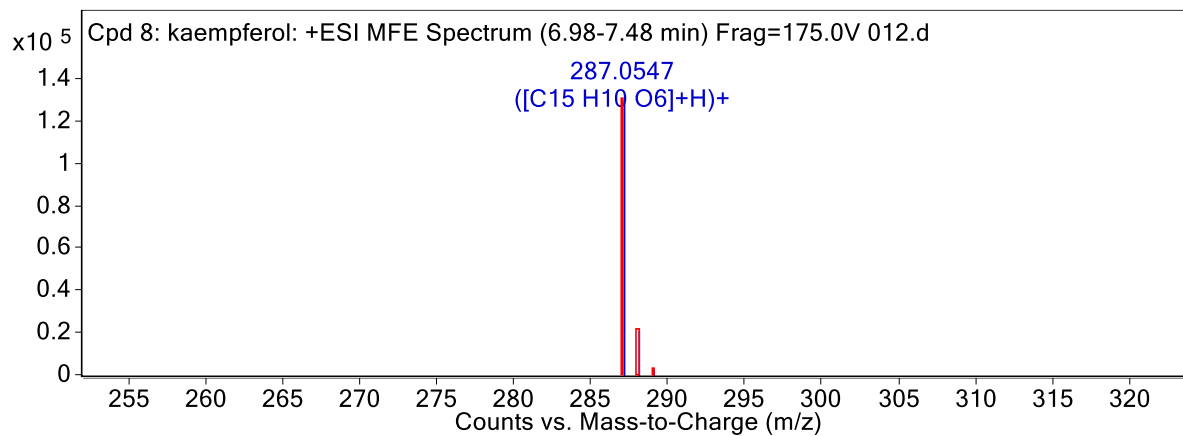
Slika 35. Metabolizam galangina posredovan humanim jetrenim mikrosomima



Slika 36. UV kromatogram inkubacijske smjese za galangin s dodanim generirajućim sustavom.

Tablica 10. Informacije o pronađenom metabolitu

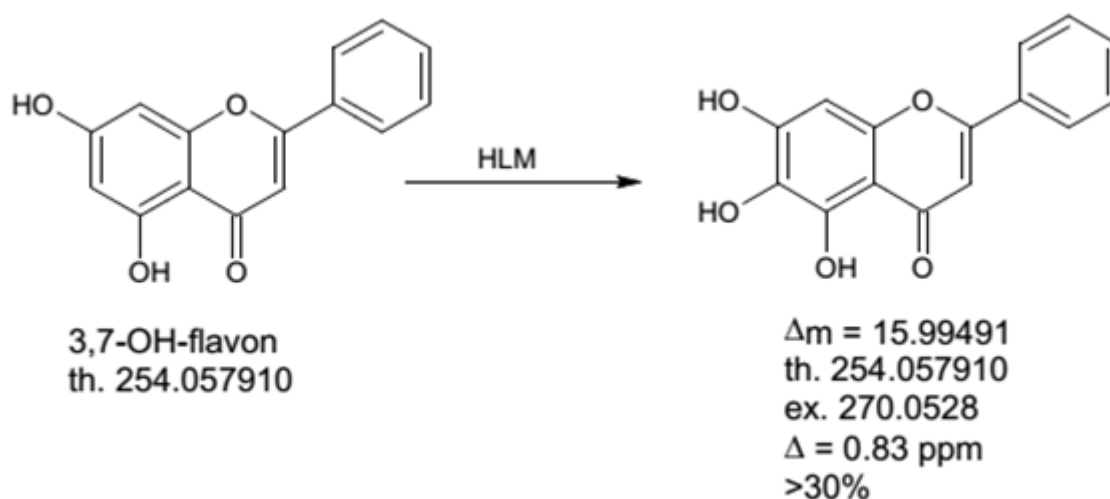
Oznaka spoja	Ime	<i>m/z</i>	RT	Masa
Cpd 8: kaempferol	kemferol	287,0547	7,17	286,0474



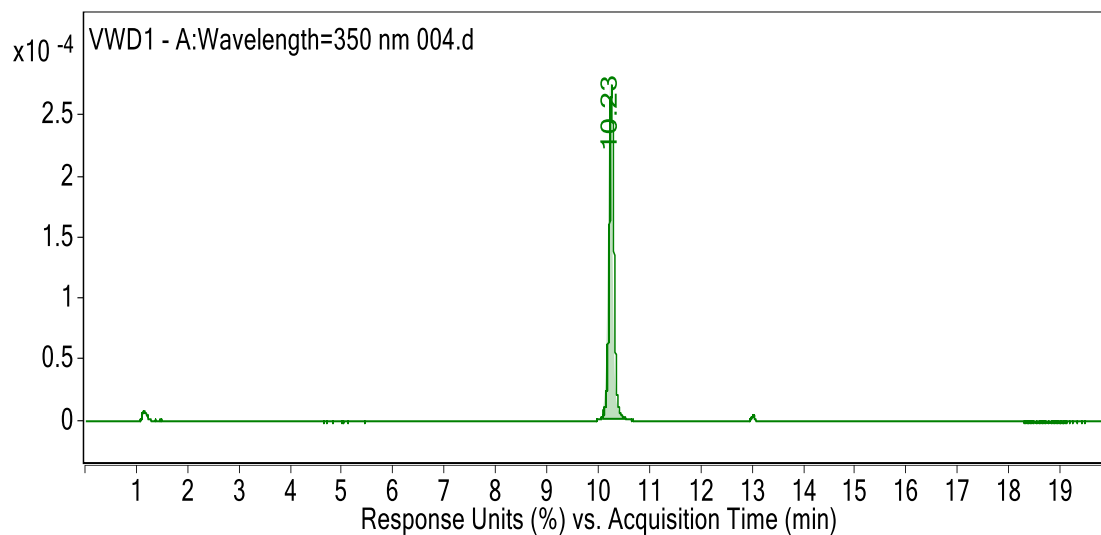
Slika 37. Spektar izdvojenog iona kemferola ($m/z = 287.0547$) inkubacijske smjese za galangin s dodanim generirajućim sustavom.

4.6. 3,7-HIDROKSIFLAVON

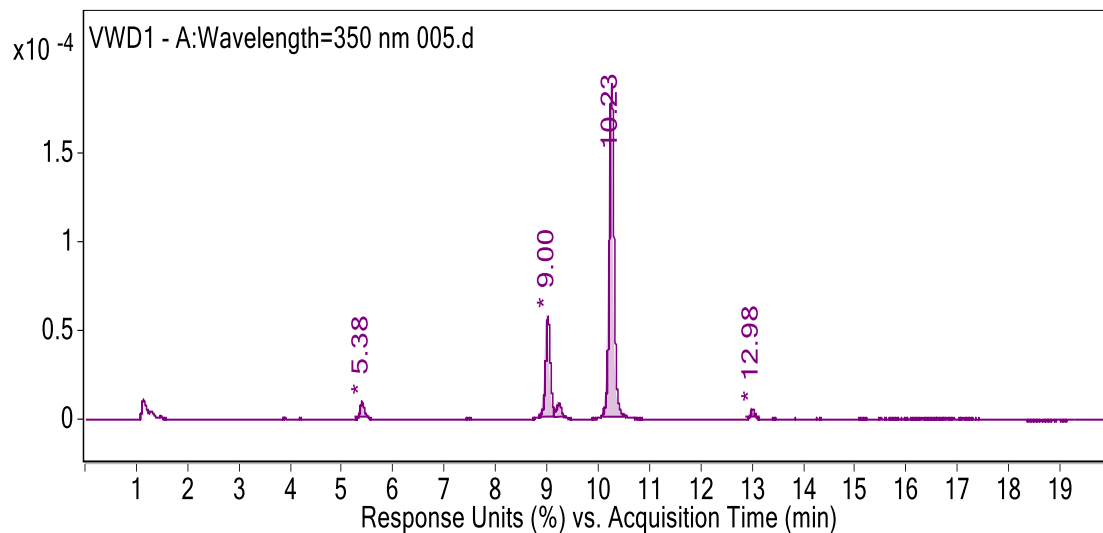
Detektiran metabolit 3,7-dihidroksiflavona je vjerojatno hidroksiliran na položaju 6 i time bi bio bajkalein, ali moguće je i da nastaje norwogonin koji je hidroksiliran na položaju 8 ili čak nešto sasvim treće. Samo je sigurno da nije apigenin, genistein ni galangin.



Slika 38. Metabolizam 3,7-dihidroksiflavona posredovan humanim jetrenim mikrosomima.



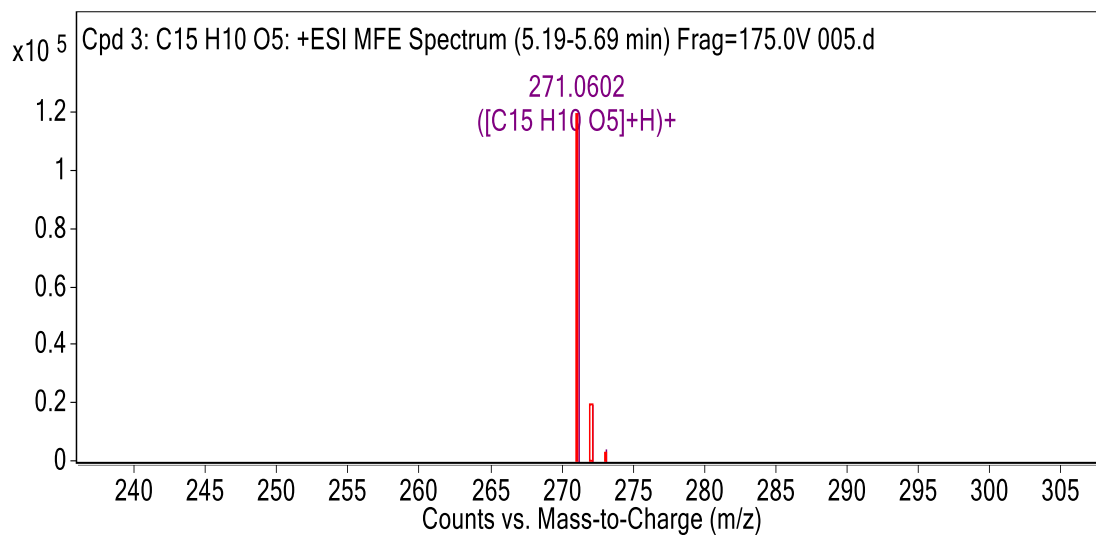
Slika 39. UV kromatogram inkubacijske smjese za 3,7-dihidroksiflavon bez dodanog generirajućeg sustava.



Slika 40. UV kromatogram inkubacijske smjese za 3,7-dihidroksiflavon s dodanim generirajućim sustavom.

Tablica 11. Informacije o pronađenom metabolitu

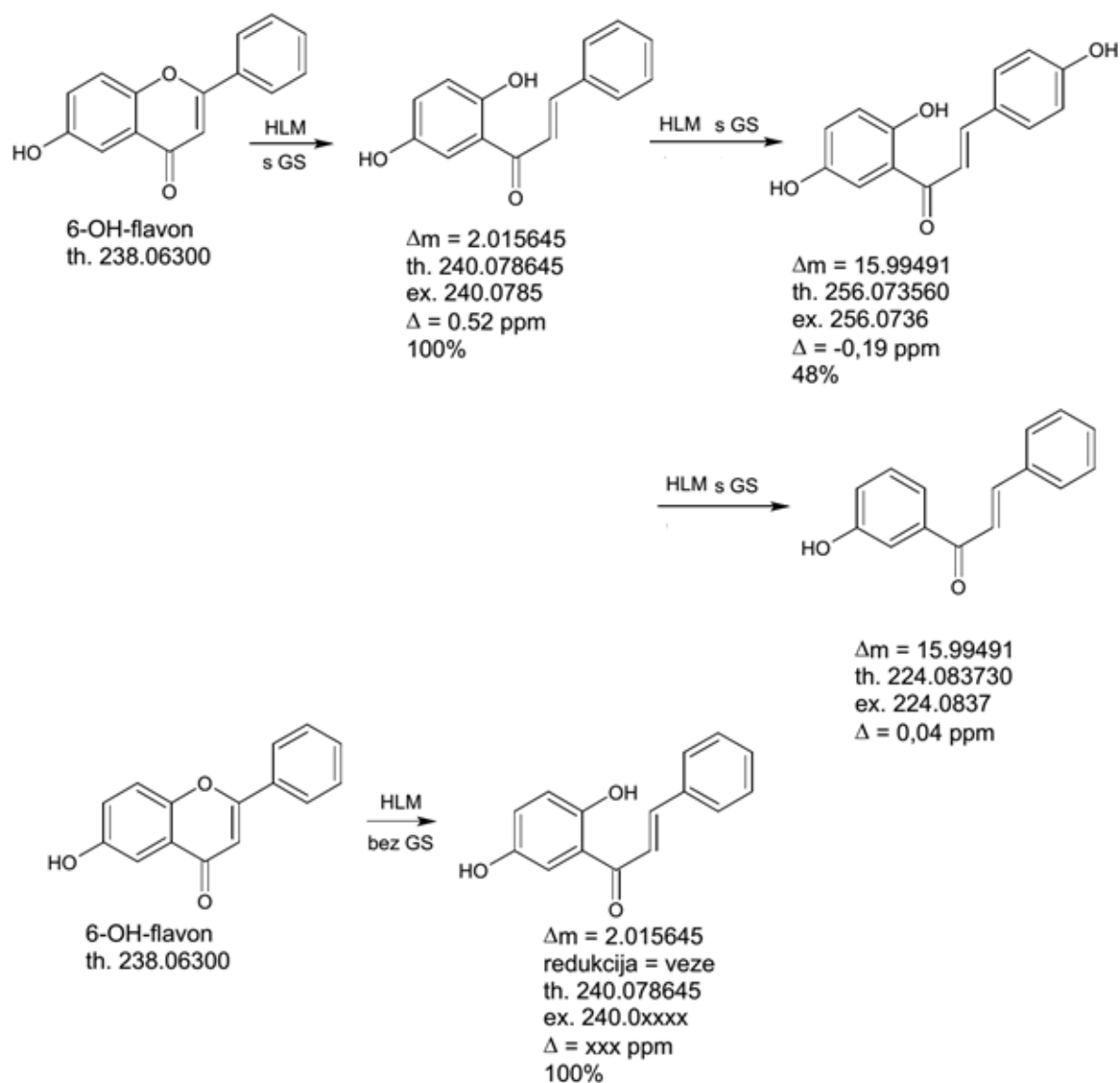
Oznaka spoja	<i>m/z</i>	RT	Masa
Cpd 3: C ₁₅ H ₁₀ O ₅	271,0602	5,38	270,0529



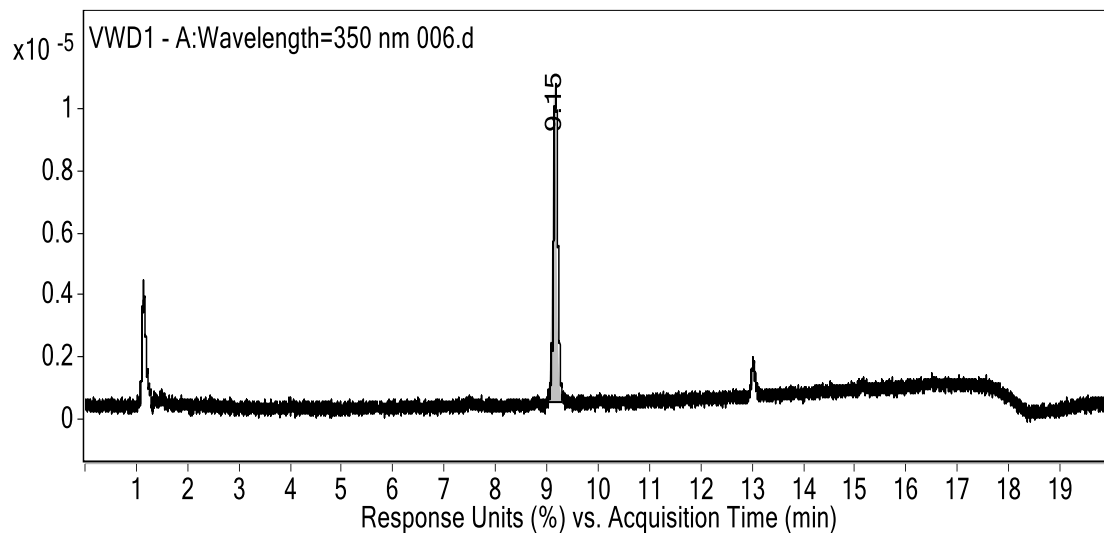
Slika 41. Spektar izdvojenog iona nepoznatog flavonoida ($m/z = 271,0602$) inkubacijske smjese za 3,7-dihidroksiflavon s dodanim generirajućim sustavom.

4.7. 6-HIDROKSIFLAVON

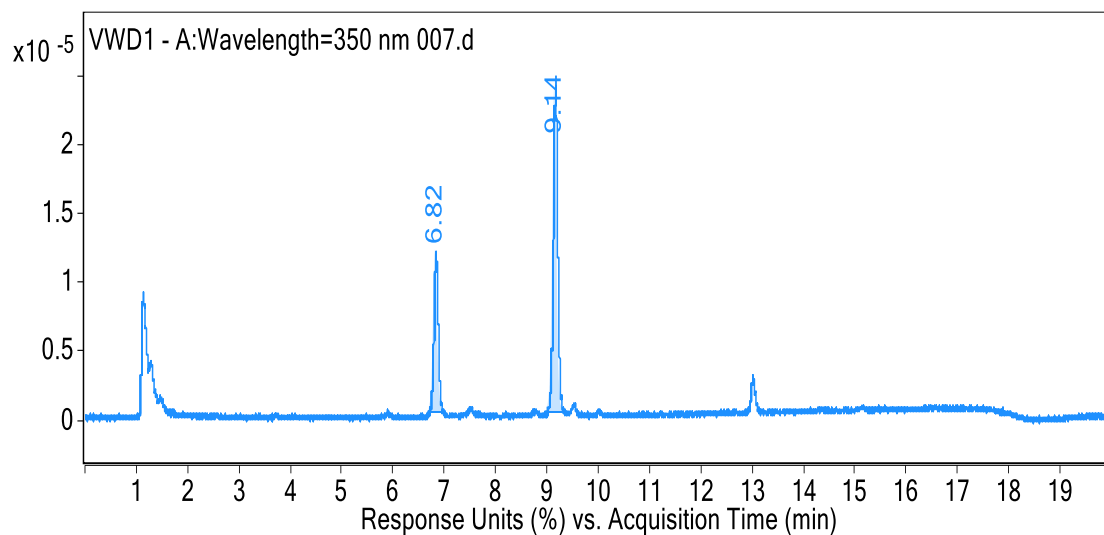
Kod 100% 6-hidroksiflavona spontano dolazi do pucanja C prstena što zaključujemo jer se reakcija odvija i bez prisustva generirajućeg sustava. Taj produkt se dalje metabolizira do konačnog produkta koji se više ne vidi na UV-Vis spektru.



Slika 42. Metabolizam 6-hidroksiflavona posredovan humanim jetrenim mikrosomima.



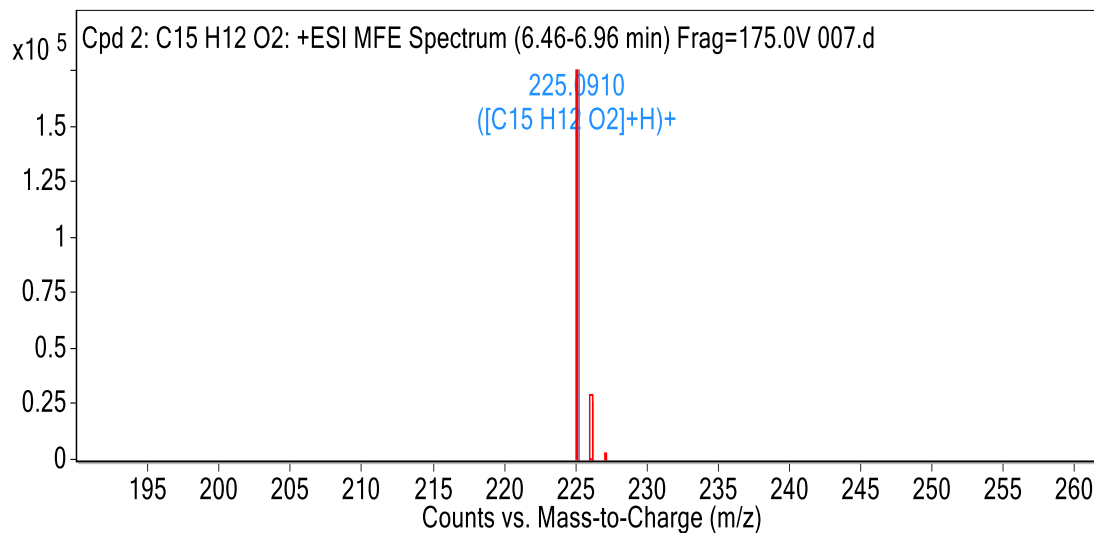
Slika 43. UV kromatogram inkubacijske smjese za 6-hidroksiflavon bez dodanog generirajućeg sustava.



Slika 44. UV kromatogram inkubacijske smjese za 6-hidroksiflavon s dodanim generirajućim sustavom.

Tablica 12. Informacije o pronađenom metabolitu

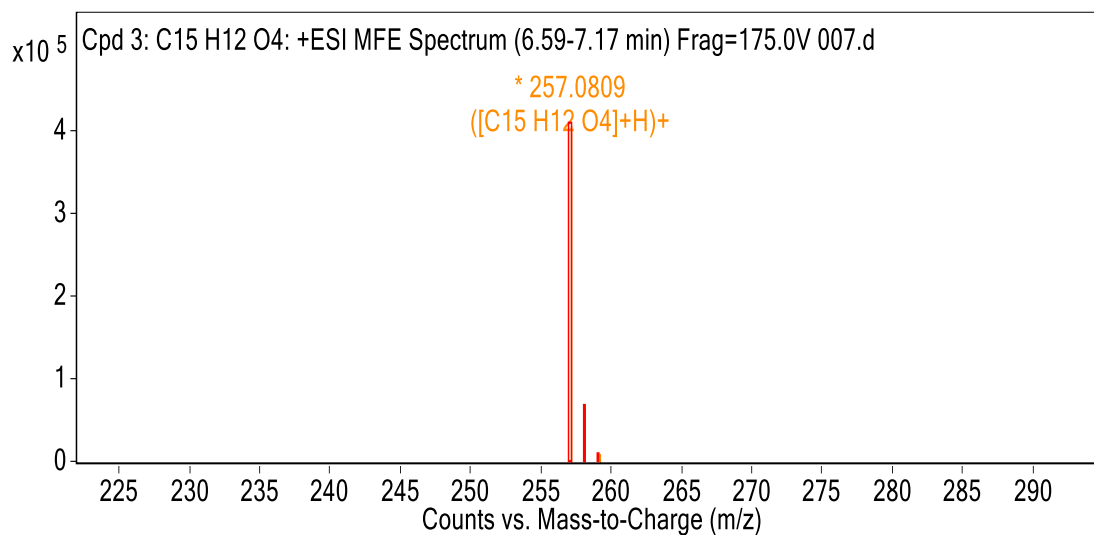
Oznaka spoja	<i>m/z</i>	RT	Masa
Cpd 2: C ₁₅ H ₁₂ O ₂	225,091	6,75	224,0837



Slika 45. Spektar izdvojenog iona nepoznatog flavonoida ($m/z = 225,0910$) inkubacijske smjese za 6-hidroksiflavin s dodanim generirajućim sustavom.

Tablica 13. Informacije o pronađenom metabolitu

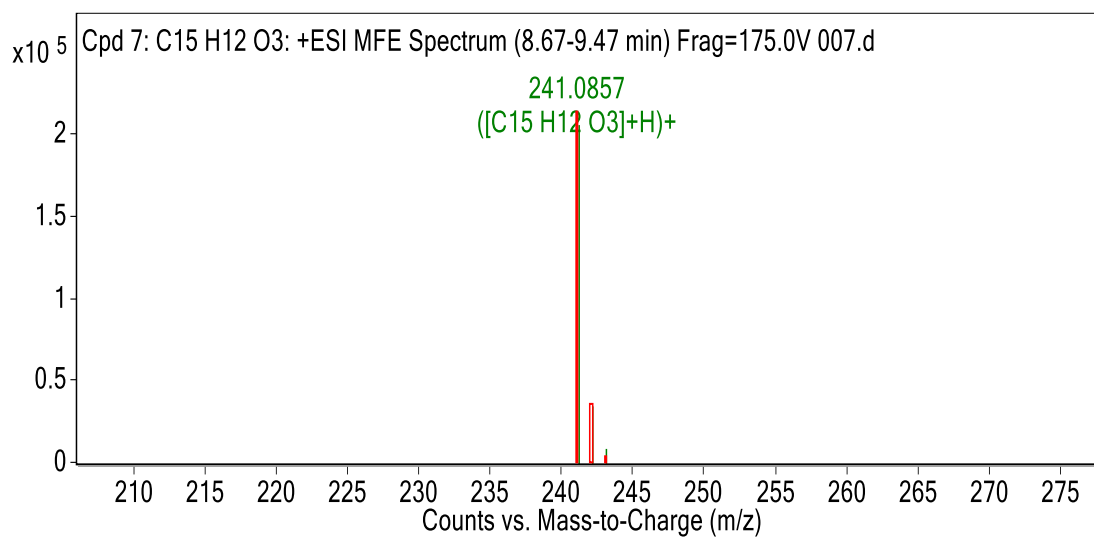
Oznaka spoja	m/z	RT	Masa
Cpd 3: C15 H12 O4	257,0809	6,82	256,0736



Slika 46. Spektar izdvojenog iona nepoznatog flavonoida ($m/z = 257,0809$) inkubacijske smjese za 6-hidroksiflavin s dodanim generirajućim sustavom.

Tablica 14. Informacije o pronađenom metabolitu

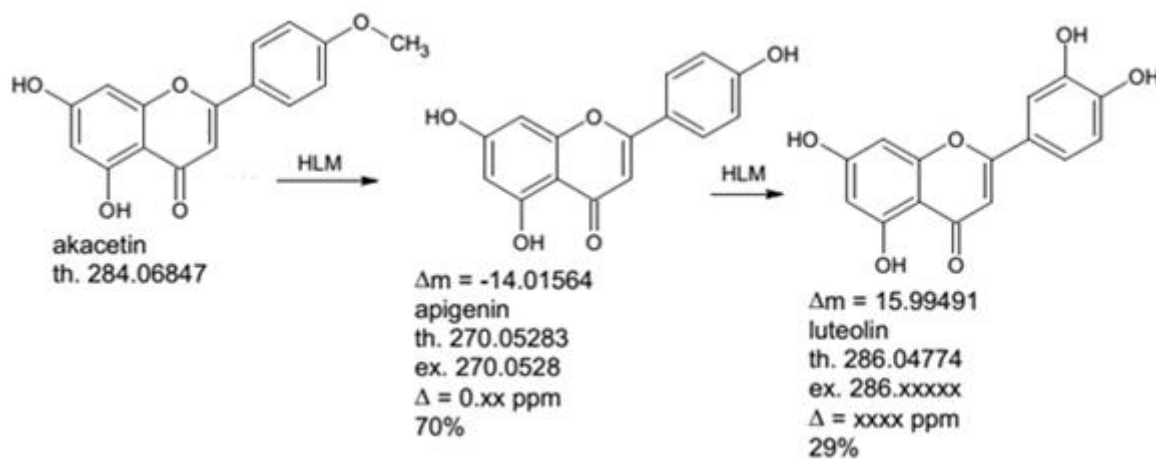
Oznaka spoja	<i>m/z</i>	RT	Masa
Cpd 7: C ₁₅ H ₁₂ O ₃	241,0857	9,14	240,0785



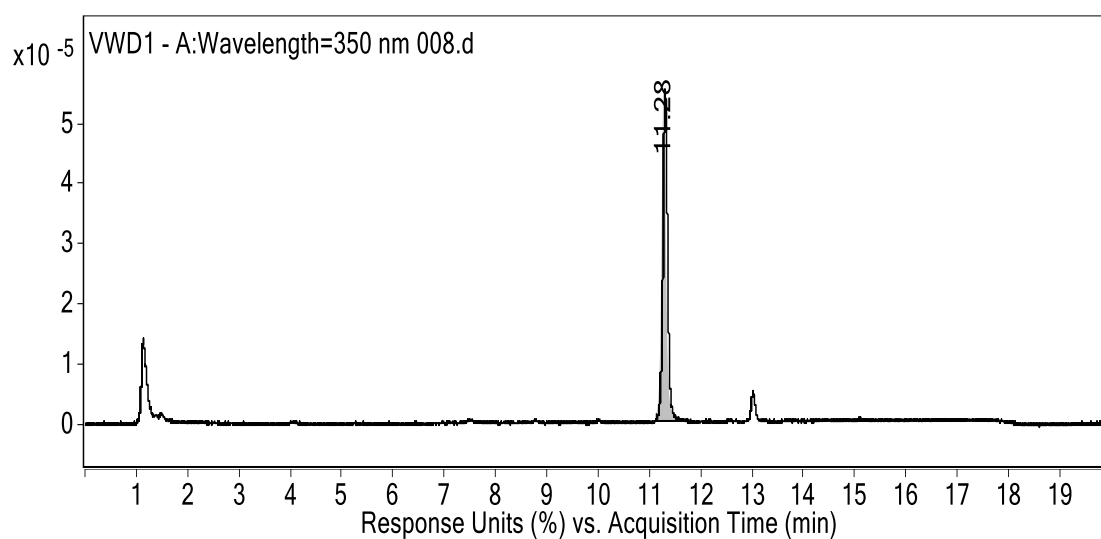
Slika 47. Spektar izdvojenog iona nepoznatog flavonoida ($m/z = 257,0805$) inkubacijske smjese za 6-hidroksiflavin s dodanim generirajućim sustavom.

4.8. AKACETIN

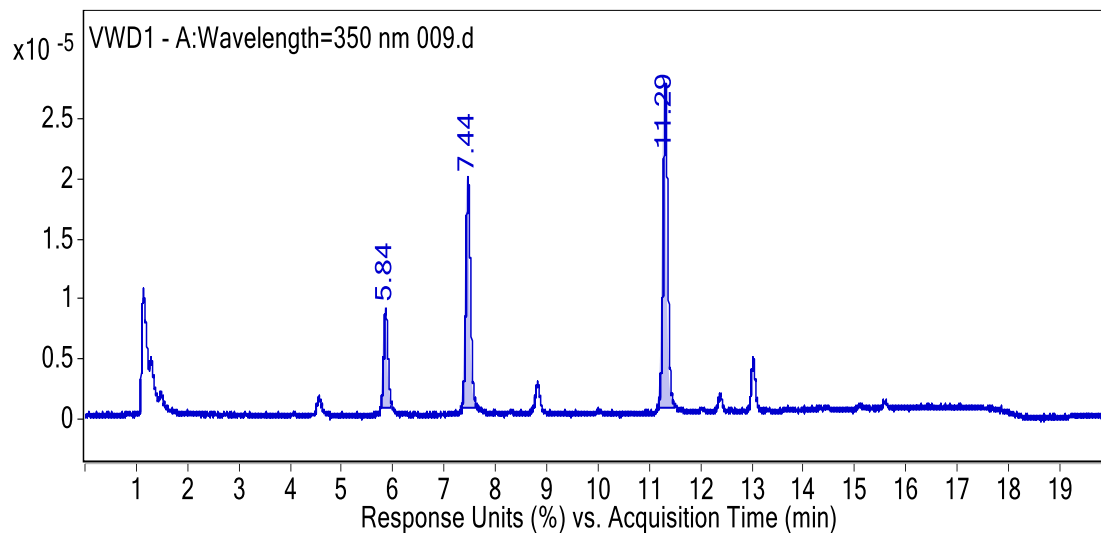
Akacetin se 70%no demetilira do apigenina, a zatim se dio hidroksilira na 3' položaju dajući luteolin.



Slika 48. Metabolizam akacetina posredovan humanim jetrenim mikrosomima.



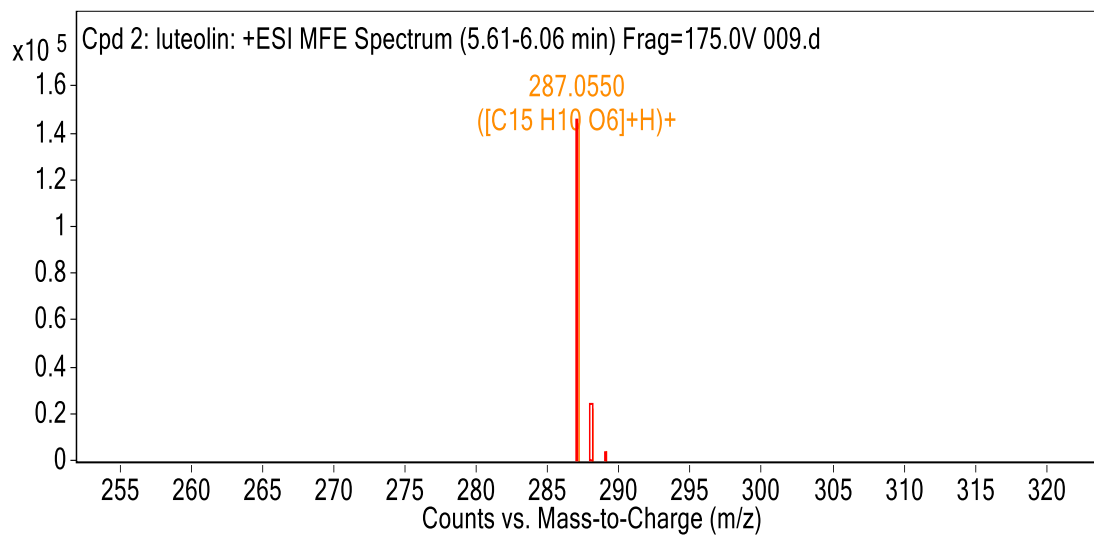
Slika 49. UV kromatogram inkubacijske smjese za akacetin bez dodanog generirajućeg sustava.



Slika 50. UV kromatogram inkubacijske smjese za akacetin s dodanim generirajućim sustavom.

Tablica 15. Informacije o pronađenom metabolitu

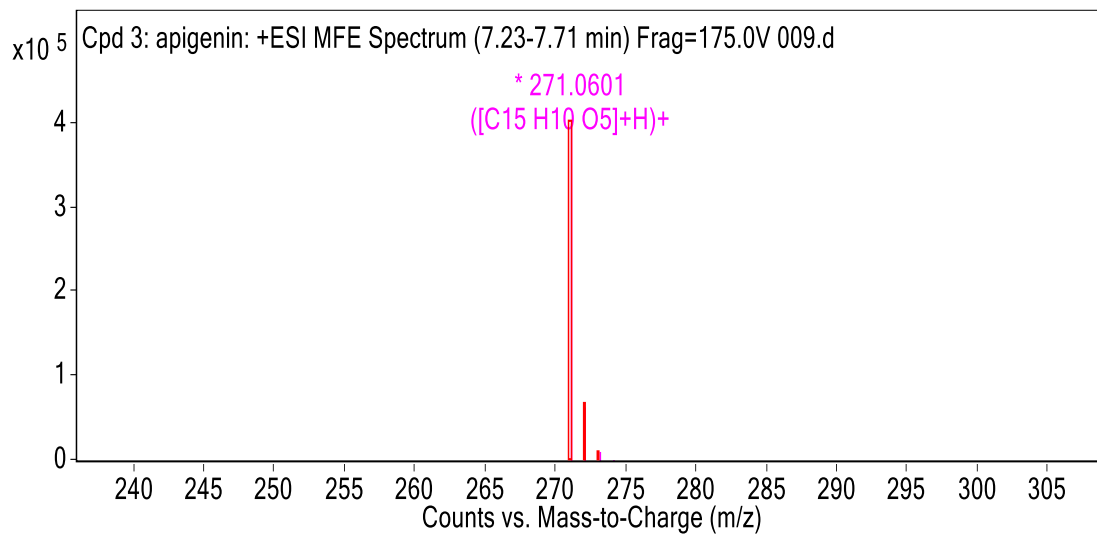
Oznaka spoja	Ime	m/z	RT	Mass
Cpd 2: luteolin	luteolin	287,055	5,84	286,0477



Slika 51. Spektar izdvojenog iona luteolina ($m/z = 287,0550$) inkubacijske smjese za akacetin s dodanim generirajućim sustavom.

Tablica 16. Informacije o pronađenom metabolitu

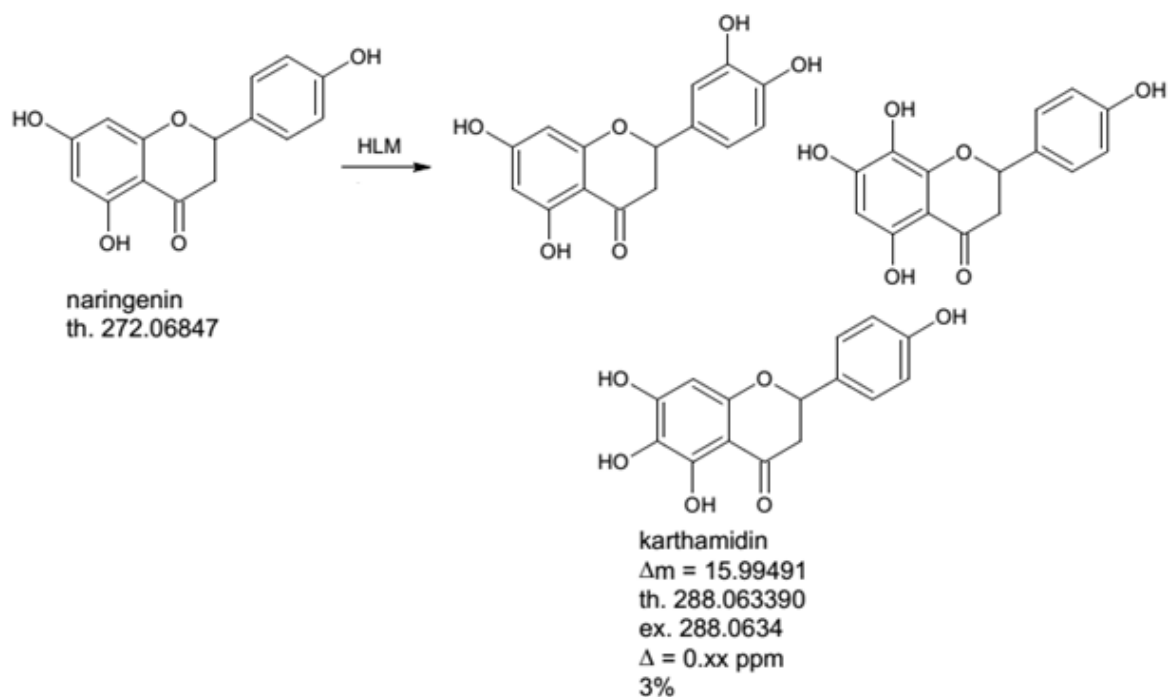
Oznaka spoja	Ime	m/z	RT	Masa
Cpd 3: apigenin	apigenin	271,0601	7,44	270,0528



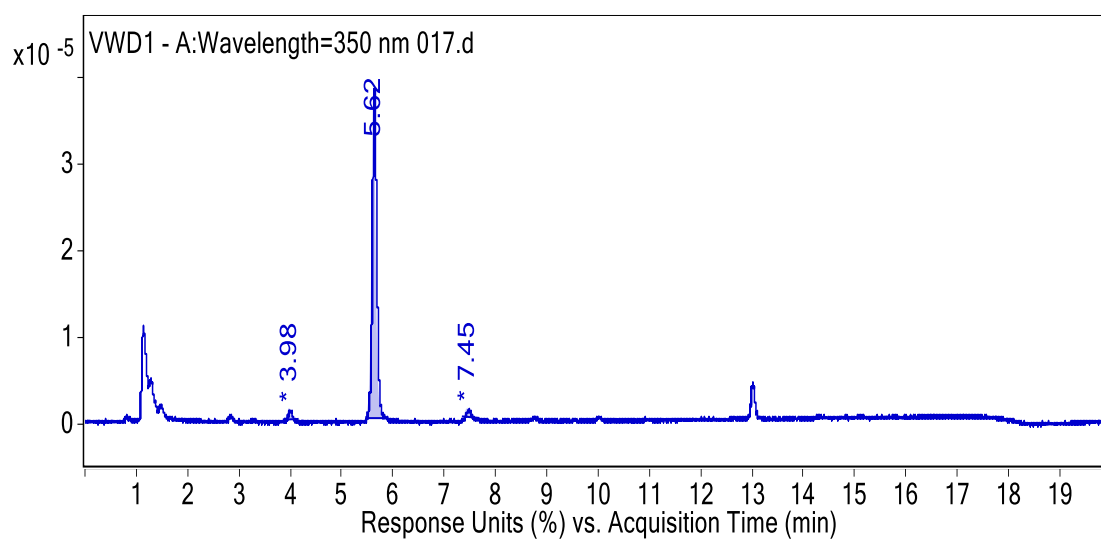
Slika 52. Spektar izdvojenog iona apigenina ($m/z = 271,0601$) inkubacijske smjese za akacetin s dodanim generirajućim sustavom.

4.9. NARINGENIN

Metabolizmom naringenina nastaje jedan od 3 moguća produkta. Dakle, on je ili 8 ili 3' ili 6 hidroksiliran. 6 hidroksiliran bi bio karthamidin.



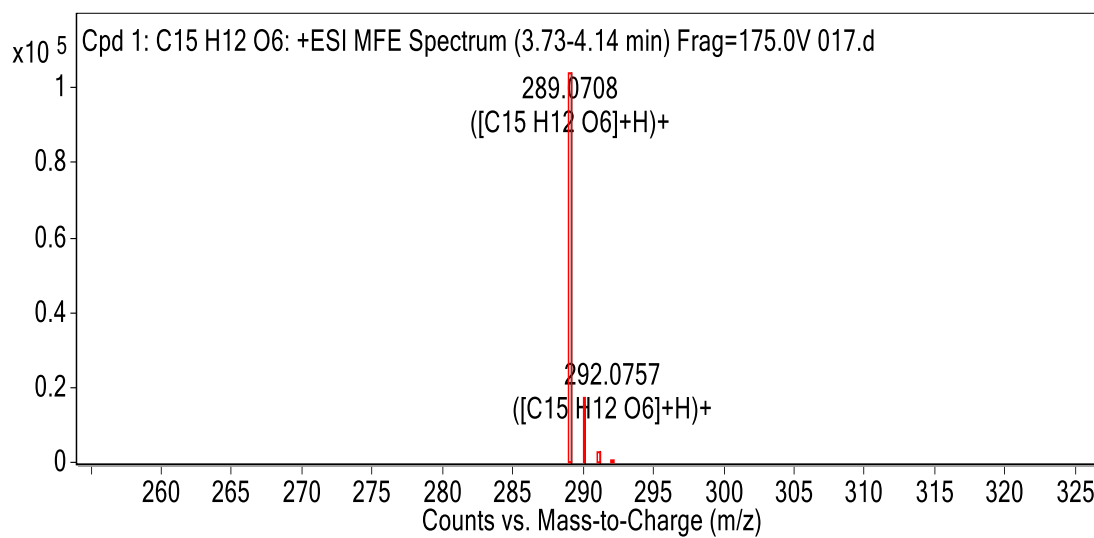
Slika 53. Metabolizam naringenina posredovan humanim jetrenim mikrosomima.



Slika 54. UV kromatogram inkubacijske smjese za naringenin s dodanim generirajućim sustavom.

Tablica 17. Informacije o pronađenom metabolitu

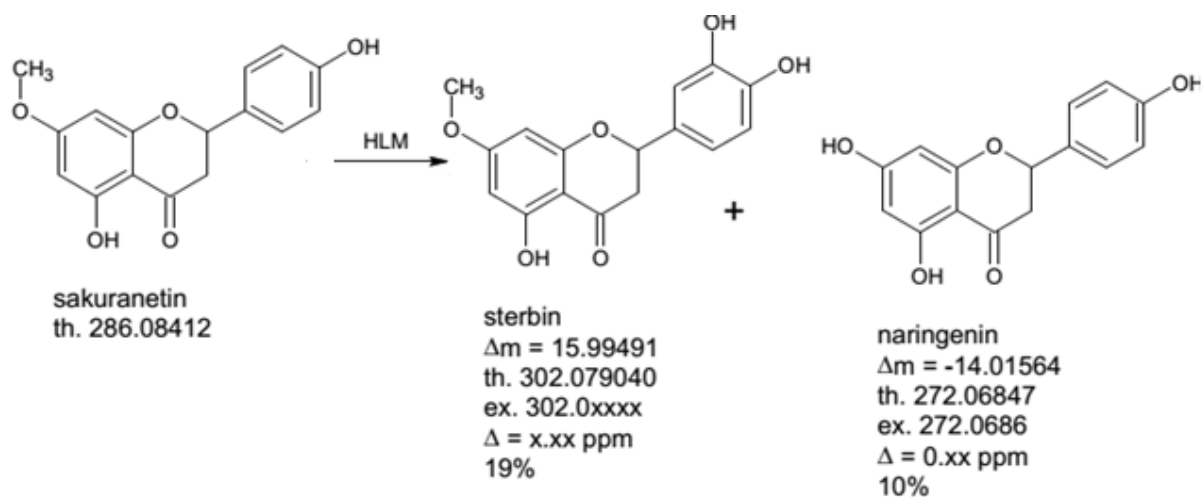
Oznaka spoja	<i>m/z</i>	RT	Mass
Cpd 1: C15 H12 O6	289,0708	3,98	288,0634



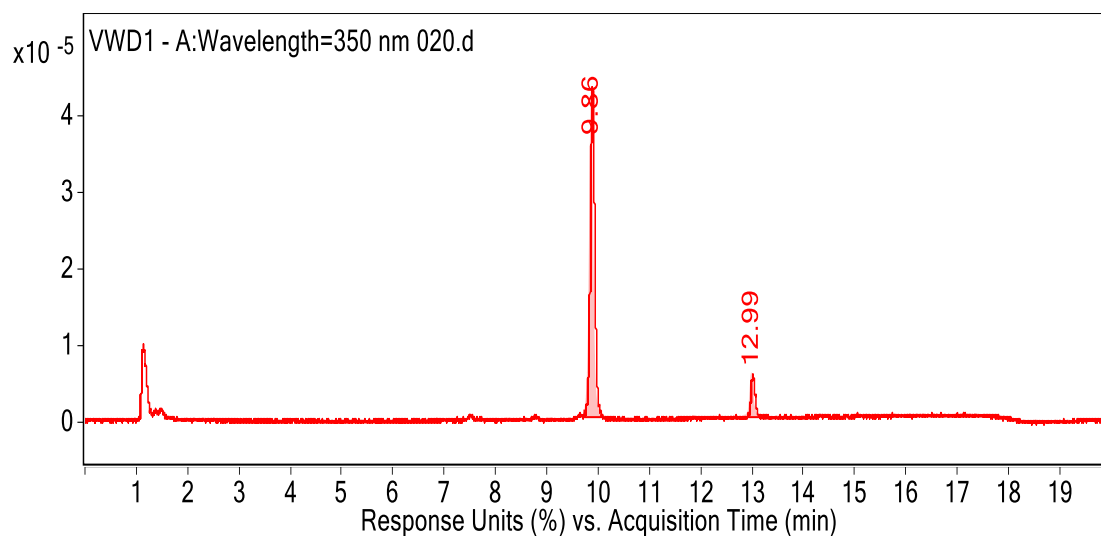
Slika 55. Spektar izdvojenog iona karthamidina ($m/z = 289,0708$) inkubacijske smjese za naringenin s dodanim generirajućim sustavom.

4.10. SAKURANETIN

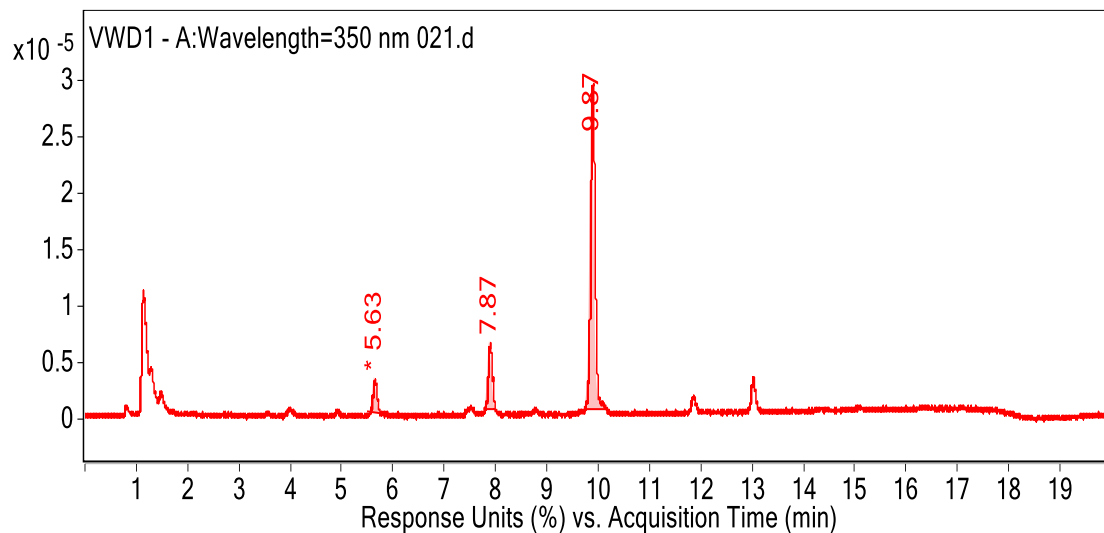
Sakuranetin se u maloj mjeri metabolizira citokromima P450. Metaboliti su naringenin i sterbin.



Slika 56. Metabolizam sakuranetina posredovan humanim jetrenim mikrosomima.



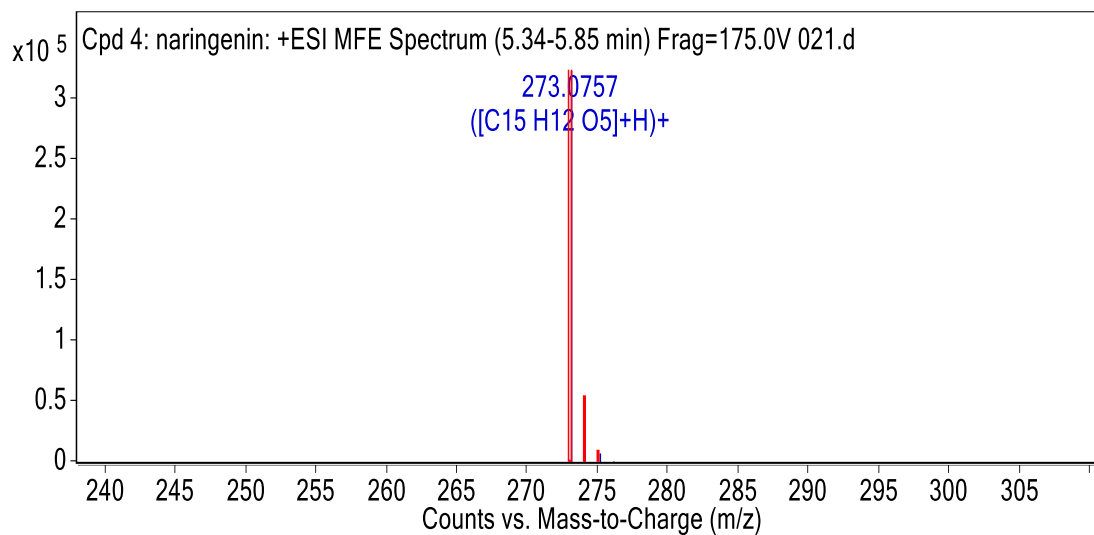
Slika 57. UV kromatogram inkubacijske smjese za sakuranetin bez dodanog generirajućeg sustava.



Slika 58. UV kromatogram inkubacijske smjese za sakuranetin s dodanim generirajućim sustavom.

Tablica 18. Informacije o pronađenom metabolitu

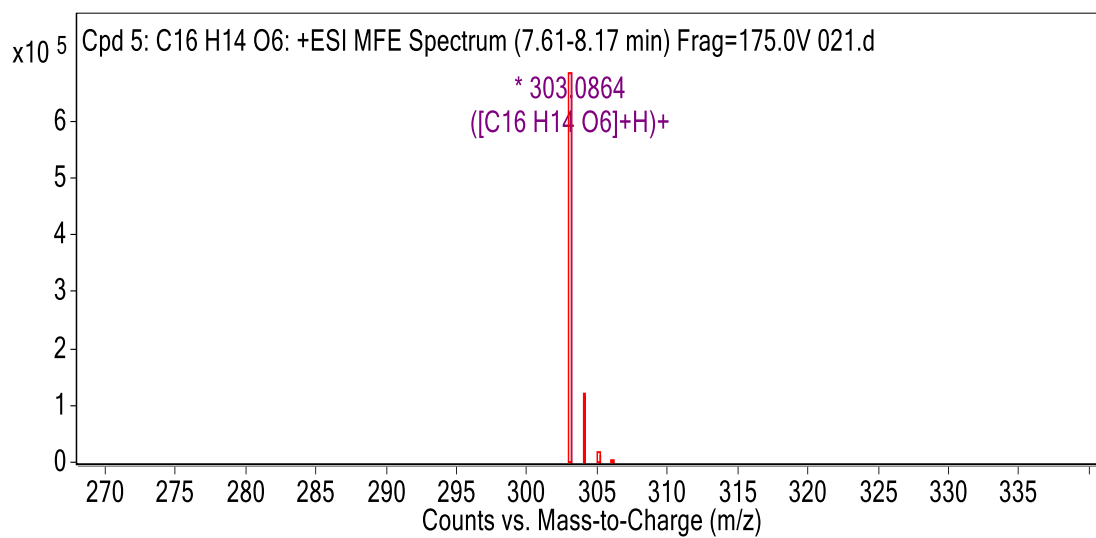
Oznaka spoja	Ime	m/z	RT	Mass
Cpd 4: naringenin	naringenin	273,0757	5,63	272,0683



Slika 59. Spektar izdvojenog iona naringenina ($m/z = 273,0757$) inkubacijske smjese za sakuranetin s dodanim generirajućim sustavom.

Tablica 19. Informacije o pronađenom metabolitu

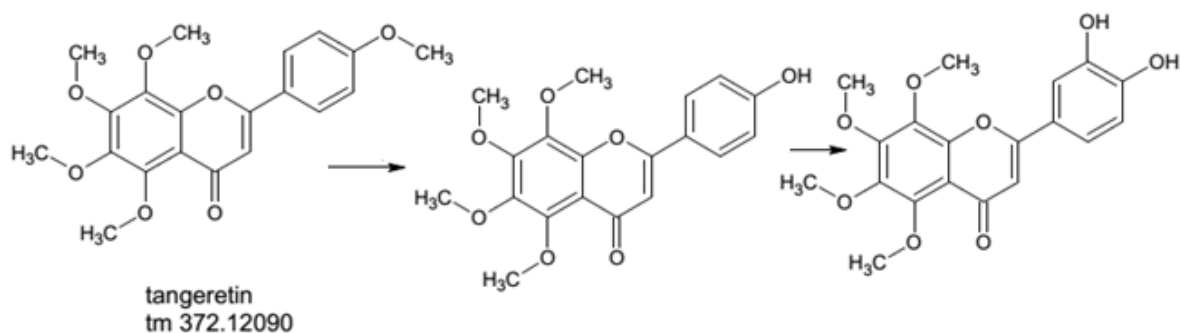
Oznaka spoja	Ime	m/z	RT	Masa
Cpd 5: C16 H14 O6	sterbin	303,0864	7,87	302,0791



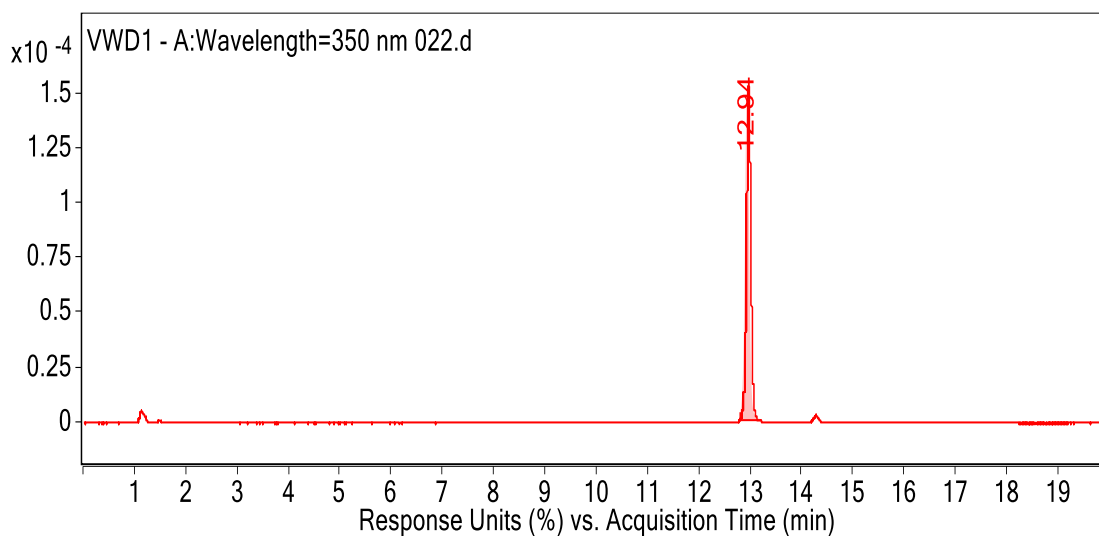
Slika 60. Spektar izdvojenog iona sterbina ($m/z = 303,0864$) inkubacijske smjese za sakuranetin s dodanim generirajućim sustavom.

4.11. TANGERETIN

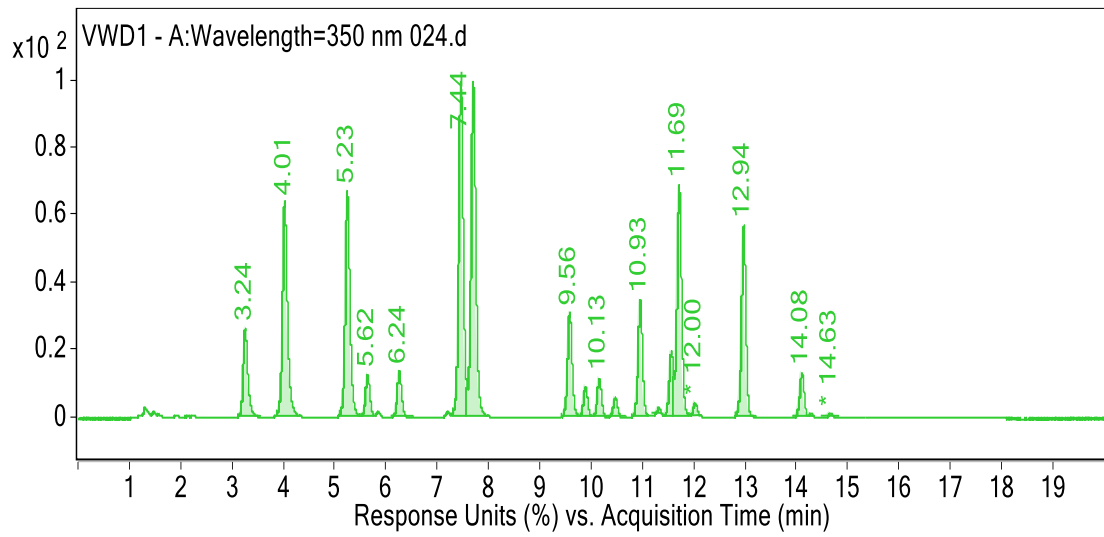
Posljedni flavonoid sa zanimljivim rezultatima istraživanja je tangeretin. Supstrat se prvo demetilira na 4' metoksi skupini, a zatim hidroksilira na 3' položaju.



Slika 61. Metabolizam tangeretina posredovan humanim jetrenim mikrosomima.



Slika 62. UV kromatogram inkubacijske smjese za tangeretin bez dodanog generirajućeg sustava.



Slika 63. UV kromatogram inkubacijske smjese za tangeretin s dodanim generirajućim sustavom.

5. RASPRAVA

U ovom smo radu primjenom humanih jetrenih mikrosoma koji sadrže citokrome P450 ispitivali metabolizam 30 odabranim aglikona flavonoida metodom obrnuto-fazne tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti spregnuta sa spektrometrom masa kao detektorom.

Flavonoidi su u ljudskom organizmu ponašaju kao ksenobiotici, brzo se i opsežno metaboliziraju u crijevnim i jetrenim stanicama pa se vjerojatno pojavljuju kao metaboliti u krvotoku i urinu (Rothwell i sur., 2016). Biološke aktivnosti flavonoida, uz njihove temeljne mehanizme djelovanja, oslanjaju se na aktivnost njihovih metabolita zbog brze i opsežne biotransformacije. Informacije o tome koji se flavonoidni metaboliti pojavljuju u plazmi su ključne za pravilnu procjenu njihove biološke aktivnosti. Isto tako je poznato da će biološke aktivnosti flavonoidnih metabolita vjerojatno biti različite od aktivnosti njihovih roditeljskih spojeva (Lotito i sur., 2011).

Selekcija naših odabranih flavonoida temeljena je prema literaturi ograničenim podacima o njihovom metabolizmu. Stanični mehanizmi njihovih brojnih bioloških učinaka i dalje su uvelike nepoznati. Do sada su u opisani luteolin kao metabolit apigenina (Breinholt i sur. 2002), kvercetin kao metabolit kemferola (Barve i sur., 2013; Breinholt i sur., 2002), eriodiktiol i karthamidin kao metaboliti naringenina (Chu i sur., 2016; Madej i sur., 2014) i sterbin i naringenin kao metaboliti sakuranetina (Katsumata i sur., 2017). Istraživanje je pokazalo da humanih jetreni mikrosomi posredstvom citokrome P450 kataliziraju većinom reakcije O-demetilacije i aromatske hidroksilacije aglikona flavonoida.

Od analiziranih 30 flavonoida, 11 ih je pokazalo tendenciju biotransformacije posredovane citokromima P450 od kojih su po prvi put opisani metaboliti flavona, 7-hidroksiflavona, galangina, 3,7-dihidroksiflavona, 6-hidroksiflavona, akacetina i tangeretina (Tablica 20).

U metabolizmu flavona posredovanom humanim jetrenim mikrosomima detektirana su 4 minorna metabolita, svi jedva vidljivi na UV-Vis detektoru. Dominantni metabolit bi bio 4' hidroksiliran metabolit ili 4'-hidroksiflavon. Ostali su: dvostruko hidroksilirani metabolit na položajima 5 i 6 A prstena, metabolit hidroksiliran na 7 C atomu tj. 7-hidroksiflavon i posljednji na 6 C atomu ili 6-hidroksiflavon.

Istraživanja su pokazala da 4'-hidroksiflavona u kombinaciji s fungicidima sprječava infekciju lišća pšenice tako povećava razinu osjetljivost gljivice *Pyrenophora tritici-repentis*, inače rezistentnu na fungicide (Reimann i Deising, 2005).

Tablica 20. Flavonoidi i njihovi opisani metaboliti.

Naziv flavonoida	Masa metabolita	Naziv metabolita
apigenin	286.0476	luteolin
kemferol	302.0425, 270.0527	kvercetin, galangin
flavon	238.0629, 238.0625, 238.0629, 256.0732	7-hidroksiflavon, 6-hidroksiflavon , 4'- hidroksiflavon
7- hidroksiflavon	254.0577	nije određen
galangin	286.0474	kemferol
3,7-dihidroksiflavon	270.0528	bajkalein
6- hidroksiflavon	224.0837, 256.0736, 240.0785	nije određen
akacetin	270.0528, 286.0477	apigenin, luteolin
naringenin	288.0634	karthamidin
sakuranetin	302.0791, 272.0686	sterbin, naringenin
tangeretin		nije određen

Dosadašnja istraživanja su pokazala da 7-hidroksiflavon ima antivirusno djelovanje poglavito na enterovirus 71 (EV71). EV71 je glavni uzročnik dječje zarazne bolesti ruku, nogu i usta (eng. hand,foot and mouth syndrome), koja posljednjih godina kontinuirano prevladava u Aziji. U natežim slučajevima kod djece zabilježeni su i smrtni slučajevi. Eksperimetalno istraživanje *in vitro* pokazalo je da 7-hidroksiflavona snažno inhibira replikacija virusne RNA i stvaranje EV71 plakova u stanicama. Navedeni rezultati pokazali su da 7-hidroksiflavon može poslužiti kao potencijalni zaštitni agens u liječenju bolesnika s kroničnom EV71 infekcijom (Wang i sur., 2014).

Za neke flavonoide navodi se da imaju osteogeno djelovanje i potencijalno posjeduju sposobnost liječenja osteoporoze inhibirajući aktivnost osteoklasta. S druge strane rezultati *in vitro* istraživanja pokazali su da flavonoidni aglikoni potiču diferencijaciju i mineralizaciju osteoblasta i na taj način stimuliraju osteogenu aktivnost (Wu i sur., 2013).

6-hidroksiflavon nalazi se u listovima biljke *Barleria prioniti*, a istraživanja na miševima pokazala da posjeduje selektivni afinitet za receptore tipa A gama aminomaslačne kiseline (GABA) i to za mjesto vezanja benzodiazepina i djeluje anksiolitički bez popratnog ankonvulzivnog, sedativnog i miorelaksirajućeg učinka (Ren i sur., 2010). Dosadašnja istraživanja 6-hidroksiflavona dokazala su njegovo protuupalno djelovanje u mezangijskim stanicama bubrega, čine ga privlačnim kandidatom za dijabetičku glomerulopatiju (Wang i sur., 2015). Isto tako da ovaj flavonoid učinkovito promiče i osteoblastičnu diferencijaciju i tako stimulira osteogenezu (Lai i sur., 2014).

Nadalje dokazali smo da se i 7-hidroksiflavon metabolizira humanim jetrenim mikrosomima. Njegovom biotransformacijom nastaje znatna količina 4' hidroksiliranog metabolit, preko 30%. Metabolit nismo uspjeli odrediti, ali smo sigurni da se ne radi o krizinu (spoj hidroksiliran na položaju 5), a ni 3,7 ni 3,6 hidroksiliranim spojevima.

Galangin se iznimno slabo metabolizira dajući kemferol hidroksilacijom na 4' položaju i njegov strukturni izomer koji nastaju u jako maloj količini.

Kaempferol je polifenolni antioksidans koji se nalazi u voću i povrću kao što su brokula, kupus, kelj, grah, endiv, poriluk, rajčica, jagode i grožđe i u biljkama koje se obično koriste u tradicionalnoj medicini primjerice ginko i lipa (Calderón-Montaño, 2011). Mnoga istraživanja su pokazala blagotvorne dijetetske učinke kempferola u smanjenju rizika od kroničnih bolesti, posebno karcinoma (Barve i sur., 2009; Breinholt i sur., 2002). Njegovi antioksidantni/protuupalni učinci pokazali su se u različitim modelima bolesti, uključujući one za encefalomijelitis, dijabetes i astmu (Rajendran i sur., 2014).

Detektiran metabolit 3,7-dihidroksiflavona je najvjerojatnije hidroksiliran na položaju 6 i time bi bio bajkalein, ali moguće je i da nastaje norvogonin koji je hidroksiliran na položaju 8 ili čak nešto sasvim treće. Samo je sigurno da nije apigenin, genistein ni galangin.

Bajkalein je glavni aktivni sastojak korijena *Scutellaria* koji je uobičajeno korišten u biljnoj medicini u mnogim azijskim zemljama. Dokazano je kao obećavajuće kemoprevencijsko sredstvo za mnoge vrste raka. i djeluje protuupalno i anti-apoptotički u endotoksičnom šoku. Istraživanja upućuju na to da liječenje njime može pružiti zaštitu od ozljede jetre uzrokovane sepsom i poboljšati preživljavanje miševa s polimikrobnom sepsom. Mehanizam zaštitnog djelovanja bajkaleina uključuje njegovu sposobnost smanjenja upalnog odgovora, inhibiranja apoptoze jetrenih stanica i suzbijanja MAPK i aktivacije NF- κ B (Liu i sur., 2015). Bajkalein također ima stimulirajući efekt na diferencijaciju osteoblasta i tako prevenira osteoporozi (Guo i sur., 2011).

Kod 6- hidroksiflavon spontano dolazi do pucanja C prstena i time se gubi benzo- γ -piranska struktura karakteristična za flavonoide. Iz našeg eksperimenta je evidentno da se reakcija odvija i bez prisustva generirajućeg sustava i da se produkti metabolizma više ne mogu naći na UV-Vis spektru.

Akacetin se 70%tno demetilira do apigenina koji u svojoj strukturi ima hidroksilne skupine na položajima C-5 i C-7 A-prstena i C-4 'B-prstena, a zatim se dio hidroksilira na 3' položaju dajući luteolin.

Apigenin pripada skupini flavonoida poznatih kao flavoni, nalazi se u više prehrambenih biljnih namirnica kao što su peršin, celer, timijan, kamilica, luk, matičnjak i naranče. Opsežne studije pokazale su da apigenin ima snažne antioksidativne, protuupalne i antikancerogena svojstva (Nabavi i sur., 2015). Brojni biološki učinci apigenina povezuju se s njegovim antioksidativnim učincima i sposobnošću uklanjanja slobodnih radikala. Stoga da naslutiti da apigenin može biti koristan u bolestima koje pogađa oksidacijski stres, kao što su kardiovaskularni i neurološki poremećaji. Iako je poznato antikancerogeno djelovanje apigenina klinička ispitivanja na ljudima koja bi istražila učinak suplementacije apigeninom na prevenciju bolesti nisu provedena (Shukla i Gupta, 2010).

Mnoga su izvješća pokazala da luteolin, flavon koji je uvelike prisutan u hrani, ima preventivnu i terapijsku vrijednost za neurodegenerativne bolesti uključujući Alzheimerovu bolest. Učinak luteolina povezuje se s njegovom sposobnošću ublažavanja neuroinflamacije. Luteolin također ima druge biološke funkcije, uključujući antioksidativnu aktivnost koja može pružiti dodatnu korist za prevenciju Alzheimerove bolesti (Kwon, 2017). Antioksidativni i neuroprotektivni učinci luteolina čine ga privlačnim kandidatom za dijabetičku neuropatiju. Pronađeno je da luteolin ublažava abnormalan osjećaj, poboljšava brzinu provođenja živaca i protok krvi živaca u štakora s dijabetesom (Li i sur., 2015). Luteolin značajno inhibira enzimatsku aktivnost trombina za 29,1% i faktora Xa za 16,2%. Također inhibira formiranje fibrinskog polimera. Pokazalo se da ispitivanje koagulacije luteolina produljuje tromboplastinsko i protrombinsko vrijeme potvrđujući njegov antitrombotski učinak (Choi i sur., 2015). Istraživanja su pokazale da luteolin ima i protuupalno djelovanje i da značajno smanjuje funkciju i diferencijaciju osteoklasta pa je mogući i potencijalni agens u prevenciji osteoporoze (Kim i sur.; 2011).

Posljedni flavonoid sa zanimljivim rezultatima istraživanja je tangeretin. Supstrat se prvo demetilira na 4' metoksi skupini, a zatim hidroksilira na 3' položaju. Iako smo dokazali da se metabolizira humanim jetrenim mikrosomima nismo odredili metabolite.

Metodom obrnuto-fazne tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti spregnutom sa spektrometrom masa kao detektorom analizirali smo metabolizam 30 odabranih aglikona flavonoida. Rezultati su pokazali da je u biotransformacije posredovane s humanim jetrenim citokromom P450 ušlo njih 11. Većina reakcija bile su *O*-demetilacija i aromatske hidroksilacija aglikona flavonoida nakon koje smo identificirano više poznatih, ali i nepoznatih metabolita. Po prvi put opisali smo metabolite flavona, 7-hidroksiflavona, galangina, 3,7-dihidroksiflavona, 6-hidroksiflavona, akacetina i tangeretina. Slijedeća stepenica u budućim istraživanjima bila bi identifikacija specifičnih citokroma P450 koji su katalizirali reakcije biotransformacije tih 11 aglikona flavonoida.

6. ZAKLJUČAK

Flavonoidi su heterogena porodica polifenolnih spojeva niske molekulske mase koji se sintetiziraju u biljkama kao sekundarni biljni metaboliti. Pripadaju fitospojevima te se nalaze u jestivom voću i povrću. Redovitom konzumacijom pojedini flavonoidi pokazuju potencijal modulacije ljudskog zdravlja tako da pomažu u prevenciji kroničnih i degenerativnih bolesti. Njihovi brojni farmakološki učinci čine ih zanimljivim za istraživanje u području farmacije.

Evolucijski se razvio čitav niz enzimskih sustava kojima je cilj ksenobiotike tj. strane tvari prevesti (metabolizirati) u vodotopljiv oblik pogodan za izlučivanje. Dominantni enzimi u metabolizmu ksenobiotika, a time i flavonoida, su citokromi P450.

Od analiziranih 30 flavonoida, 11 ih je pokazalo tendenciju biotransformacije posredovane citokromima P450 od kojih su po prvi put opisani metaboliti flavona, 7-hidroksiflavona, galangina, 3,7-dihidroksiflavona, 6-hidroksiflavona, akacetina i tangeretina.

Humani jetreni mikrosomi sadrže citokrome P450 i u prisustvu NADPH kataliziraju većinom reakcije O-demetilacije i aromatske hidroksilacije aglikona flavonoida.

Ova studija je doprinjela boljem razumijevanju mehanizma djelovanja biotransformacije aglikona flavonoida posredovane s humanim jetrenim citokromom P450 i otvorila nova pitanja njihove moguće primjene u istraživanjima u području farmacije.

7. LITERATURA

1. Ando Y, Fuse E, Figg WD. Thalidomide metabolism by the CYP2C subfamily. *Clin Cancer Res*, 2002, 8, 1964–1973.
2. Baer BR, DeLisle RK, Allen A. Benzylic oxidation of gemfibrozil-1-O- β -glucuronide by P450 2C8 leads to heme alkylation and irreversible inhibition. *Chem Res Toxicol*, 2009, 22, 1298–1309.
3. Balogh A, Gessinger S, Svarovsky U, Hippus M, Mellinger U, Klinger G, Hoffmann A, Oettel M. Can oral contraceptive steroids influence the elimination of nifedipine and its primary pyridine metabolite in humans? *Eur J Clin Pharmacol*, 1998, 54, 729–734.
4. Barve A, Chen C, Hebbar V, Desiderio J, Lay-Lay Saw C, Kong A. Metabolism, oral bioavailability and pharmacokinetics of chemopreventive kaempferol in rats. *Biopharm Drug Dispos*, 2009, 7, 356–365.
5. Beaune P, Dansette PM, Mansuy D, Kiffel L, Finck M, Amar C, Leroux JP, Homberg JC. Human anti-endoplasmic reticulum autoantibodies appearing in a drug-induced hepatitis are directed against a human liver cytochrome P-450 that hydroxylates the drug. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84, 551–555.
6. Beginners Guide to Liquid Chromatography, 2017., <http://www.waters.com>, pristupljeno 25.5.2017.
7. 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.
8. Burda S, Oleszek W. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, 49, 2774–2779.
9. Calderón-Montaña JM, Burgos-Morón E, Pérez-Guerrero C, López-Lázaro M. A review on the dietary flavonoid kaempferol. *Mini Rev Med Chem*, 2011, 11, 298–344.
10. Chan CY, New LS, Ho HK, Chan EC. Reversible time-dependent inhibition of cytochrome P450 enzymes by duloxetine and inertness of its thiophene ring towards bioactivation. *Toxicol Lett*, 2011, 206, 314–324.
11. Cheng JB, Motola DL, Mangelsdorf DJ, Russell DW. De-orphanization of cytochrome P450 2R1: a microsomal vitamin D 25-hydroxylase. *J Biol Chem*, 2003, 278, 38084–38093.
12. Chiba K, Kobayashi K, Manabe K, Tani M, Kamataki T, Ishizaki T. Oxidative metabolism of omeprazole in human liver microsomes: cosegregation with Smephenytoin 4 -hydro xylation. *J Pharmacol Exp Ther*, 1993, 266, 52–59.

13. Choi JH, Kim YS, Shin CH, Lee HJ, Kim S. Antithrombotic Activities of Luteolin In Vitro and In Vivo. *J Biochem Mol Toxicol*, 2015, 12, 552–8.
14. Choi JS, Yokozazawa T, Oura H. Antihyperlipidemic effects of flavonoids from *Prunus davidiana*. *Journal of Natural Products*, 1991, 54, 218–224.
15. Chu LL, Pandey RP, Jung N, Jung HJ, Kim EH, Sohng JK. Hydroxylation of diverse flavonoids by CYP450 BM3 variants: biosynthesis of eriodictyol from naringenin in whole cells and its biological activities. *Microb Cell Fact*, 2016, 15, 135.
16. Dansette PM, Thang DC, El Amri H, Mansuy D. Evidence for thiophene-S-oxide as a primary reactive metabolite of thiophene in vivo: formation of a dihydrothiophene sulfoxide mercapturic acid. *Biochem Biophys Res Commun*, 1992, 186, 1624–1630.
17. Di Majo D, Giammanco M, La Guardia M, Tripoli E, Giammanco S, Finotti E. Flavanones in Citrus fruit: Structure-antioxidant activity relationships. *Food Research International*, 2005, 38, 1161–1166.
18. Elangovan V, Sekar N, Govindasamy S. Chemopreventive potential of dietary bioflavonoids against 20-methylcholanthrene-induced tumorigenesis. *Cancer Letters*, 1994, 87, 107–113.
19. Elkalioubie A, Allorge D, Robriquet L, Wiart JF, Garat A, Broly F, Fourrier F. Nearfatal tramadol cardiotoxicity in a CYP2D6 ultrarapid metabolizer. *Eur J Clin Pharmacol*, 2011, 67, 855–858.
20. Fischbach T, Lenk W. Additional routes in the metabolism of phenacetin. *Xenobiotica*, 1985, 149–164.
21. Gasche Y, Daali Y, Fathi M, Chiappe A, Cottini S, Dayer P, Desmeules J. Codeine intoxication associated with ultrarapid CYP2D6 metabolism. *New Engl J Med*, 2004, 351, 2827–2831.
22. Gerin B, Dell'Aiera S, Richert L, Smith S, Chanteux H. Assessment of cytochrome P450 (1A2, 2B6, 2C9 and 3A4) induction in cryopreserved human hepatocytes cultured in 48-well plates using the cocktail strategy. *Xenobiotica*, 2013, 43, 320–335.
23. Guengerich FP. Human cytochrome P450 enzymes. U: *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry*, 3rd ed. Ortiz de Montellano PR, urednik, New York, Springer International Publishing, 2015, str. 97–108.
24. Guo AJ, Choi RC, Cheung AW, Chen VP, Xu SL, Dong TT, Chen JJ, Tsim KW. Baicalin, a flavone, induces the differentiation of cultured osteoblasts: an action via the Wnt/beta-catenin signaling pathway. *J Biol Chem*, 2011, 286, 27882–93.

25. Hardy KD, Wahlin MD, Papageorgiou I, Unadkat JD, Rettie AE, Nelson SD. Studies on the role of metabolic activation in tyrosine kinase inhibitor-dependent hepatotoxicity: induction of CYP3A4 enhances the cytotoxicity of lapatinib in HepaRG cells. *Drug Metab Dispos*, 2014, 42, 162–171.
26. Havsteen BH. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology and Therapeutics*, 2002, 96, 67–202.
27. He K, Bornheim LM, Falick AM, Maltby D, Yin H, Correia MA. Identification of the heme-modified peptides from cumene hydroperoxide-inactivated cytochrome P450 3A4. *Biochemistry*, 1998, 37, 17448–17457.
28. Henderson L, Yue QY, Bergquist C, Gerden B, Arlett P. St John's wort (*Hypericum perforatum*): drug interactions and clinical outcomes. *Brit J Clin Pharmacol*, 2002, 54, 349–356.
29. Heo HY, Lee SJ, Kwon CH, Kin SW, Sohn DH, Au WW. Anticlastogenic effects of galangin against bleomycin-induced chromosomal aberrations in mouse spleen lymphocytes. *Mutation Research – Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 1994, 311, 225–229.
30. Higashi MK, Veenstra DL, Kondo LM, Wittkowsky AK, Srinouanprachanh SL, Farin FM, Rettie AE. Association between CYP2C9 genetic variants and anticoagulation - related outcomes during warfarin therapy. *J Am Med Assoc*, 2002, 287, 1690–1698.
31. High Resolution Mass Spectrometry (LC/Q-TOF/MS) for the Detection of Pharmaceuticals in Water, 2013., <http://www.agilent.com>, pristupljeno 23.4.2017.
32. Hirano T, Gotoh M, Oka K. Natural flavonoids and lignans are potent cytostatic agents against human leukemia HL-60 cells. *Life Science*, 1994, 55, 1061–1069.
33. Hollman PCH, Buijsman MNCP, Van Gameren Y, Cnossen PJ, De Vries JHM, Katan MB, The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man. *Free Radical Research*, 1999, 31, 569–573.
34. Honkalammi J, Niemi M, Neuvonen PJ, Backman JT. Gemfibrozil is a strong inactivator of CYP2C8 in very small multiple doses. *Clin Pharmacol Ther*, 2012, 91, 846–855.
35. Hukkanen J, Pelkonen A, Hakkola J, Raunio H. Expression and regulation of xenobiotic-metabolizing cytochrome P450 (CYP) enzymes in human lung. *Crit Rev Toxicol*, 2002, 32, 391–411.
36. Ishikawa C, Ozaki H, Nakajima T, Ishii T, Kanai S, Anjo S, Shirai K, Inoue I. A frameshift variant of CYP2C8 was identified in a patient who suffered from

- rhabdomyolysis after administration of cerivastatin. *J Human Genet*, 2004, 49, 582–585.
37. Kandaswami C, Perkins E, Soloniuk DS, Drzewiecki G, Middleton E. Antiproliferative effects of citrus flavonoids on a human squamous cell carcinoma in vitro. *Cancer Letters*, 1991, 56, 147–152.
38. Karam WG, Goldstein JA, Lasker JM, Ghanayem BI. Human CYP2C19 is a major omeprazole 5-hydroxylase, as demonstrated with recombinant cytochrome P450 enzymes. *Drug Metab Dispos*, 1996, 24, 1081–1087.
39. Kaspera R, Naraharisetti SB, Tamraz B, Sahele T, Cheesman MJ, Kwok PY, Marciante K, Heckbert SR, Psaty BM, Totah RA. Cerivastatin in vitro metabolism by CYP2C8 variants found in patients experiencing rhabdomyolysis. *Pharmacogenet Genomics*, 2010, 20, 619–629.
40. Katsuma S, Hamana K, Horie K, Toshima H, Hasegawa M. Identification of Sternbin and Naringenin as Detoxified Metabolites from the Rice Flavanone Phytoalexin Sakuranetin by *Pyricularia oryzae*. *Chemistry & Biodiversity*, 2017, 14, 1612–1880.
41. Kazui M, Nishiya Y, Ishizuka T, Hagihara K, Farid NA, Okazaki O, Ikeda T, Kurihara A. Identification of the human cytochrome P450 enzymes involved in the two oxidative steps in the bioactivation of clopidogrel to its pharmacologically active metabolite. *Drug Metab Dispos*, 2010, 38, 92–99.
42. Kent UM, Sridar C, Spahlinger G, Hollenberg PF. Modification of serine 360 by a reactive intermediate of 17 α -ethynylestradiol results in mechanism-based inactivation of cytochrome P450s 2B1 and 2B6. *Chem Res Toxicol*, 2008, 21, 1956–1963.
43. Kerb R, Fux R, Mörike K, Kreamsner PG, Gil JP, Gleiter CH, Schwab M. Pharmacogenetics of antimalarial drugs: effect on metabolism and transport. *Lancet Infect Dis*, 2009, 9, 760–774.
44. Kim TH, Jung JW, Ha BG, Hong JM, Park EK, Kim HJ, Kim SY. The effects of luteolin on osteoclast differentiation, function in vitro and ovariectomy-induced bone loss. *J Nutr Biochem*, 2011, 22, 8–15
45. Kramlinger VM, Kanamori T, Alvarado-Rojas M, Guengerich FP. Cytochrome P450 3A enzymes catalyze the O6-demethylation of thebaine, a key step in endogenous mammalian morphine biosynthesis. *J Biol Chem*, 2015, 290, 20200–20210.
46. Kumar S, Pandey AK. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal*, 2013, 14, 333–345.

47. Kwon S. Luteolin as a potential preventive and therapeutic candidate for Alzheimer's disease. *Exp Gerontol*, 2017, 95, 39–43.
48. Lai CH, Wu YW, Yeh SD, Lin YH, Tsai YH. Effects of 6-Hydroxyflavone on Osteoblast Differentiation in MC3T3-E1 Cells. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2014, 2014, 924560.
49. Lang NP, Butler MA, Massengill J, Lawson M, Stotts RC, Maurer-Jensen M, Kadlubar FF. Rapid metabolic phenotypes for acetyltransferase and cytochrome P4501A2 and putative exposure to food-borne heterocyclic amines increase the risk for colorectal cancer or polyps. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prevent*, 1994, 3, 675–682.
50. Leo MA, Lasker JM, Raucy JL, Kim CI, Black M, Lieber CS. Metabolism of retinol and retinoic acid by human liver cytochrome P450IIC8. *Arch Biochem Biophys*, 1998, 269, 305–312.
51. Li M, Li Q, Zhao Q, Zhang J, Lin J. Luteolin improves the impaired nerve functions in diabetic neuropathy: behavioral and biochemical evidences. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8, 10112–10120.
52. Liu A, Wang W, Fang H, Yang Y, Jiang X, Liu S, Hu J, Hu Q, Dahmen U, Dirsch O. Baicalein protects against polymicrobial sepsis-induced liver injury via inhibition of inflammation and apoptosis in mice. *Eur J Pharmacol*, 2015, 748, 45–53.
53. Lotito SB, Zhang WJ, Yang CS, Crozier A, Frei B. Metabolic conversion of dietary flavonoids alters their anti-inflammatory and antioxidant properties. *Free Radic Biol Med*, 2011, 51, 454–463.
54. Madej A, Popłoński J, Huszcza E. Improved oxidation of naringenin to carthamidin and isocarthamidin by *Rhodotorula marina*. *Appl Biochem Biotechnol*, 2014, 173, 67–73.
55. Manthey JA, Guthrie N, Grohmann K. Biological properties of citrus flavonoids pertaining to cancer and inflammation. *Current Medicinal Chemistry*, 2001, 8, 135–153.
56. Medić-Šarić M, Jasprica I, Mornar A, Smolčić-Bubalo A, Golja P. Quantitative analysis of flavonoids and phenolic acids by two-dimensional thin layer chromatography. *J Planar Chromatogr*, 2004, 17, 459–463.
57. Middleton E, Kandaswami C, Theoharides T. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews*, 2000, 52, 673–751.
58. Minoda Y, Kharasch ED. Halothane-dependent lipid peroxidation in human liver microsomes is catalyzed by cytochrome P4502A6 (CYP2A6). *Anesthesiology*, 2001, 95, 509–514.

59. Nabavi SM, Habtemariam S, Daglia M, Nabavi SF. Apigenin and Breast Cancers: From Chemistry to Medicine. *Anticancer Agents Med Chem*, 2015, 15, 728–735.
60. Overview of Mass Spectrometry for Protein Analysis, 2016., <https://www.thermofisher.com>, pristupljeno 24.5.2017.
61. Peterson JMS, Dwyer J. Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity. *Nutrition Research*, 1998, 18, 1995–2018.
62. Pianezza ML, Sellers EM, Tyndale RF. Nicotine metabolism defect reduces smoking. *Nature*, 1998, 393, 750.
63. Rajendran P, Rengarajan T, Nandakumar N, Palaniswami R, Nishigaki Y, Nishigaki I. Kaempferol, a potential cytostatic and cure for inflammatory disorders. *Eur J Med Chem*, 2014, 86, 103-112.
64. Rautio A, Kraul H, Kojo A, Salmela E, Pelkonen O. Interindividual variability of coumarin 7-hydroxylation in healthy volunteers. *Pharmacogenetics*, 1992, 2, 227–233.
65. Reimann S, Deising HB. Inhibition of efflux transporter-mediated fungicide resistance in *Pyrenophora tritici-repentis* by a derivative of 4'-hydroxyflavone and enhancement of fungicide activity. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71, 3269–3275.
66. Ren L, Wang F, Xu Z, Chan WM, Zhao C, Xue H. GABA(A) receptor subtype selectivity underlying anxiolytic effect of 6-hydroxyflavone. *Biochem Pharmacol*, 2010, 79, 1337–1344.
67. Rendic S, Guengerich FP. Survey of Human Oxidoreductases and Cytochrome P450 Enzymes Involved in the Metabolism of Xenobiotic and Natural Chemicals. *Chem Res Toxicol*, 2015, 28, 38–42.
68. Rendić SP, Medić-Šarić M. Biokemija lijekova. Zagreb, Medicinska naklada, 2013, str. 69.
69. Robbins RC. Regulatory action of phenylbenzo-[α]-pyrone (PBP) derivatives on blood constituents affecting rheology in patients with coronary heart disease (CHD). *Int J Vitam Nutr Res*, 1976, 46, 338–347.
70. Rothwell JA, Urpi-Sarda M, Boto-Ordonez M. Systematic analysis of the polyphenol metabolome using the Phenol-Explorer database. *Mol Nutr Food Res*, 2016, 60, 203–211.
71. Settle FA. Handbook of instrumental techniques for analytical chemistry. Upper Saddle River, New Jersey, Prentice Hall PTR, 1997, str. 444–451.
72. Shimada T, Murayama N, Yamazaki H, Tanaka K, Takenaka S, Komori M, Kim D, Guengerich FP. Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons and aryl and

- heterocyclic amines by human cytochromes P450 2A13 and 2A6. *Chem Res Toxicol*, 2013, 26, 529–537.
73. Shimoi K, Masuda S, Furogori M, Esaki S, Kinae N. Radioprotective affect of antioxidative flavonoids in c-ray irradiated mice. *Carcinogenesis*, 1994, 15, 2669–2672.
74. Shukla S, Gupta S. Apigenin: a promising molecule for cancer prevention. *Pharm Res*, 2010, 6, 962–78.
75. Sohl CD, Cheng Q, Guengerich FP. Chromatographic assays of drug oxidation by human cytochrome P450 3A4. *Natural Protocol*, 2009, 4, 1252–1257.
76. Sorich MJ, Horowitz JD, Sorich W, Wiese MD, Pekarsky B, Karnon JD. Cost-effectiveness of using CYP2C19 genotype to guide selection of clopidogrel or ticagrelor in Australia. *Pharmacogenomics*, 2013, 14, 2013–2021.
77. Stapleton AE, Walbot V. Flavonoids can protect maize DNA from thr induction of ultraviolet radiation damage. *Plant Physiology*, 1994, 105, 881–889.
78. Stiborova 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 and 1A2. *Toxicol Sci*, 2012, 125, 345–358.
79. Strushkevich N, Usanov SA, Plotnikov AN, Jones G, Park HW. Structural analysis of CYP2R1 in complex with vitamin D3. *J Mol Biol*, 2008, 380, 95–106.
80. Tripoli E, La Guardia M, Giammanco S, Di Majo D, Giammanco M. Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. *Food Chem*, 2007, 104, 466–479.
81. Vieira I, Sonnier M, Cresteil T. Developmental expression of CYP2E1 in the human liver: hypermethylation control of gene expression during the neonatal period. *Eur J Biochem*. 1996, 238, 476–483.
82. Wang J, Su H, Zhang T, Du J, Cui S, Yang F, Jin Q. Inhibition of Enterovirus 71 replication by 7-hydroxyflavone and diisopropyl-flavon7-yl Phosphate. *PLoS One*, 2014, 9, 925–965.
83. Wang X, Wang Z, Sidhu PS, Desai UR, Zhou Q. 6-Hydroxyflavone and derivatives exhibit potent anti-inflammatory activity among mono-, di- and polyhydroxylated flavones in kidney mesangial cells. *PLoS One*, 2015, 10, 116-129.
84. Ward BA, Gorski JC, Jones DR, Hall SD, Flockhart DA, Desta Z. The cytochrome P450 2B6 (CYP2B6) is the main catalyst of efavirenz primary and secondary metabolism:

- implication for HIV/AIDS therapy and utility of efavirenz as a substrate marker of CYP2B6 catalytic activity. *J Pharmacol Exp Ther*, 2003, 306, 287–300.
85. Wienkers LC, Wurden CJ, Storch E, Kunze KL, Rettie AE, Trager WF. Formation of (R)-8-hydroxywarfarin in human liver microsomes: a new metabolic marker for the (S)-mephenytoin hydroxylase, P4502C19. *Drug Metab Dispos*, 1996, 24, 610–614.
86. Zhao B, Lei L, Kagawa N, Sundaramoorthy M, Banerjee S, Nagy LD, Guengerich FP, Waterman MR. Three-dimensional structure of steroid 21-hydroxylase (cytochrome P450 21A2) with two substrates reveals locations of disease-associated variants. *J Biol Chem*, 2012, 287, 10613–10622.
87. Zhou S, Yung Chan S, Cher Goh B, Chan E, Duan W, Huang M, McLeod HL. Mechanism-based inhibition of cytochrome P450 3A4 by therapeutic drugs. *Clin Pharmacokinet*, 2005, 44, 279–304.
88. Zhu JG, Ochalek JT, Kaufmann M, Jones G, Deluca HF. CYP2R1 is a major, but not exclusive, contributor to 25-hydroxyvitamin D production in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110, 15650–15655.

8. SAŽETAK/SUMMARY

8.1. SAŽETAK

Flavonoidi su heterogena porodica polifenolnih spojeva niske molekulske mase koji se sintetiziraju u biljkama kao sekundarni biljni metaboliti. Pripadaju fitospojevima te se nalaze u jestivom voću i povrću. Redovitom konzumacijom pojedini flavonoidi pokazuju potencijal modulacije ljudskog zdravlja tako da pomažu u prevenciji kroničnih i degenerativnih bolesti. Njihovi brojni farmakološki učinci čine ih zanimljivim za istraživanje u području farmacije. Stanični mehanizmi njihovih brojnih bioloških učinaka i dalje su uvelike nepoznati.

Citokromi P450 su neupitno najvažniji enzimi koji kataliziraju biotransformacije lijekova. Sekvenciranjem ljudskog genoma je otkriveno da u ljudi postoji 57 citokrom P450 enzima. Područje biokemije i enzimologije citokroma P450 ostaje atraktivno, s mnogim otvorenim pitanjima na koja trebamo odgovoriti, uključujući metabolizam flavonoida koji je ispitan na relativno malom broju flavonoida.

Cilj ovog rada je *in vitro* postupcima utvrditi humane jetrene citokrome P450 odgovorne za biotransformaciju 30 odabranih flavonoida primjenom humanih jetrenih mikrosoma. Za praćenje metabolizma primijenjena je obrnuto-fazna tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti spregnuta sa spektrometrom masa kao detektorom. Od analiziranih 30 flavonoida, 11 ih je pokazalo tendenciju biotransformacije posredovane citokromima P450 od kojih su po prvi put opisani metaboliti flavona, 7-hidroksiflavona, galangina, 3,7-dihidroksiflavona, 6-hidroksiflavona, akacetina i tangeretina.

8.2. SUMMARY

Flavonoids are a heterogeneous family of low molecular weight polyphenolic compounds synthesized in plants as secondary plant metabolites. They belong to phytochemicals and are found in fruits and vegetables. Regular consumption of individual flavonoids shows the potential for human health modification in helping to prevent chronic and degenerative diseases. Their numerous pharmacological effects make them interesting for research in the field of pharmacy. Mechanisms of their numerous biological effects are still largely unknown.

Cytochromes P450 are undoubtedly the most important enzymes that catalyze the biotransformation of drugs. By sequencing the human genome, it has been found that there are 57 cytochrome P450 enzymes in humans. The field of biochemistry and cytochrome P450 enzymology remains attractive, with many open questions to be addressed, including the metabolism of flavonoids researched on a relatively small number of flavonoids.

The aim of this paper is to determine in vitro the cytochromes P450 responsible for the biotransformation of 30 selected flavonoids using human liver microsomes. Reverse-phase high performance liquid chromatography with a mass spectrometer as a detector was used as the method of screening. Of the analyzed 30 flavonoids, 11 showed the tendency of biotransformation mediated by cytochrome P450. The flavonoids whose metabolisms were described for the first time are: flavone, 7-hydroxyflavone, galangine, 3,7-dihydroxyflavone, 6-hydroxyflavone, acacetin and tangeretine metabolites.

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

PRAĆENJE METABOLIZMA AGLIKONA FLAVONOIDA POSREDOVANOG ENZIMIMA CITOKROM P450

Mirela Lozić

SAŽETAK

Flavonoidi su heterogena porodica polifenolnih spojeva niske molekulske mase koji se sintetiziraju u biljkama kao sekundarni biljni metaboliti. Pripadaju fitospojevima te se nalaze u jestivom voću i povrću. Redovitom konzumacijom pojedini flavonoidi pokazuju potencijal modulacije ljudskog zdravlja tako da pomažu u prevenciji kroničnih i degenerativnih bolesti. Njihovi brojni farmakološki učinci čine ih zanimljivim za istraživanje u području farmacije. Stanični mehanizmi njihovih brojnih bioloških učinaka i dalje su uvelike nepoznati. Citokromi P450 su neupitno najvažniji enzimi koji kataliziraju biotransformacije lijekova. Sekvenciranjem ljudskog genoma je otkriveno da u ljudi postoji 57 citokrom P450 enzima. Područje biokemije i enzimologije citokroma P450 ostaje atraktivno, s mnogim otvorenim pitanjima na koja trebamo odgovoriti, uključujući metabolizam flavonoida koji je ispitan na relativno malom broju flavonoida. Cilj ovog rada je *in vitro* postupcima utvrditi humane jetrene citokrome P450 odgovorne za biotransformaciju 30 odabranih flavonoida primjenom humanih jetrenih mikrosoma. Za praćenje metabolizma primijenjena je obrnuto-fazna tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti spregnuta sa spektrometrom masa kao detektorom. Od analiziranih 30 flavonoida, 11 ih je pokazalo tendenciju biotransformacije posredovane citokromima P450 od kojih su po prvi put opisani metaboliti flavona, 7-hidroksiflavona, galangina, 3,7-dihidroksiflavona, 6-hidroksiflavona, akacetina i tangeretina.

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

Rad sadrži: 76 stranica, 63 grafičkih prikaza, 20 tablica i 88 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Flavonoidi, metabolizam, citokrom P450

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. Ana Mornar Turk, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: lipanj 2017.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Medicinal Chemistry
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

METABOLISM OF FLAVONOID AGLYCONES MEDIATED BY CYTOKROM P450 ENZYMES

Mirela Lozić

SUMMARY

Flavonoids are a heterogeneous family of low molecular weight polyphenolic compounds synthesized in plants as secondary plant metabolites. They belong to phytochemicals and are found in fruits and vegetables. Regular consumption of individual flavonoids shows the potential for human health modification in helping to prevent chronic and degenerative diseases. Their numerous pharmacological effects make them interesting for research in the field of pharmacy. Mechanisms of their numerous biological effects are still largely unknown. Cytochromes P450 are undoubtedly the most important enzymes that catalyze the biotransformation of drugs. By sequencing the human genome, it has been found that there are 57 cytochrome P450 enzymes in humans. The field of biochemistry and cytochrome P450 enzymology remains attractive, with many open questions to be addressed, including the metabolism of flavonoids researched on a relatively small number of flavonoids. The aim of this paper is to determine in vitro the cytochromes P450 responsible for the biotransformation of 30 selected flavonoids using human liver microsomes. Reverse-phase high performance liquid chromatography with a mass spectrometer as a detector was used as the method of screening. Of the analyzed 30 flavonoids, 11 showed the tendency of biotransformation mediated by cytochrome P450. The flavonoids whose metabolisms were described for the first time are: flavone, 7-hydroxyflavone, galangine, 3,7-dihydroxyflavone, 6-hydroxyflavone, acacetin and tangeretine metabolites.

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

Thesis includes: 76 pages, 63 figures, 20 tables and 88 references. Original is in Croatian language.

Keywords: flavonoids, metabolism, cytochrome P450

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
Ana Mornar Turk, Ph.D., *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: June 2017.