Metabolizam flavonoida posredovan enzimima citokrom P450 2C potporodice

Tadić, Martina

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:613194

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

Martina Tadić

Metabolizam flavonoida posredovan enzimima citokrom P450 2C potporodice

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2018.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju *Biokemija lijekova* Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen je na Zavodu za farmaceutsku kemiju, u suradnji s Agencijom za lijekove i medicinske proizvode, pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Mirze Bojić.

ZAHVALA

Želim se zahvaliti mentoru, doc. dr. sc. Mirzi Bojiću, na vodstvu i savjetima prilikom izrade ovog diplomskog rada, te Goranu Benkoviću, mag. pharm., na stručnoj pomoći.
Također, zahvaljujem se svojoj obitelji koja mi je sve ovo omogućila te pružala potporu svih ovih godina. Zahvaljujem se i kolegici Božici, te ostalim prijateljima koji su mi olakšali pisanje ovog rada.

SADRŽAJ

1. UVOD 1

1.1 FLAVONOIDI 1

1.2 ENZIMI CITOKROM P450 6

1.2.1 Polimorfizam enzima citokrom P450 8

1.2.2 2C potporodica enzima citokrom P450 9

1.2.3 Induktori/inhibitori CYP 2C potporodice enzima 12

1.3 METODA TEKUĆINSKE KROMATOGRAFIJE SPREGNUTE SA SPEKTROMETRIJOM MASA 14

2. OBRAZLOŽENJE TEME 17

3. MATERIJALI I METODE 18

3.1 Materijali 18

3.2 Aparatura 19

3.3 Metoda 19

4. REZULTATI I RASPRAVA 22

4.1 Rezultati analize metabolizma galangina 23

4.2 Rezultati analize metabolizma 7-hidroksiflavona 28

5. ZAKLJUČCI 31

6. LITERATURA 33

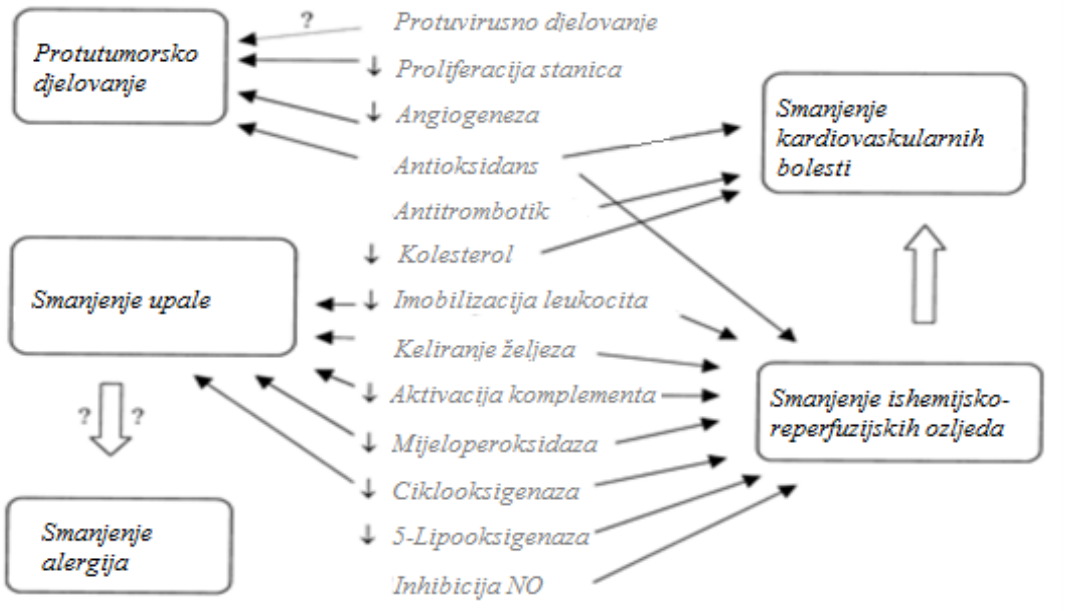
7. SAŽETAK/SUMMARY 36

8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD

1. UVOD

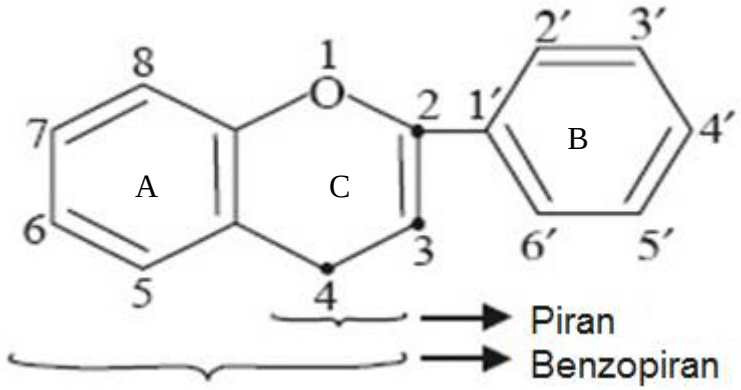
1.1 FLAVONOIDI

Flavonoidi su prirodni polifenolni spojevi koji se mogu naći u voću, povrću, žitaricama, kori, korijenju, cvijeću te pićima poput čaja i vina (Middleton, 1998). Otkrićem „francuskog paradoksa“, odnosno pojave da se kod Francuza bilježi manja stopa smrtnosti i obolijevanja od kardiovaskularnih bolesti, iako njihova prehrana u prosjeku sadrži veću količinu zasićenih masnih kiselina nego prosječna prehrana stanovništva ostalih razvijenih zemalja, flavonoidi su se našli u središtu mnogih istraživanja (Formica i Regelson, 1995). Smatra se da su za velik udio tih učinaka odgovorni spojevi sadržani u vinu, to jest flavonoidi. Zato se danas flavonoidi smatraju neophodnim komponentama u raznim farmaceutskim, medicinskim i kozmetičkim primjenama (Slika 1). To se pripisuje njihovim antioksidativnim, protuupalnim, protu-virusnim, anti-mutagenim i anti-kancerogenim svojstvima povezanim s njihovom sposobnošću moduliranja funkcija ključnih staničnih enzima, poput ksantin-oksidaza (XO), ciklooksigenaza (COX), lipoksigenaza i fosfoinozitid 3-kinaza (Panche i sur., 2016).



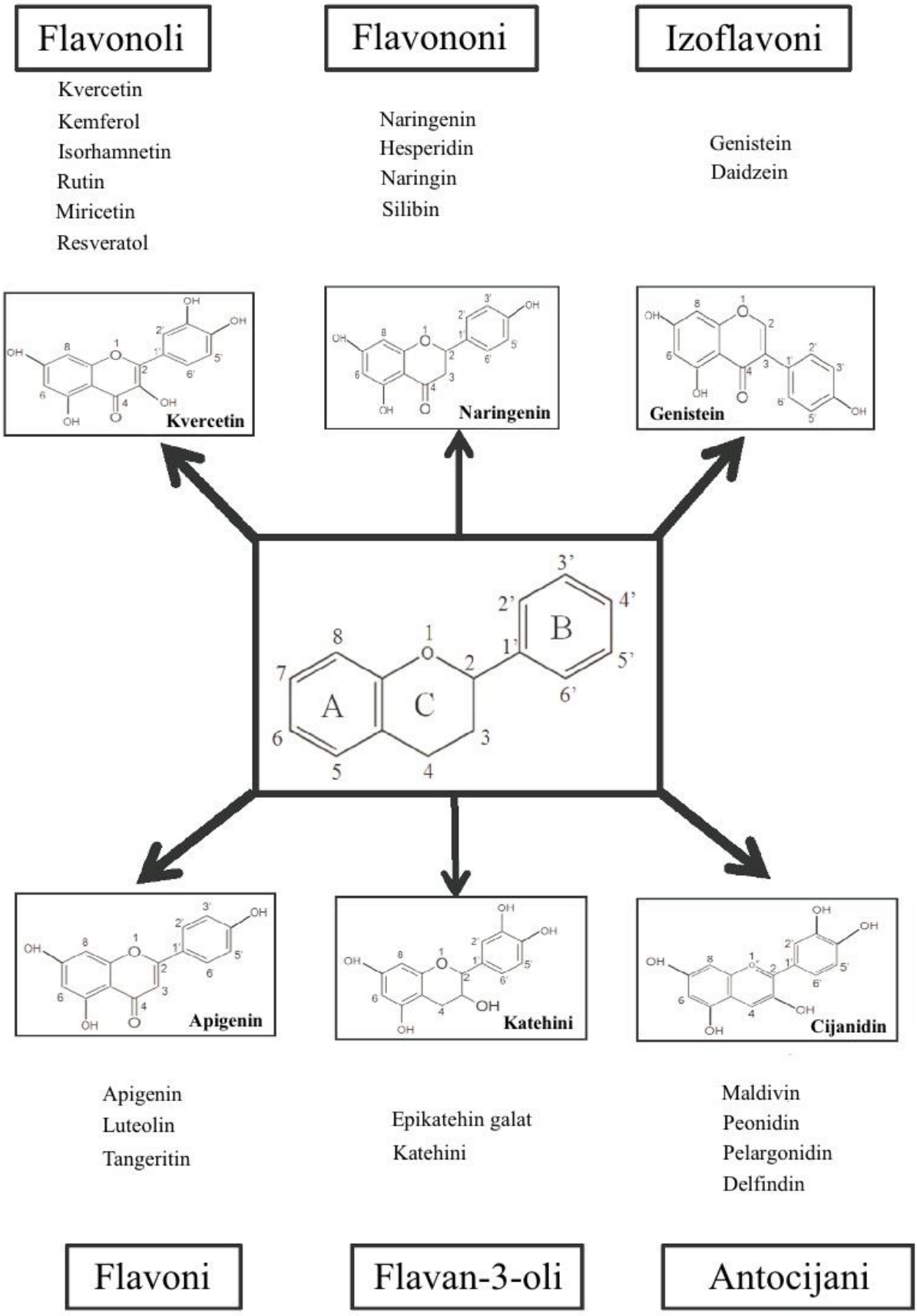
Slika 1. Veza između mehanizama djelovanja flavonoida i njihov učinak na bolesti (Nijveldt i sur., 2001).

Flavonoidi su heterogena skupina spojeva čija osnovna struktura je kostur difenilpropana. Naime, dva benzenska prstena povezana su s tri lanca ugljika koji tvori zatvoreni piranski prsten s benzenskim prstenom (Slika 2). Zbog toga se njihova struktura također naziva C6-C3-C6 (www.tuscany-diet.net).



Slika 2. Struktura flavonoida (preuzeto s epharmacognosy.com).

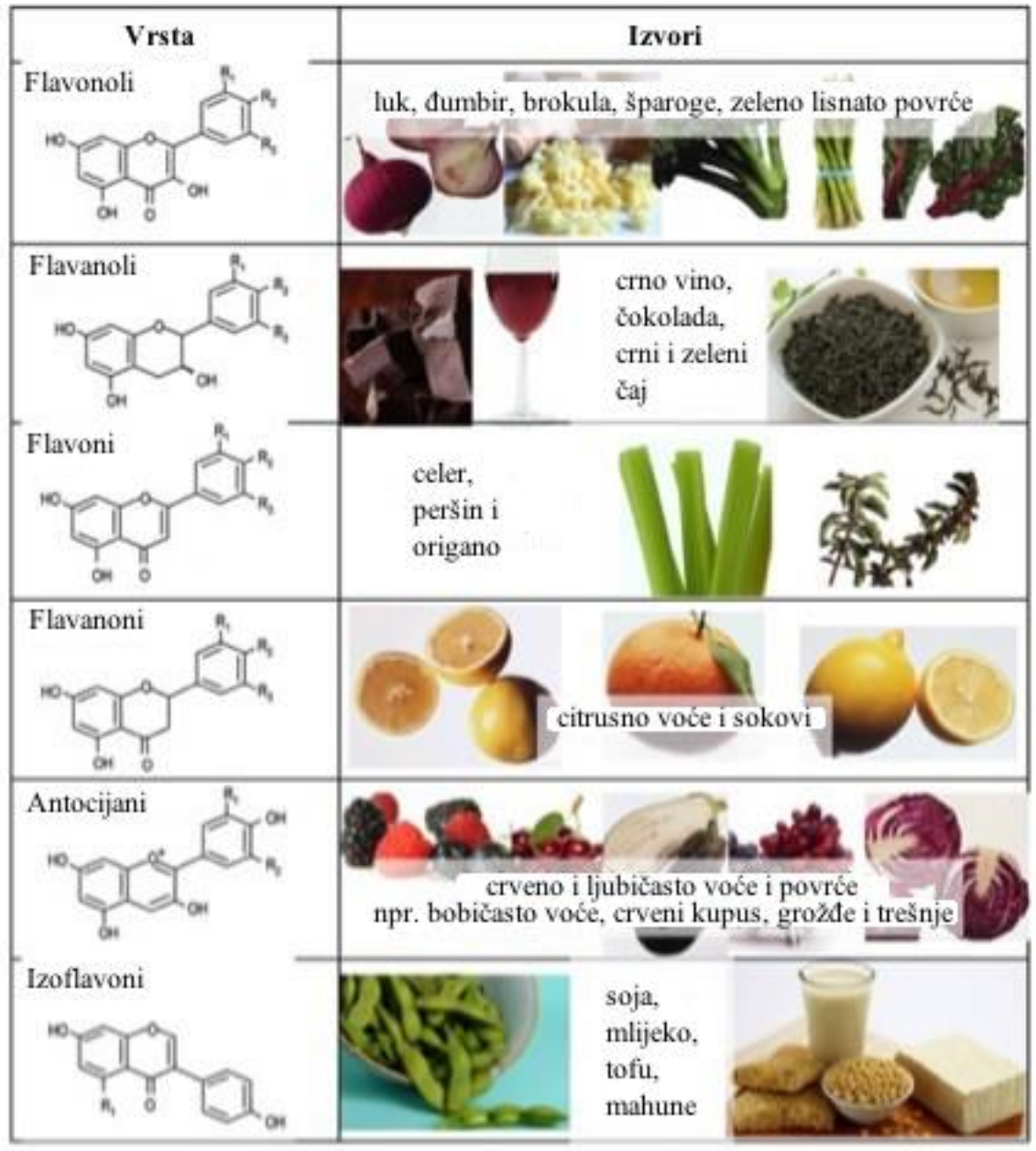
Flavonoidi se mogu podijeliti u različite podskupine ovisno o ugljiku na prstenu C na kojem je vezan prsten B, stupnju nezasićenosti te oksidaciji C prstena (Slika 3). Flavonoidi u kojima je B prsten povezan na položaju 3 prstena C nazivaju se izoflavoni. Oni u kojima je B prsten povezan na poziciji 4 nazivaju se neoflavonoidi, dok oni kod kojih je prsten B vezan na položaju 2 mogu se dalje podijeliti u nekoliko podskupina na osnovi strukturnih značajki prstena C. Ove podskupine su: flavoni, flavonoli, flavanoni, flavanonoli, flavanoli ili katehini, antocijanini i kalkoni (Panche i sur., 2016).



Slika 3. Vrste flavonoida (preuzeto s www.researchgate.net).

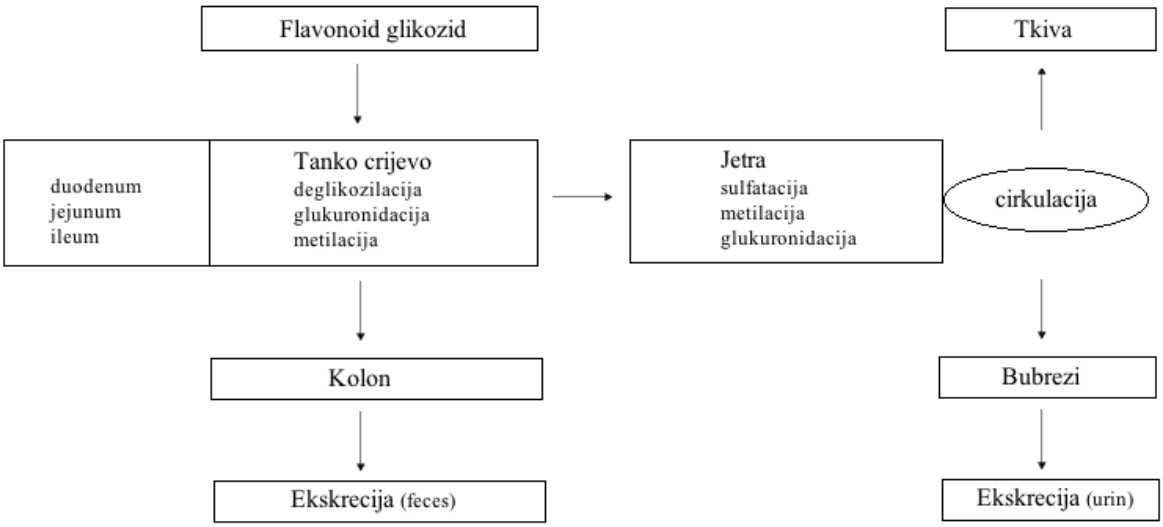
Ove podgrupe flavonoida imaju jedinstvene prirodne izvore, kao što je prikazano u Tablici 1.

Tablica 1. Prirodni izvori flavonoida (preuzeto s blog.aicr.org).



Flavonoidi se uglavnom javljaju u glikoziliranom obliku. U tankom crijevu i debelom crijevu djelomično su hidrolizirani na njihove aglikone enzimima bakterijskog porijekla (Slika 4.). Njihovi farmakološki učinci ovisni su o broju i položaju hidroksilnih skupina u molekuli. Ove skupine su uglavnom konjugirane da tvore O-glukuronide, sulfat-estere i O-metil etere. Biotransformacija flavonoida utječe na njihova biološka svojstva, a time posljedično i na

zdravlje čovjeka. Polifenoli su gotovo u cijelosti konjugirani. Oksidacija je manje zastupljen metabolički put, ali također može imati značajan utjecaj na svojstva flavonoida (Čović i sur., 2009). Za biotransformaciju flavonoida ključna je jetra gdje se odvija većina metaboličkih reakcija, a kod nekih je dokazano da su za to odgovorni upravo jetreni enzimi citokromi P450 (Viskupičova i sur., 2008).



Slika 4. Pretpostavljena sudbina flavonoida u organizmu (Rice-Evans, 2001).

1.2 ENZIMI CITOKROM P450

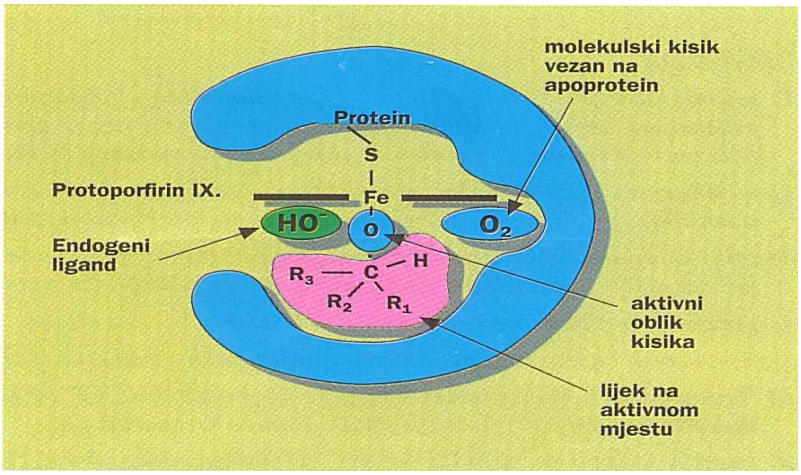
Citokrom P450 (P450) enzimi predmet su velikog broja istraživanja zbog njihove važnosti za metabolizam lijekova, steroida i karcinogenih spojeva. Njih 57 prisutno je u ljudskom organizmu te su uključeni u oko tri četvrtine metabolizma svih lijekova na tržištu. Uloga pojedinih P450 može se predvidjeti tijekom razvoja lijeka, a mnoge interakcije lijekova shvaćaju se u kontekstu P450 (Guengerich, 2005). Nazvani su tako jer su vezani za membrane unutar stanice (cito) i sadrže pigment hema (krom i P) koji apsorbira svjetlost na valnoj duljini od 450 nm kada je izložen ugljičnom monoksidu u reduciranim uvjetima (Weinshilboum, 2003; Wilkinson, 2005).

Citokrom P450 zajedničko je ime za velik broj različitih hem-tiolatnih enzima koji su prisutni u različitim oblicima života: biljkama, insektima, ribama, sisavcima, mikroorganizmima te virusima. Po svom djelovanju tipične su monoksigenaze, odnosno iz molekulskog kisika jedan atom kisika unose u molekulu organskog supstrata, dok drugi reduciraju u oksidacijski stupanj vode. Također, mogu djelovati i kao oksidaze, preoksidaze, a kataliziraju i neke reduktivne reakcije (Rendić i Medić-Šarić, 2013).

Opća jednadžba monooksigenacije posredovana enzimima citokroma P450:

$$\text{Supstrat (RH)} + O_2 + \text{NADPH} + H+ \rightarrow \text{Produkt (ROH)} + H_2O + \text{NADP+}$$

CYP enzimi su hemproteini koji sadrže između 400 do 500 aminokiselinskih ostatka i jednu hemprotetsku skupinu u aktivnom mjestu (Slika 5). Apoprotein je preko cisteinskog ostatka vezan na atom željeza iz hemske skupine (Manikandan, 2018; Rendić i Medić-Šarić, 2013).



Slika 5. Shematski prikaz aktivnog mjesta enzima CYP P450 (Rendić i Medić-Šarić, 2013).

Enzimi citokroma P450 primarno se nalaze u jetrenim stanicama, no također se mogu naći i u tankom crijevu, plućima, placenti i bubrezima (Slaughter i Edwards, 1995). Unutar stanica, smješteni su u endoplazmatskom retikulumu (strukturi koja je uključena u procesiranje i transport proteina) i mithondrijima (središta stanica za proizvodnju energije). Enzimi koji se nalaze u mitohondrijima uglavnom su uključeni u sintezu i metabolizam unutarnjih tvari, dok enzimi u endoplazmatskom retikulumu obično metaboliziraju vanjske tvari, prvenstveno lijekove i zagađivače okoliša (Guengerich, 2008).

Otkrićem strukture gena i proteina CYP enzima omogućena je njihova podjela na porodice i potporodice. Svaki gen citokroma P450 označava se sa *CYP*, što ukazuje da je dio obitelji gena citokroma P450, dok superporodica enzima ima oznaku CYP. Enzimi unutar superporodice se dalje klasificiraju, na temelju sličnosti aminokiselinskog slijeda u proteinskom lancu, dodatkom određenog broja povezanog sa skupinom unutar obitelji gena, slovom koje označava potporodicu te brojem dodijeljenim specifičnim genima unutar potporodice (www.ghr.nlm.nih.gov), kako je prikazano u Tablici 2.

Tablica 2. Klasifikacija enzima citokrom P450 (Rendić i Medić-Šarić, 2013).

Superporodica	CYP	Sličnost primarne strukture
porodica	CYP2	>= 40 posto
potporodica	CYP2C	>= 55
enzim	CYP2C19	>= 98

1.2.1 Polimorfizam enzima citokrom P450

Neki ljudi mogu imati pretjerani odgovor ili biti u potpunosti bez odgovora na neke lijekove (npr. beta-blokatori/tramadol). To je zato što metabolizam putem enzima CYP pokazuje genetsku varijabilnost (polimorfizam) koji utječe na odgovor bolesnika na određeni lijek (Wilkinson, 2005). Polimorfizam se javlja kada se neka osobina, u istoj populaciji određene vrste pojavljuje u dva ili više jasno različitih fenotipa. Drugim riječima, pojavljuje se u više od jedne forme ili morfe (Ford, 1977).

Specifičan gen kodira svaki CYP enzim. Svaka osoba naslijedi jedan genetički alel od svakog roditelja. Aleli se nazivaju "divlji tip" ili "varijabilni", pri čemu se divlji tip najčešće pojavljuje u općoj populaciji. "Normalni" metabolizator primio je dvije kopije alela divljeg tipa. Polimorfizam nastaje kada varijabilni alel zamijeni jedan ili oba alela divljeg tipa. Varijabilni aleli obično kodiraju enzim CYP koji ima smanjenu ili nikakvu aktivnost. Osobe s dvije kopije varijabilnih alela su "siromašni" metabolizatori, dok oni s jednim divljem tipom i jednim varijantnim alelom imaju smanjenu enzimsku aktivnost. Također, neke osobe nasljeđuju višestruke kopije alela divljeg tipa, što rezultira višom aktivnošću enzima. Ovaj fenotip naziva se ultrabrzi metabolizator (Wilkinson, 2005; Phillips i sur., 2001).

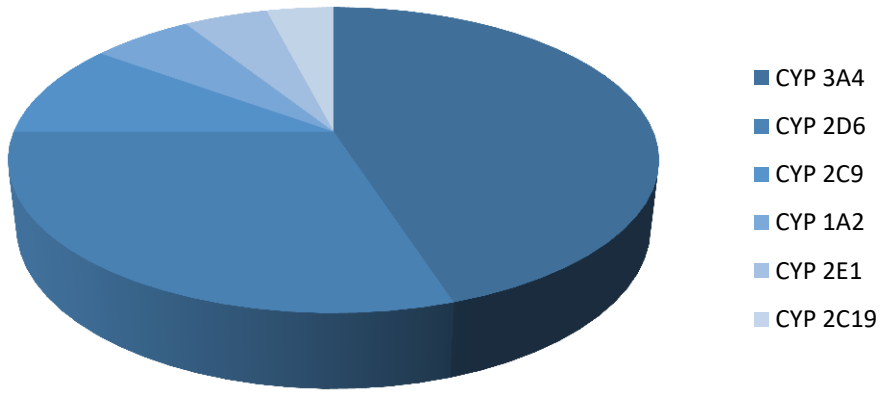
1.2.2 2C potporodica enzima citokrom P450

Među glavnim izoformama CYP enzima, potporodica 2C klinički je značajna jer metabolizira približno 20% svih klinički primijenjenih lijekova (Slika 6) te predstavlja nekoliko varijabilnih alela što dovodi do nuspojava ili promjena u djelotvornosti lijeka (Isvoran i sur., 2017).

Tablica 3. Klasifikacija enzima potporodice CYP2C (Rendić i Medić-Šarić, 2013).

Porodica (supstrati)	Potporodica	Enzimi
CYP2 (lijekovi/ksenobiotici, steroidi, vitamin D)	CYP2C	CYP2C8 CYP2C9 CYP2C18 CYP2C19

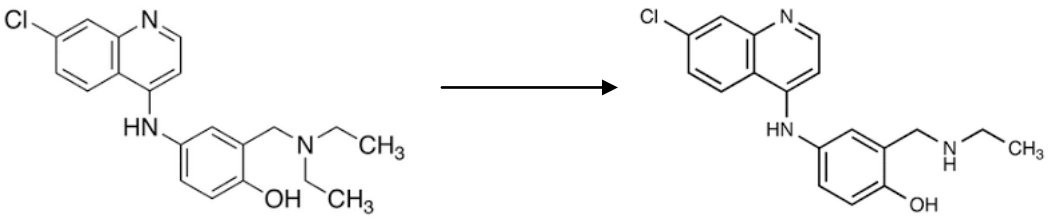
Enzimi unutar potporodice 2C, prikazani u Tablici 3, imaju interindividualne varijabilnosti te se razlikuju svojim funkcionalnim i kliničkim utjecajem, strukturnim osnovama te molekularnim mehanizmima kojima utječu na metabolizam lijeka (Isvoran i sur., 2017).
Sustav citokroma P450 pokazuje vrlo visok stupanj polimorfnosti. Za metabolizam lijekova, unutar potporodice 2C, važan je polimorfizam enzima CYP2C9 i CYP2C19. Istraživanja polimorfizama gena CYP rezultirala su brojnim genetičkim informacijama koje nam pomažu u razumijevanju učinaka te toksičnosti brojnih ksenobiotika na ljudski organizam (Goldstein, 2001).



Slika 6. Relativna važnost CYP450 enzima u metabolizmu lijekova.

CYP2C8

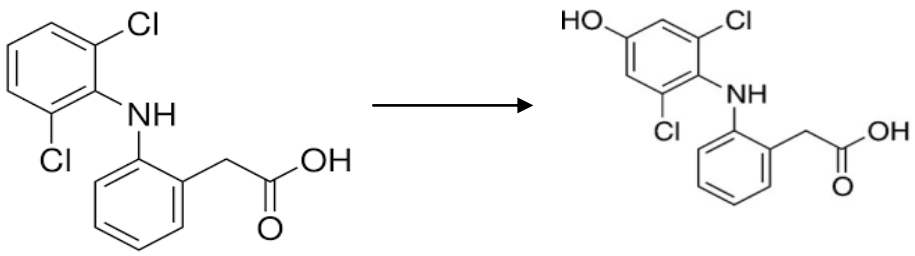
Enzim CYP2C8 ima relativno nisku katalitičku aktivnost prema poznatim supstratima citokroma 2C9 i 2C19. Međutim, bitna mu je uloga u metabolizmu amiodarona, amiodakvina (marker reakcija, Slika 7), arahidonske kiseline, paklitaksela i repaglinida (Guengerich, 2005).



Slika 7. Marker reakcija: N-deetilacija amiodiakina (Rendić i Medić-Šarić, 2013).

CYP2C9

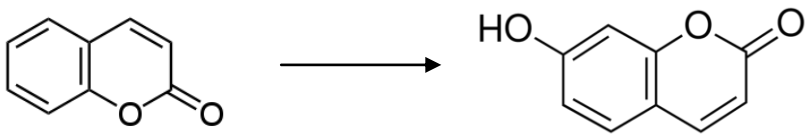
Enzim CYP2C9 je jedan od glavnih enzima uključenih u metabolizam lijekova. Neke tvari prirodno prisutne u organizmu oksidirane su P450 2C9, poput arahidonske i linoleinske kiseline, te vitamina A. Važni lijekovi primarno oksidirani citokromom 2C9 uključuju celekoksib, diklofenak (marker reakcija, Slika 8), ibuprofen, naproksen, tobutamid, varfarin i dr. Klinički je značajan zbog svojih genetskih varijacija (polimorfizam) koje pokazaju bitan aspekt prilikom terapije varfarinom (moguće krvarenje) (Guengerich, 2005).



Slika 8. Marker reakcija: C4-hidroksilacija diklofenaka (Rendić i Medić-Šarić, 2013).

CYP2C18

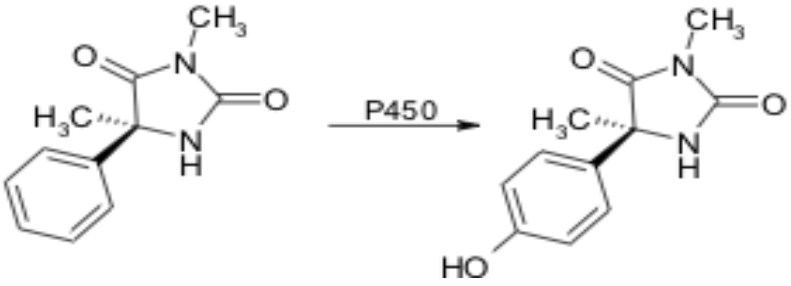
Unutar potporodice enzima 2C, enzim CYP2C18 ima najmanju ekspresiju u jetri. Pokazuje nisku katalitičku aktivnost u metil hidroksilaciji tolbutamida te je aktivan u metabolizmu fenitoina. Zbog svoje ograničene ekspresije nije klinički toliko značajan kao ostali enzimi 2C potporodice (Guengerich, 2005). Enzimska aktivnost CYP2C18 enzima može se izmjeriti C7-hidroksilacijom kumarina (Slika 9).



Slika 9. Reakcija za mjerenje enzimske aktivnosti: C7-hidroksilacija kumarina (Rendić i Medić-Šarić, 2013).

CYP2C19

Enzim CYP2C19 odgovoran je za metabolizam mnogih lijekova. Pojavljuje se u više oblika (polimorfizam), stoga dolazi do klinički značajnih razlika u terapiji CYP2C19 metaboliziranim lijekovima. Lijek omeprazol se metabolizira putem 2C19 te kod osoba sa smanjenom enzimskom aktivnošću pokazuje bolji odgovor na terapiju. Drugi značajni supstrati CYP2C19 su steroidi, progesteron i testosteron te lijek klopidogrel (Guengerich, 2005). Najčešće se kao marker supstrat CYP2C19 primjenjuje S-mefenitoin, pri čemu se prati nastajanje hidroksiliranog oblika (Slika10).



Slika 10. Marker reakcija: hidroksilacija *S*-mefenitoina (Rendić i Medić-Šarić, 2013).

1.2.3 Induktori/inhibitori CYP 2C potporodice enzima

Interakcija lijekova je promjena učinka jednog lijeka zbog istodobne ili prethodne primjene drugog lijeka (Slika 11). Premda su učinci kombiniranih lijekova ponekad blagotvorni, interakcije su većinom neželjene i štetne. Interakcije među lijekova mogu pojačati ili smanjiti očekivane učinke ili pogoršati nuspojave (www.msd-prirucnici.placebo.hr)



Slika 11. Interakcija lijekova (preuzeto s www.interakcije-lijekova.com).

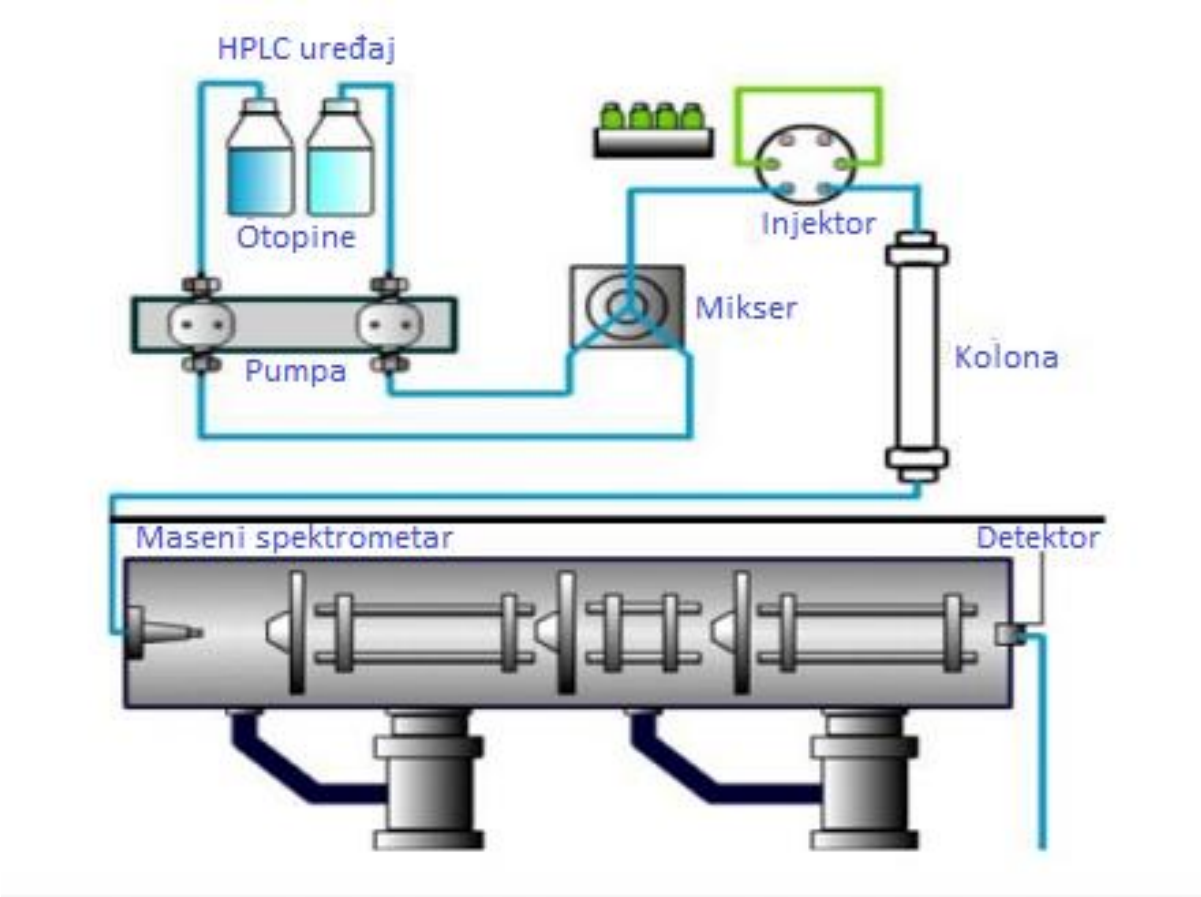
Mnoge interakcije lijekova rezultat su promjena metabolizma CYP. Lijekovi koji uzrokuju interakcije metabolizma CYP nazivaju se inhibitori ili induktori (Tablica 4.) Inhibitori blokiraju metaboličku aktivnost jednog ili više CYP enzima vezanjem na njega. Mjera u kojoj inhibitor utječe na metabolizam lijeka ovisi o čimbenicima kao što su doza i sposobnost inhibitora da se veže na enzim. Inhibitorski učinci obično se javljaju odmah (Sproule i sur., 1997). Induktori, s druge strane, pojačavaju djelovanje enzima što rezultira bržim metaboliziranjem određenog lijeka i u konačnici mogućim slabijim učincima. Za razliku od metaboličke inhibicije, obično postoji odgoda prije povećanja enzimske aktivnosti, ovisno o poluživotu induciranog lijeka (Lynch, 2007).

Tablica 4. Inhibitori i induktori CYP P450 2C potporodice enzima (Guengerich, 2005; Rendić i Di Carlo, 1997).

Enzimi	Inhibitori	Induktori
2C8	Gemfibrozil, paklitaksel, naringenin, kvercetin, kemferol, montelukast, nilotinib	Rifampicin
2C9	Sulfafenazol, amiodaron, flukonazol, fluoksetin, metronidazol, ritonavir, trimpetoprim	Karbamazepin, fenitoin, fenobarbital, rifampicin
2C18	Sulfafenazol	
2C19	Fluoksamin, izoniazid, ritonavir	Karbamazepin, fenitoin, rifampicin

1.3 METODA TEKUĆINSKE KROMATOGRAFIJE SPREGNUTE SA SPEKTROMETRIJOM MASA

Tekućinska kromatografija/spektrometrija masa (LC/MS) moćna je analitička tehnika koja kombinira snagu odvajanja tekućinske kromatografije sa specifičnosću detekcije spektrometrije masa. Tekućinska kromatografija (LC) odvaja komponente uzorka i zatim ih uvodi u spektrometar masa (MS), dok MS stvara i detektira nabijene ione (Slika 12). Podaci LC/MS mogu se koristiti za dobivanje informacija o težini molekule, strukturi, identitetu i količini specifičnih komponenti uzorka. LC/MS danas se može primijeniti u širokom spektru sektora, uključujući biotehnologiju, praćenje stanja okoliša, preradu hrane te u farmaceutskoj, agrokemijskoj i kozmetičkoj industriji (Hewlett-Packard Company, 1998).



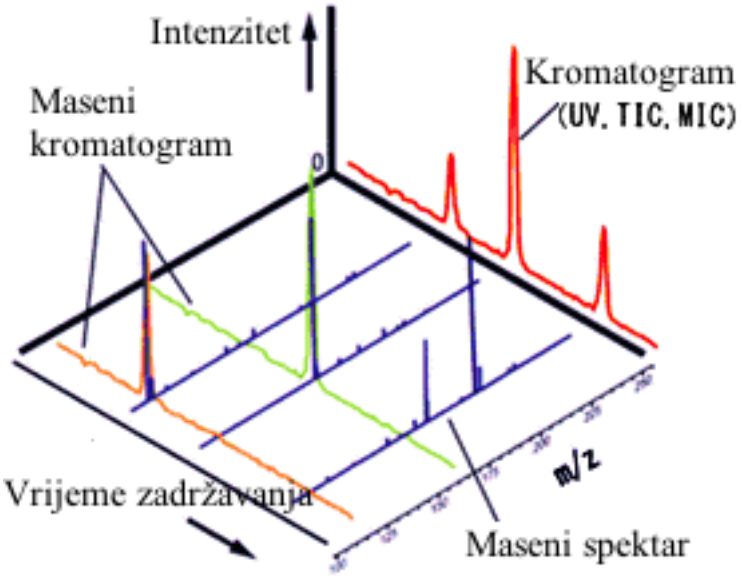
Slika 12. Shematski prikaz LC-MS (preuzeto s www.slideshare.net).

Općenito, tekućinska kromatografija (LC) odvaja komponente uzorka na temelju razlika u njihovom afinitetu (ili čvrstoći zadržavanja) između dviju faza (stacionarne i mobilne). Tekuća mobilna faza pod tlakom prolazi kroz čeličnu kolonu napunjenu česticama stacionarne faze noseći sastavnice uzorka. Mehanizam odjeljivanja ovisi o vrsti stacionarne faze, a može se temeljiti na razdiobi, adsorpciji, ionskoj izmjeni, raspodjeli prema veličini čestica te stereokemijskim interakcijama (Nigović i sur., 2007, www.shimadzu.com).

Detekcija odvojenih komponenti vrši se uporabom UV-Vis, fluorescencijskog, elektrokemijskog ili detektora raspršenja svjetla u uparenom uzorku (ELSD). Takvi detektori kvalitativno određuju tvari na temelju različitih vremena retencije i kvantitativno na temelju vršnog intenziteta i površine vrha. Kromatografija nudi veliku razlučivost, ali precizno kvalitativno i kvantitativno određivanje tvari može biti zahtjevno ako više komponenti eluraju otprilike u isto vrijeme, kao što je to slučaj kod istodobne analize više analita (Nigović i sur., 2007, www.shimadzu.com).

Spektrometrija masa (MS) visoko je osjetljiva tehnika koja ionizira komponente uzorka upotrebom različitih metoda: djelovanjem snopa elektrona, kemijskom ionizacijom, elektrosprej ionizacijom, kemijskom ionizacijom kod atmosferskog tlaka te matriksom potpomognutom ionizacijom laserskom desorpcijom. Zatim, primjenom električnog ili magnetskog polja razdvaja nastale ione u vakuumu na osnovi njihovih omjera masa i naboja (*m/z*) te mjeri intenzitet svakog iona. Budući da dobiveni spektri mogu ukazati na razinu koncentracije iona koji imaju određenu masu, izuzetno je korisna za kvalitativnu analizu. To je zato što je masa specifična za određenu molekulu, a MS omogućuje dobivanje tih informacija izravno. Međutim, to vrijedi samo za mjerenje jedne komponente. Ako se istodobno injektira više komponenti, postaje izuzetno teško analizirati spektre (Nigović i sur., 2007, www.shimadzu.com).

Upravo zbog kombiniranja izvanredne sposobnosti razdvajanja tekućinske kromatografije sa specifičnosću detekcije spektrometrije masa, LC/MS sustavi postali su preferirana metoda analize. Maseni spektri dobiveni na ovaj način, nadopunjuju kvalitativne podatke dobivene tekućinskom kromatografijom (www.shimadzu.com), kako je prikazano na Slici 13.



Slika 13. Kromatogram i maseni spektar (preuzeto s www.shimadzu.com).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Flavonoidi su prvi put otkriveni 1938. godine kada je mađarski nobelovac i znanstvenik Albert Szent-Gyorgyi za njih upotrijebio termin "vitamin P" kako bi ih opisao. Kasnije im je dan današnji naziv. Flavonoidi u posljednje vrijeme privlače puno pozornosti zbog svojih učinaka na zdravlje čovjeka. Pokazalo se da flavonoidi imaju sposobnost hvatanja slobodnih radikala, te tako utječu na antioksidativni status organizma. Zbog toga imaju važnu ulogu u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji kao lijekovi i antioksidansi. Flavonoidi ispovljavaju i širok niz drugih biokemijskih učinaka te su jedni od najkorisnijih fitokemikalija pronađenih u hrani. Pokazalo se da flavonoidi imaju antibakterijsko, sedativno, antialergijsko, antimutageno, antiviralno i druga djelovanja (Kazazić, 2004).

Ljudska CYP superporodica sadrži 57 funkcionalnih gena, a članovi porodica 1, 2 i 3 igraju važnu ulogu u metabolizmu terapijskih lijekova, drugih ksenobiotika i nekih endogenih spojeva. Polimorfizmi CYP2D6, 2C19 i 2C9 predstavljaju najčešće promjene u metabolizmu lijekova faze I, budući da je gotovo 80% lijekova u upotrebi danas metabolizirano ovim enzimima (Zhou i sur., 2009).

Zbog pozitivnih učinaka na zdravlje flavonoidi su izuzetno važan dio ljudske prehrane. Ljudi normalnom dnevnom prehranom osobito voćem i povrćem unose 1-2 g flavonoida. Bioraspoloživost, metabolizam i biološka aktivnost flavonoida ovise o strukturi, ukupnom broju hidroksilnih skupina i supstituciji funkcionalnih grupa unutar njihove nuklearne strukture (Kumar i Pandley, 2013). Flavonoidi se velikim dijelom metaboliziraju hepatički preko citokroma P450 te njihovi metaboliti mogi imati značajan utjecaj na njihove učinke kao i moguće interakcije s drugim spojevima i lijekovima.

Zbog mnogobrojnih pozitivnih učinaka flavonoida, a sve veće učestalosti određenih bolesti na koje oni utječu, istraživanja apsorpcije flavonoida, distribucije, metabolizma i eliminacije postaju predmetom velikog broja znanstvenih radova.

Cilj ovog rada je odrediti koji flavonoidi se metaboliziraju preko potporodice enzima 2C te koji su oblici flavonoida najzastupljeniji, izvorni spoj ili metaboliti, koristeći rekombinante jetrene citokrome P450 i metodu LC/MS. Rezultatima želimo pridonijeti daljnjim istraživanjima, maksimalizirati pozitivne učinke flavonoida te smanjiti njihove moguće negativne interakcije s drugim lijekovima.

3. MATERIJALI I METODE

3.1 Materijali

U ovom istraživanju korišteno je 11 flavonoida čiji je metabolizam preko citokroma P450 prethodno dokazan analizom 30 flavonoida pomoću humanih jetrenim mikrosoma (HML) kao izvora citokroma P450.

- 3,7-Dihidroksiflavon
- 6-Hidroksiflavon
- 7-Hidroksiflavon
- Acacetin
- Apigenin
- Flavon
- Galangin
- Kemferol
- Naringenin
- Sakuranetin
- Tangerentin

Ostali reagensi:

- Kalijev fosfat
- Glukoza 6-fosfat
- $NADP^+$
- Glukoza-6-fosfat dehidrogenaza
- Metanol
- Metilen klorid
- Acetonitril
- Natrijev karbonat, Na_2CO_3
- Natrijev klorid
- Amonijev acetat

3.2 Aparatura

Ovaj eksperiment napravljen je u laboratoriju, prilikom čega je korištena dolje navedena aparatura:

- Epruvete
- Staklene čaše
- Pipete
- Mikropipete
- Vodena kupelj, 37°
- Vortex uređaj
- Sustav HPLC-MS

3.3 Metoda

Priprema sustava za inkubaciju

- Pripremimo inkubacijsku otopinu 0,05 M kalijevog fosfatnog pufera (pH 7,4, 10µl), bakulosoma koji sadrže 10 pmol P450 (10 µl), supstrata (2 µl) te vode (148 µl).
- U zasebnim bočicama inkubiramo otopinu za inkubaciju i NADPH generirajući sustav u vodenoj kupelji na temperaturi od 37 ° C kroz 3 min.

Inkubacija

- Dodamo 30 µl NADPH generirajućeg sustava u otopinu za inkubaciju kako bi započela reakcija.
- Ostavimo uzorke da se inkubiraju 30 minuta na temperaturi od 37 ° C.

Zaustavljanje reakcije

- Nakon 30 minuta inkubacije na temperaturi od 37 °C, reakciju zaustavljamo dodatkom acetonitrila (120 µl).
- Reakcijsku smjesu centrifugiramo 20 minuta (1000 okr/min).

HPLC-MS analiza

- Centrifugiranjem smo odvojili inaktivirane ostatke HLM od tekuće faze. Budući da djelovanjem citokroma P450 nastaju polarniji metaboliti, za HPLC-MS analizu uzimamo gornji sloj vode i acetonitrila.

HPLC uvjeti:

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

t (min)	0	14	15	16	20
udio B (%)	40	80	80	40	40

MS (Q-TOF) uvjeti:

- Instrument Mode: Low (1700 m/z), High Resolution (4 GHz, HiRes)
- Ion Polarity: Positive
- Izvor (Source): Dual AJS ESI:
  Gas Temperature: 200 °C
  Drying Gas: 8 L/min
  Nebulizer: 40 psig
  Sheath Gas Temperature: 300 °C
  Sheath Gas Flow: 11 L/min
- MS TOF:
  Fragmentor: 175 V
  Skimmer: 65 V
  OCT 1RF Vpp: 750 V
  Collision Energy: 0 V

- Acquisition mode:
  MS
- TOF Spectra:
  Mass range: 100-1000 m/z
- Acquisition rate:
  1 scan/s
- Referent mass:
  m/z = 121.050873
  m/z = 922.009798

Obrada rezultata

- Pri obradi rezultata koristili smo negativnu kontrolu, inkubacijsku smjesu bez generirajućeg sustava, kojom smo pomoću UV kromatograma dokazali da bez generirajućeg sustava ne dolazi do reakcije.
- Ako se na UV kromatogramu uzorka s generirajućim sustavom osim pika supstrata nalazi još neki pik, znači da je došlo do reakcije supstrata preko citokroma 2C, odnosno da su nastali novi metaboliti.
- Masu i molekulsku formulu novonastalih metabolita možemo analizirati pomoću MS kromatograma te zaključiti o kojim je metabolitima te reakciji riječ.

4. REZULTATI I RASPRAVA

11 različitih flavonoida inkubirano je s 3 enzima potporodice 2C kako bi utvrdili koji je citokrom odgovoran za metabolizam određenog flavonoida, odnosno da li je određeni flavonoid uopće metaboliziran potporodicom enzima 2C te koji metaboliti potencijalno nastaju.

U analizu biotransformacije flavonoida preko enzima 2C8, 2C9 i 2C19 uzeto je 11 uzoraka flavonoida koji su prethodnim eksperimentima pokazali metabolizam preko citokroma P450:

Tablica 5. Metabolizam flavonoida posredovan enzimima 2C8, 2C9 i 2C19.

	Enzim		
Flavonoid	2C8	2C9	2C19
Apigenin	*ne*	*ne*	*ne*
Flavon	*ne*	*ne*	*ne*
Kemferol	*ne*	*ne*	*ne*
7-Hidroksiflavon	*ne*	*ne*	*da*
Galangin	*ne*	*ne*	*da*
3,7-Dihidroksiflavon	*ne*	*ne*	*ne*
6-Hidroksiflavon	*ne*	*ne*	*ne*
Akacetin	*ne*	*ne*	*ne*
Naringenin	*ne*	*ne*	*ne*
Sakuranetin	*ne*	*ne*	*ne*
Tangeretin	*ne*	*ne*	*ne*

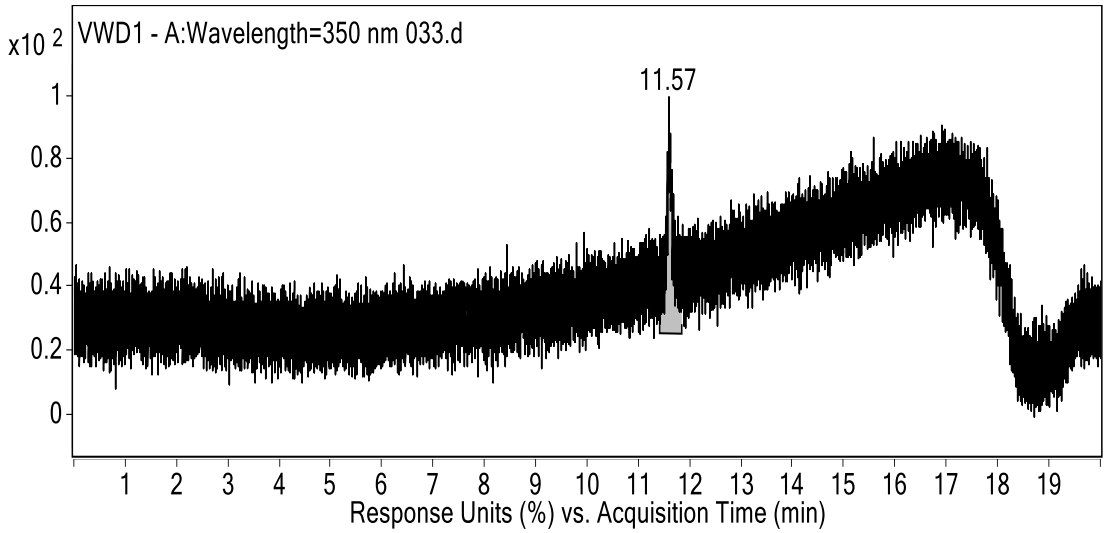
Analizom dobivenih rezultata utvrđeno je da od tri obrađena citokroma potporodice enzima 2C, samo putem enzim 2C19 dolazi do biotransformacije dva promatrana flavonoida, galangina i 7-hidroksiflavona (Tablica 5).

4.1 Rezultati analize metabolizma galangina

Uzorci bez dodanog generirajućeg sustava

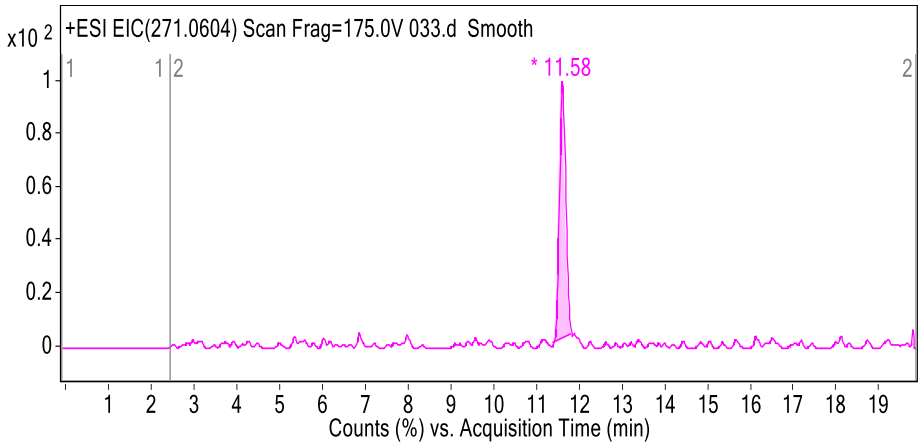
U uzorcima bez dodanog generirajućeg sustava ne dolazi do reakcija jer nisu sadržani koenzimi nužni za aktivnost citokrom enzima, stoga nam oni služe kao kontrola.

Budući da ne dolazi do reakcije bez generirajućeg sustava, UV kromatogram inkubacijske smjese za galangin bez dodanog generirajućeg sustava prikazuje samo pik galangina kojeg smo uzeli u analizu s vremenom zadržavanja od 11,57 min (Slika 14).



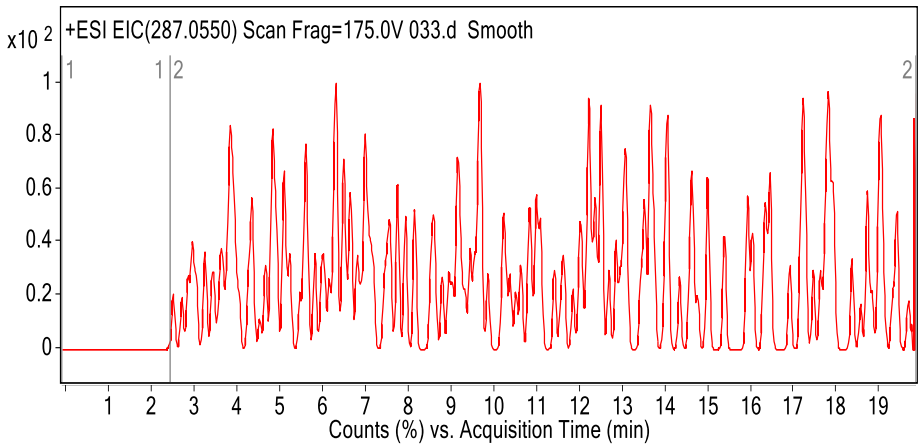
Slika 14. UV kromatogram inkubacijske smjese za galangin bez dodanog generirajućeg sustava.

Kromatogram izdvojenog iona (eng. *Extracted Ion Chromatogram*, EIC) galangina (*m/z*=271,0604) inkubacijske smjese za galangin bez dodanog generirajućeg sustava daje nam podatke o molekulskoj masi te strukturi galangina (Slika 15). Analizom je određeno vrijeme zadržavanja od 11,59 minuta, te molekulska masa od 270,0531.



Slika 15. Kromatogram izdvojenog iona galangina (*m/z* = 271,0604) inkubacijske smjese za galangin bez dodanog generirajućeg sustava.

Kromatogram izdvojenog iona kemferola (*m/z* = 287,0550), potencijalnog metabolita galangina, inkubacijske smjese za galangin bez dodanog generirajućeg sustava, ne prikazuje nam pik na poziciji karakterističnoj za kemferol, budući da nije moglo doći do reakcije jer nisu prisutne koenzimi potrebni za aktivaciju enzima (Slika 16).

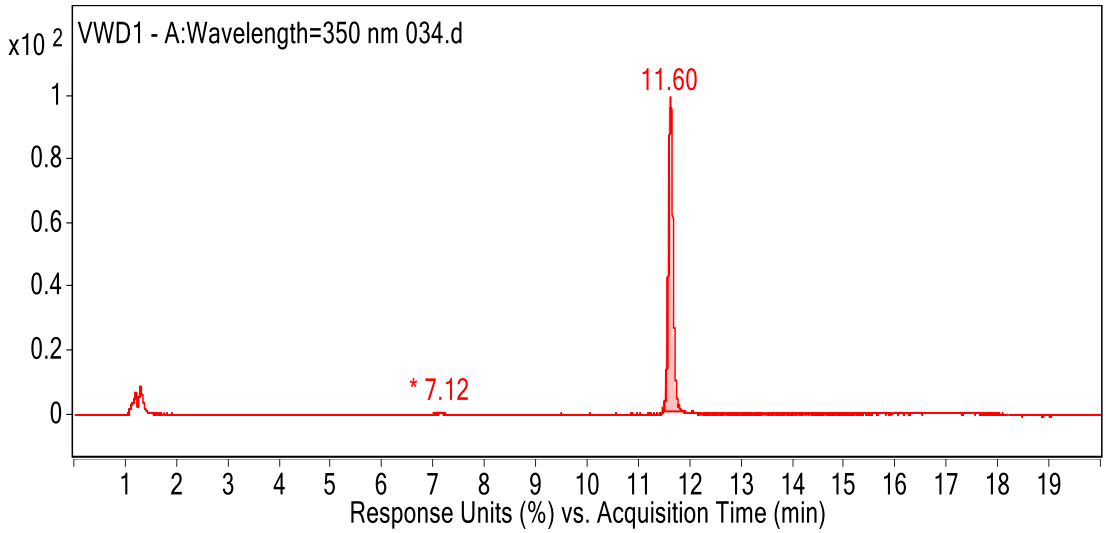


Slika 16. Kromatogram izdvojenog iona kemferola (*m/z* = 287,0550) inkubacijske smjese za galangin bez dodanog generirajućeg sustava.

Uzorci s dodanim generirajućim sustavom

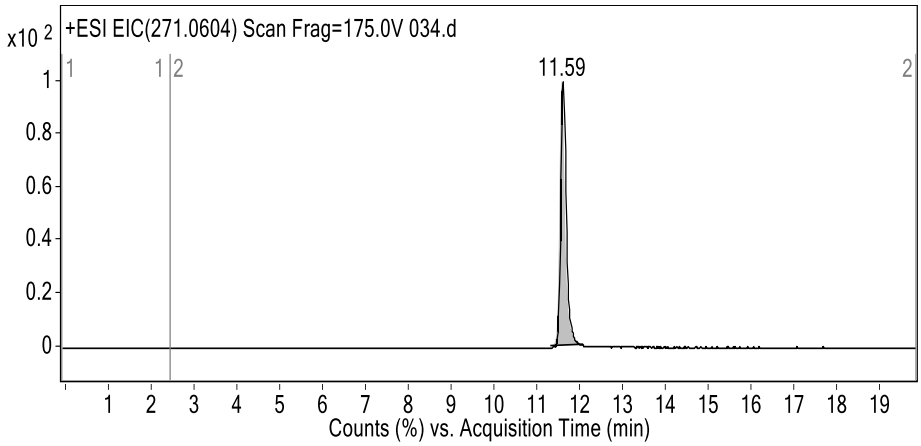
Generirajući sustav sadrži $NADP^+$, glukozu-6-fosfat i glukoza-6-fosfat dehidrogenazu koji su potrebni za djelovanje enzima citokroma P450 jer služe za generiranje koenzima citokroma P450 odnosno NADPH. Stoga, u uzorcima s dodanim generirajućim sustavom može doći do biotransformacije, ukoliko je ona posredovana ispitivanim enzimom.

Analizom UV kromatograma inkubacijske smjese za galangin s dodanim generirajućim sustavom uočavamo dva pika (Slika 17). Pik koji ima retencijsko vrijeme 11,60 min odgovara piku standarda za galargin, dok pik s retencijskim vremenom od 7,12 minuta potencijalni je metabolit biotransformacije galangina.



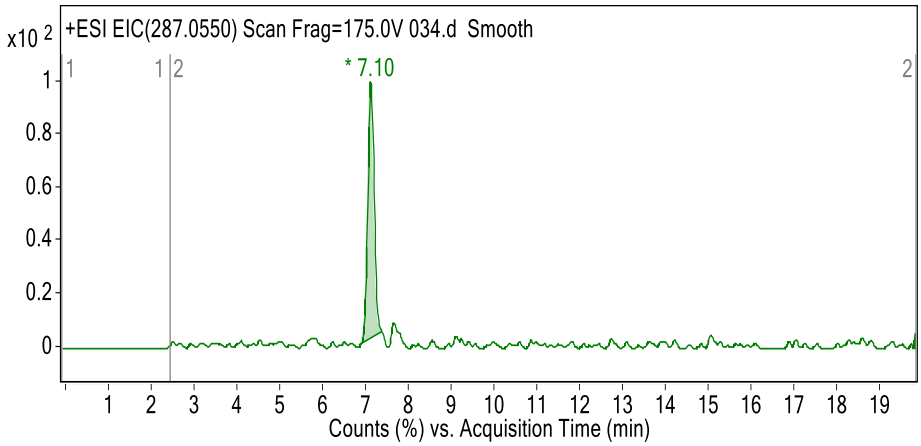
Slika 17. UV kromatogram inkubacijske smjese za galangin s dodanim generirajućim sustavom.

Kromatogram izdvojenog iona galangina (*m/z* = 271,0604) inkubacijske smjese za galangin s dodanim generirajućim sustavom odgovara kromatogramu izdvojenog iona galangina (*m/z* = 271,0604) inkubacijske smjese za galangin bez dodanog generirajućeg sustava (slika 15 i 18).



Slika 18. Kromatogram izdvojenog iona galangina (*m/z* = 271,0604) inkubacijske smjese za galangin s dodanim generirajućim sustavom.

Kromatogram izdvojenog iona kemferola (*m/z* = 287,0550), inkubacijske smjese za galangin s dodanim generirajućim sustavom, prikazuje pik na poziciji karakterističnoj za kemferol (Slika 19). To znači da je došlo do metabolizma preko citokroma 2C19.

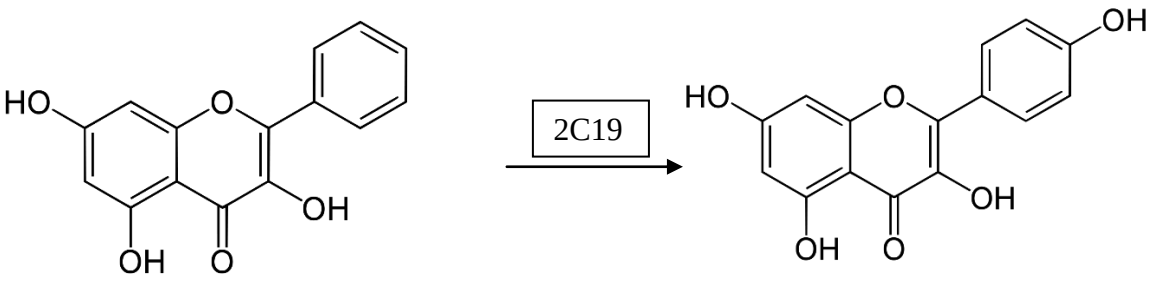


Slika 19. Kromatogram izdvojenog iona kemferola (*m/z* = 287,0550) inkubacijske smjese za galangin s dodanim generirajućim sustavom.

Iz kromatograma izdvojenog iona kemferola (*m/z* = 287,0550) inkubacijske smjese za galangin s dodanim generirajućim sustavom odredili smo molekulsku masu kemferola koja iznosi 286,048. Na temelju razlike molekulskih masa početnog flavonoida galangina i metabolita kemferola, koja iznosi 15,99, možemo zaključiti o kojoj je biotransformaciji riječ. Budući da 15,99 odgovara atomskoj masi kisika, zaključili smo da je metabolizmom

galangina preko citokroma 2C19 došlo do aromatske hidroksilacije, prilikom čega nastaje flavonoid kemferol (Slika 20).

Reakcija biotransformacije flavonoida galangina



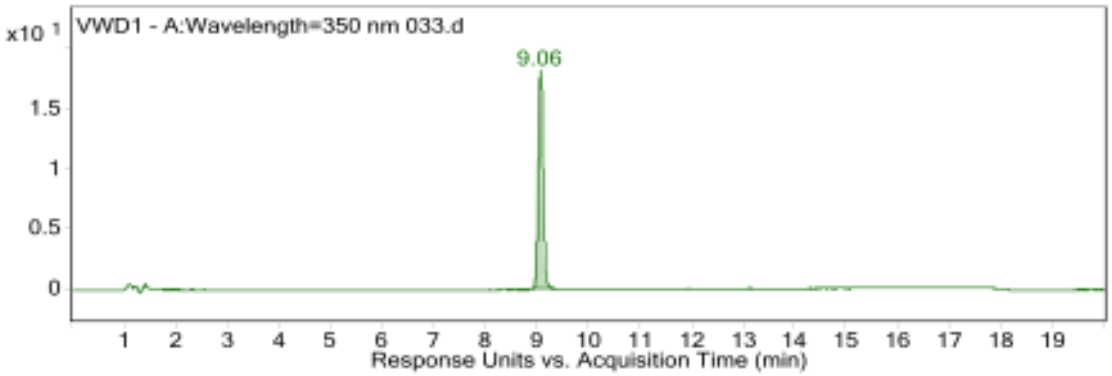
Galangin *Kemferol*

Slika 20. Reakcija aromatske hidroksilacije flavonoida galangina posredovana citokromom P450 2C19.

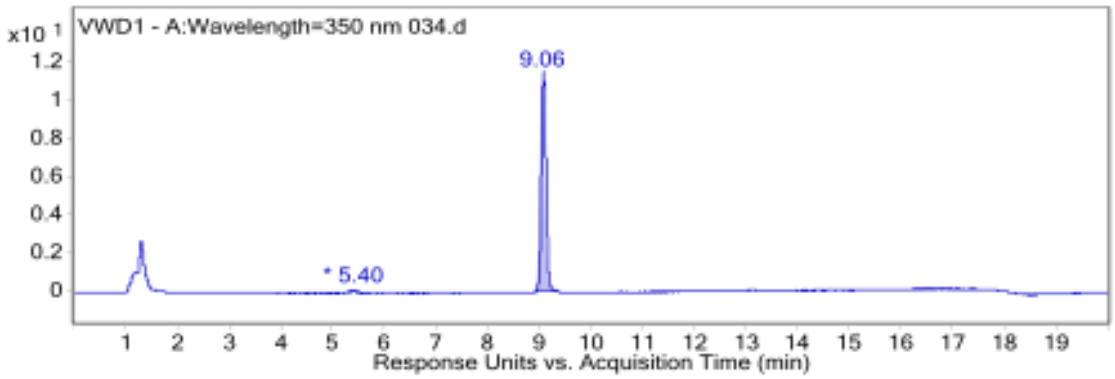
4.2 Rezultati analize metabolizma 7-hidroksiflavona

Osim galangina, drugi flavonoid koji se metabolizira putem citokroma 2C19 je 7-hidroksiflavon. To smo zaključili analizirajući LC-MS kromatograme na isti način kao što je gore navedeno.

Usporedbom UV kromatograma inkubacijske smjese za 7-hidroksiflavon bez dodanog generirajućeg sustava s UV kromatogramom s dodanim generirajućim sustavom, vidimo da je došlo do reakcije zbog pojave novog pika s vremenom zadržavanja od 5,40 minuta (Slika 21 i 22).

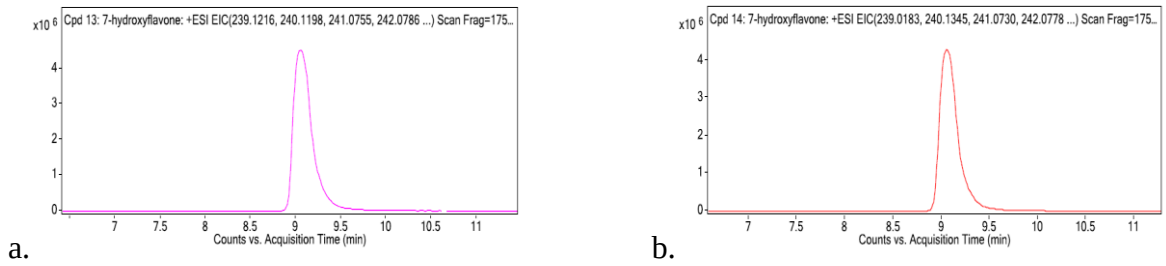


Slika 21. UV kromatogram inkubacijske smjese za 7-hidroksiflavon bez dodanog generirajućeg sustava.



Slika 22. UV kromatogram inkubacijske smjese za 7-hidroksiflavon s dodanim generirajućim sustavom.

Analizom kromatograma izdvojenog iona 7-hidroksiflavona, inkubacijske smjese za 7-hidroksiflavona bez dodanog generirajućeg sustava dobivamo podatke o molekulskoj masi 7-hidroksiflavona koja iznosi 238,063. Taj kromatogram nam je ekvivalentan kromatogramu izdvojenog iona 7-hidroksiflavona inkubacijske smjese za 7-hidroksiflavona s dodanim generirajućim sustavom (Slika 23).

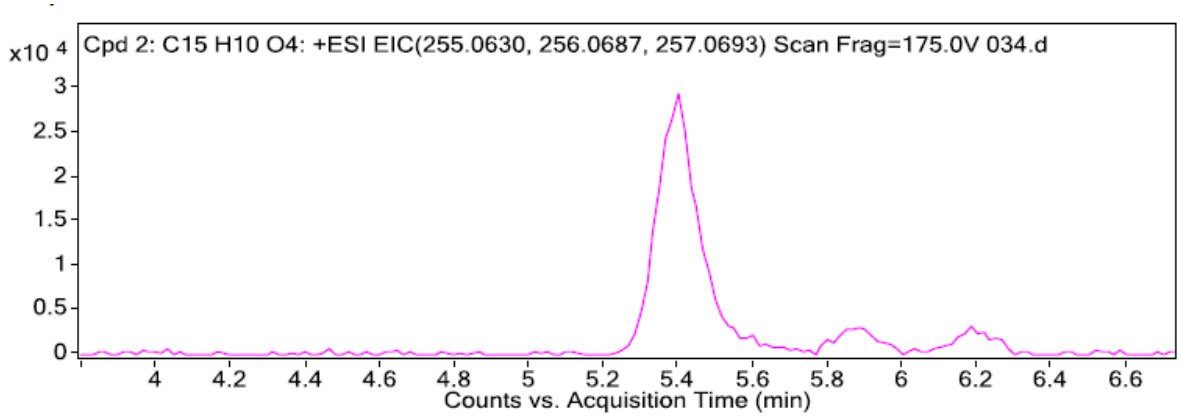


a. b.

Slika 23. Kromatogrami izdvojenog iona 7-hidroksiflavona inkubacijske smjese za 7-hidroksiflavona bez (a) / s (b) dodanim generirajućim sustavom.

Kromatogram izdvojenog iona metabolita 7-hidroksiflavona inkubacijske smjese za 7-hidroksiflavon bez dodanog generirajućeg sustava ne sadrži pik potencijalnog metabolita, budući da bez generirajućeg sustava nije moglo doći do reakcije.

Kromatogram izdvojenog iona metabolita 7-hidroksiflavona inkubacijske smjese za 7-hidroksiflavon s dodanim generirajućim sustavom sadrži pik pomoću kojem smo dobili podatke o strukturi i masi metabolita 7-hidroksiflavona (Slika 24).



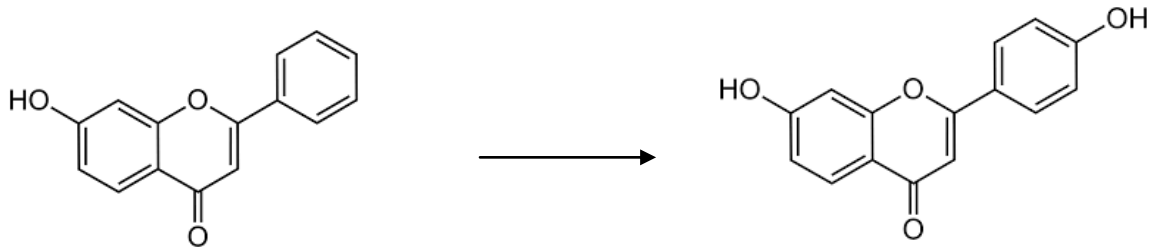
Slika 24. Kromatogram izdvojenog iona metabolita 7-hidroksiflavona inkubacijske smjese za 7-hidroksiflavona s dodanim generirajućim sustavom.

Molekulska masa potencijalnog metabolita flavonoida 7-hidroksiflavona iznosi 254,0577 (prikazano u Tablici 6). Budući da razlika molekulske mase tog metabolita i početnog flavonoida uzetog za analizu iznosi 15,99, možemo zaključiti kako se i ovdje, kao i kod galangina, radi o aromatskoj hidroksilaciji (Slika 25).

Tablica 6. Primjer prikaza podataka za 7-hidroksiflavon i njegov metabolit dobivenih LC-MS metodom

Spoj	Vrijeme zadržavanja	Masa	Ime	Formula
C15 H10 O4	5,39	254,0577		C15 H10 O4
7-hidroksiflavon	9,06	238,063	7-hidroksiflavon	C15 H10 O3

Pretpostavljena reakcija biotransformacije flavonoida 7-hidroksiflavona



7-hidroksiflavon *4',7-dihidroksiflavon*

Slika 25. Reakcija aromatske hidroksilacije flavonoida 7-hidroksiflavona posredovana citokromom P450 2C19.

Ova reakcija aromatske hidroksilacije flavonoida 7-hidroksiflavona posredovana enzimom CYP2C19 izuzetno je slaba, odnosno uz maksimalnu koncentraciju nastaje vrlo malo metabolita (ispod 1 %) (prikazano u Tablici 7) te su za metabolizam 7-hidroksiflavona primarno odgovori neki drugi citokrom enzimi (3A4).

Tablica 7. Primjer prikaza podataka UV kromatogram inkubacijske smjese za 7-hidroksiflavon s dodanim generirajućim sustavom

Pik	Početak	RT	Kraj	Visina	Površina	Površina %
1	5,28	5,4	5,53	0,1	0,57	0,76
2	8,92	9,06	9,37	11,59	75,3	100

5. ZAKLJUČCI

Flavonoidi su biljni spojevi, inicijalno poznati pod nazivom 'vitamini P', koji se zbog svojih pozitivnih učinaka na ljudsko zdravlje sve češće proučavaju. Njihovo antioksidirajuće, antitrombotičko, kardioprotektivno djelovanje, kao i učinak na imunosni sustav potaknulo je mnoge znanstvenike da upravo oni postanu predmet njihovih istraživačkih radova.

U okviru ovog diplomskog rada analizirali smo 11 flavonoida koji su prethodnim eksperimentima pokazali metabolizam preko citokroma P450. Cilj nam je bio odrediti koji od proučavanih flavonoida: apigenin, flavon, kemferol, 7-hidroksiflavon, galangin, 3,7-dihidroksiflavon, 6-dihidroksiflavon, akacetin, naringenin, sakuranetin i tangeretin, se metabolizira preko citokroma P450 2C potporodice enzima.

U tu svrhu, koristili smo tekućinsku kromatografiju spregnutu s masenom spektrometrijom (LC-MS). Ova metoda kombinira izuzetnu snagu separacije tekućinske kromatografije sa specifičnošću detekcije određenih masa spektrometrije masa. Separacija uzorka pomoću tekućinske kromatografije omogućava proučavanje točno određenog pika, dok nam spektrometrija masa preko kromatograma izdvojenih iona daje informacije o masi, molekulskoj formuli i strukturi potencijalnih metabolita.

Prilikom provedbe eksperimenta, istovremeno smo inkubirali same flavonoide (bez dodanog generirajućeg sustava), kao i flavonoide s generirajućim sustavom. Samo u uzorcima s dodanim generirajućim sustavom moglo je doći do biotransformacije, budući da su glukoza-6-fosfat dehidrogenaza i $NADP^+$ neophodni za odvijanje reakcije. Ukolilko se proučavani flavonoid ne metabolizira preko određenog enzima 2C potporodice s kojim je inkubiran, UV kromatogrami smjese bez dodanog generirajućeg sustava i onog s dodanim ne smiju se razlikovati, budući da nije došlo do reakcije. To je uočeno kod 9 od 11 proučavanih flavonoida: apigenin, flavon, kemferol, 3,7-dihidroksiflavon, 6-dihidroksiflavon, akacetin, naringenin, sakuranetin i tangeretin.

Od ispitivanih flavonoida, samo su dva pokazala reakcije biotransformacije posredovane citokrom P450 2C potporodicom enzima, i to isključivo enzima CYP2C19. Kod flavonoid galangina uočena su dva pika analizom UV kromatograma inkubacijske smjese za galangin s dodanim generirajućim sustavom. Osnovni pik koji odgovara piku standarda za galargin, te pik potencijalnog metabolita biotransformacije galangina. Pomoću kromatograma izdvojenog iona potencijalnog metabolita galangina (m/z = 287,0550) odredili smo masu, molekulsku

formulu i strukturu metabolita te zaključili iz razlika molekulskih masa kako se radi o reakciji aromatske hidroksilacije prilikom čega nastaje flavonoid kemferol.

Isti postupak ponovili smo kod flavonoida 7-hidroksiflavona koji je također pokazao metabolizam posredovan citokromom CYP2C19. Iz gore navedenih kromatograma zaključili smo da se radi o reakciji aromatske hidroksilacije prilikom čega nastaje metabolit 4',7-dihidroksiflavon. Međutim, ova reakcije je izuzetno slaba, odnosno uz maksimalnu koncentraciju nastaje vrlo malo metabolita (ispod 1 %) te su za metabolizam 7-hidroksiflavona primarno odgovori neki drugi citokrom enzimi.

Istraživanja provedena u okviru ovoga diplomskog rada proširila su saznanja o metabolizmu flavonoida koja su nam izuzetno bitna kako bi se sprječile moguće interakcije lijekova putem citokroma.

6. LITERATURA

Citokrom p450, 2018., https://ghr.nlm.nih.gov/primer/genefamily/cytochromep450, pristupljeno 17.03.2018.

Čović D, Bojić M, Medić-Šarić M. Metabolizam flavonoida i fenolnih kiselina. *Farm glas*, 2009, 65, 693-704.

Flavonoidi: definicija, struktura i klasifikacija, 2014, http://www.tuscany-diet.net/2014/01/22/flavonoids-definition-structure-classification/, pristupljeno 13.03.2018.

Flavonoidni glikozidi, 2012., http://www.epharmacognosy.com/2012/04/flavonoid-glycosides.html, pristupljeno 05.03.2018.

Flavonoidi u hrani, 2015., http://blog.aicr.org/2015/06/10/flavonoids-in-your-foods-where-to-get-them/, pristupljeno 25.04.2018.

Ford EB. The Theory of Genetic Polymorphism. U: Ecological Genetics. Ford EB, urednik, Dordrecht, Springer, 1977, str. 109-136.

Formica JV. Regelson W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food Chemical Toxicol*, 1995, 33(12), 1061-80.

Goldstein JA. Clinical relevance of genetic polymorphisms in the human CYP2C subfamily. *Br J Clin Pharmacol*, 2001, 52 (4), 349-355.

Guengerich FP. Cytochrome P450 and chemical toxicology. *Chem Res Toxicol*, 2008, 21(1), 70-83.

Guengerich FP. Human Cytochrome P450 Enzymes. U: Cytochrome P450 Structure, Mechanism, and Biochemistry, Oritz de Montellano PR., urednik, New York, Springer, 2005, str. 63-75

Hewlett-Packard Company, Basics of LC/MS. 1998

Interakcije lijekova, 2014., http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-za-pacijente/lijekovi/cimbenici-odgovora-na-lijek/interakcije-lijekova, pristupljeno 20.03.2018.

Isvoran A, Louet M, Vladoiu DL, Craciun D, Loriot MA, Villoutreix BO, Miteva MA. Pharmacogenomics of the cytochrome P450 2C family: impacts of amino acid variations on drug metabolism. *Drug Discov Today*, 2017, 22(2), 366-376.

Klasifikacija i primjeri flavonoida i struktura, 2016., https://www.researchgate.net/figure/Classification-and-example-of-flavonoids-and-their-chemical-structures-Flavonoids-are_fig3_301332394, pristupljeno 05.03.2018.

Kazazić SP. Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida. *Arh Hig Rada Toksikol*, 2004, 55, 279-290.

Kumar S, Pandley AK. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *Sci World J*, 2013, 2013, 1-16.

LC/MS, 2017, https://www.slideshare.net/marvi_faakhir/lcms-75545121, pristupljeno 15.04.2018.

Lynch T. The effect of Cytochrome P450 Metabolism on Drug Response, Interactions and Adverse Effects. *Am Fam Physician*, 2007, 76 (3), 391-396.

Manikandan P, Nagini S. Cytochrome P450 Structure, Function and Clinical Significance: A Review. *Curr Drug Targets*, 2018, 19 (1), 38-54.

Middleton E. Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. *Adv Exp Med Biol*, 1998, 439, 175-182.

Nigović B, Jurišić Grubišić R, Vuković J. Praktikum iz analitike lijekova II. dio. Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Zagreb, 2007, str. 30-33.

Nijveldt RJ, van Nood E, van Hoorn DE, Boelens PG, van Norren K, van Leeuwen PA. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr*, 2001, 74 (4), 418-425.

Panche AN, Diwan AD, Chandra SR. Flavonoids: an overview. *J Nutr Sci*, 2016, 5 (47), 1-15.

Phillips K, Veenstra D, Oren E, Lee J, Sadee W. Potential role of pharmacogenomics in reducing adverse drug reactions: a systemis review. *JAMA*, 2001, 286 (18), 2270-2279.

Rendić S, Di Carlo F. Human cytochrome P450 enzymes: a status report summarizing their reactions, substrates, inducers, and inhibitors. *Drug Metab Rev*, 1997, 29 (1-2), 413-580.

Rendić S, Medić-Šarić M. Metabolizam lijekova i odabranih ksenobiotika. Zagreb, Medicinska naklada, 2013, str. 132-172.

Rice-Evans C. Flavonoid antioxidants. *Curr Med Chem*, 2001, 8 (7), 797-807.

Slaughter RL, Edwards DJ. Recent advances: the cytochrome P450 enzymes. *Ann Pharmacother*, 1995, 29 (6), 619-24.

Sproule B, Otton V, Cheung SW, Zhong XH, Romach MK, Sellers EM. CYP2D6 inhibition in patients treated with sertraline. *J Clin Psychopharmacol*, 1997, 17 (2), 102-6.

Uvod u LC-MS, 2018, https://www.shimadzu.com/an/lcms/support/intro/lib/lctalk/46/46intro.html, pristupljeno 14.04.2018.

Viskupičova J, Ondrejovič M, Šturdik E. Bioavailability and metabolis of flavonoids. *J Food Nutr Res*, 2008, 47 (4), 151-162.

Weinshilboum R. Inheritance and drug response. *N Engl J Med*, 2003, 648(6), 529-37.

Wilkinson GR. Drug metabolism and variability among patients in drug response. *N Eng J Med*, 2005, 352 (21), 2211-21.

Zhou SF, Liu JP, Chowbay B. Polymorphism of human cytochrome P450 enzymes and its clinical impact. *Drug Metab Rev*, 2009, 41 (2), 89-295.

7. SAŽETAK/SUMMARY

U okviru ovog diplomskog rada provedena je analiza 11 flavonoida koji su prethodnim istraživanjima na humanim jetrenim mikrosomima pokazali metabolizam putem citokroma P450. Flavonoidi su polifenolni spojevi široko rasprostranjeni u biljkama koji se zbog svojeg antioksidirajućeg, protuupalnog, kardioprotektivnog te antitrombotičkog djelovanja nalaze u središtu ovog rada. Primjenom tekućinske kromatografije spregnute sa spektrometrijom masa odredili smo koji se od 11 flavonoida metabolizira preko određenog citokroma P450 2C potporodice enzima. Analizom kromatograma izdvojenog iona dobili smo podatke o masi, strukturi te molekulskoj formuli novonastalih metabolita, te smo iz razlika u masi odredili o kojem se metabolitu i reakciji radi. Od svih analiziranih spojeva, samo su dva flavonoida pokazala metabolizam putem citokroma P450 2C potporodice enzima, galangin i 7-hidroksiflavon. Oba navedena flavonoida metaboliziraju se putem citokroma 2C19 prilikom čega dolazi do aromatske hidroksilacije te nastaju metaboliti sakuranetin (iz galangina) i 4',7-dihidroksiflavon (iz 3-hidroksiflavona). Međutim, 4',7-dihidroksiflavon nastaje u izuzetno maloj količini, stoga su za a metabolizam 7-hidroksiflavona primarno odgovorni drugi enzimi, poput citokroma 3A4. Ovim radom upotpunili smo dosadašnje spoznaje o metabolizmu flavonoida te pomogli u budućoj prevenciji mogućih interakcija flavonoida i lijekova biotransformiranih citokromom 2C19.

Summary

In this thesis, an analysis of 11 flavonoids was carried out. These flavonoids had shown, in earlier reasearch on human liver microsomes, metabolism mediated by cytochrome P450. Flavonoids are polyphenol compounds, widely found in plants, that are at the heart of this work because of its antioxidant, anti-inflammatory, cardioprotective and antithrombotic activity. Using liquid chromatography coupled with mass spectrometry, we determined which of the 11 flavonoids were metabolised by a specific cytochrome P450 2C subfamily of enzymes. Analysis of ion isolated chromatograph yielded data on the mass, structure and molecular formula of the new metabolites, and from the mass difference we determined which metabolite was formed and by which reaction. Of all the samples tested, only two flavonoids showed metabolism via cytochrome P450 2C subfamily of enzymes, galangin and 7-hydroxyflavone. Both flavonoids are metabolised by cytochrome 2C19 in a reaction called aromatic hydroxylation during which metabolites sakuranetin and 4',7-dihydroxyflavon are formed. However, the 4',7-dihydroxyflavon is produced in an extremely small amount, so other enzymes, such as CYP3A4, are primarily responsible for the 7-hydroxyflavone metabolism. With this work, we have sumplemented our understanding of flavonoid metabolism and assisted in the future prevention of possible interactions between flavonoids and other drugs biotransformed by cytochrome 2C19.

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

METABOLIZAM FLAVONOIDA POSREDOVAN ENZIMIMA CITOKROM P450 2C POTPORODICE

Martina Tadić

SAŽETAK

U okviru ovog diplomskog rada provedena je analiza 11 flavonoida koji su prethodnim istraživanjima na humanim jetrenim mikrosomima pokazali metabolizam putem citokroma P450. Flavonoidi su polifenolni spojevi široko rasprostranjeni u biljkama koji se zbog svojeg antioksidirajućeg, protuupalnog, kardioprotektivnog te antitrombotičkog djelovanja nalaze u središtu ovog rada. Primjenom tekućinske kromatografije spregnute sa spektrometrijom masa odredili smo koji se od 11 flavonoida metabolizira preko određenog citokroma P450 2C potporodice enzima. Analizom kromatograma izdvojenog iona dobili smo podatke o masi, strukturi te molekulskoj formuli novonastalih metabolita, te smo iz razlika u masi odredili o kojem se metabolitu i reakciji radi. Od svih analiziranih spojeva, samo su dva flavonoida pokazala metabolizam putem citokroma P450 2C potporodice enzima, galangin i 7-hidroksiflavon. Oba navedena flavonoida metaboliziraju se putem citokroma 2C19 prilikom čega dolazi do aromatske hidroksilacije te nastaju metaboliti sakuranetin (iz galangina) i 4',7-dihidroksiflavon (iz 3-hidroksiflavona). Međutim, 4',7-dihidroksiflavon nastaje u izuzetno maloj količini, stoga su za a metabolizam 7-hidroksiflavona primarno odgovorni drugi enzimi, poput citokroma 3A4. Ovim radom upotpunili smo dosadašnje spoznaje o metabolizmu flavonoida te pomogli u budućoj prevenciji mogućih interakcija flavonoida i lijekova biotransformiranih citokromom 2C19.

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

Rad sadrži: 37 stranica, 25 grafička prikaza, 7 tablica i 34 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: citokrom P450, flavonoidi, LC-MS, biotransformacija

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. Željan Maleš, *redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*

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

Rad prihvaćen: svibanj, 2018.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

METABOLISM OF FLAVONOIDS MEDIATED BY CYTOCHROME P450 2C SUBFAMILY OF ENZYMES

Martina Tadić

SUMMARY

In this thesis, an analysis of 11 flavonoids was carried out. These flavonoids had shown, in earlier reasearch on human liver microsomes, metabolism mediated by cytochrome P450. Flavonoids are polyphenol compounds, widely found in plants, that are at the heart of this work because of its antioxidant, anti-inflammatory, cardioprotective and antithrombotic activity. Using liquid chromatography coupled with mass spectrometry, we determined which of the 11 flavonoids were metabolised by a specific cytochrome P450 2C subfamily of enzymes. Analysis of ion isolated chromatograph yielded data on the mass, structure and molecular formula of the new metabolites, and from the mass difference we determined which metabolite was formed and by which reaction. Of all the samples tested, only two flavonoids showed metabolism via cytochrome P450 2C subfamily of enzymes, galangin and 7-hydroxyflavone. Both flavonoids are metabolised by cytochrome 2C19 in a reaction called aromatic hydroxylation during which metabolites sakuranetin and 4',7-dihydroxyflavon are formed. However, the 4',7-dihydroxyflavon is produced in an extremely small amount, so other enzymes, such as CYP3A4, are primarily responsible for the 7-hydroxyflavone metabolism. With this work, we have sumplemented our understanding of flavonoid metabolism and assisted in the future prevention of possible interactions between flavonoids and other drugs biotransformed by cytochrome 2C19.

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

Thesis includes: 37 pages, 25 figures, 7 tables and 34 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Cytochrome P450, flavonoids, LC-MS, biotransformation

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

Reviewers: **Mirza Bojić**, **Ph.D.**, *Asssistant Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Željan Maleš, **Ph.D.,** *Full Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Željka Korade, Ph.D., *Full Professor***,** University of Nebrasca

The thesis was accepted: May, 2018