

709 5720

Marija Škrlec

Ispitivanje učinka ekstrakta planike (*Arbutus unedo* L.) na enzimsku aktivnost CYP2C8

ADIMBIO
P
C.A.S.

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2020. godina

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

Zahvaljujem se mentoru izv. prof. dr. sc. Mirzi Bojiću na vođenju kroz ovaj rad, na svakom brzo odgovorenem mailu te na strpljenju i savjetima.

Doktorandu Martinu Kondži, mag. pharm. i doktorandici Maji Beus, mag. pharm. te tehničkoj suradnici Ljiljani Jurkin koji su mi svakodnevno uskakali u pomoć.

Zahvaljujem se svojoj obitelji na bezuvjetnoj podršci i davanju svojeg maksimuma svih ovih godina, a posebno hvala sestri Ani koja me je najviše trpila.

Veliko hvala dečku Matiji koji mi je konstanta potpora i motivacija te prijateljima koji su uljepšali ovih pet godina studiranja.

Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1. Citokrom P450 enzimi	1
1.1.1. Građa i smještaj citokrom P450 enzima.....	2
1.1.2. Uloga citokrom P450 enzima.....	3
1.1.3. Inhibicija citokrom P450 enzima	4
1.1.4. Enzim citokrom P450 2C8	5
1.2. Flavonoidi	7
1.2.1. Struktura flavonoida.....	7
1.2.2. Metabolička sudbina flavonoida u organizmu	8
1.3. Planika, <i>Arbutus unedo</i> L.....	9
1.3.1. Polifenolni sastav ekstrakta planike	10
2. OBRAZLOŽENJE TEME.....	11
3. MATERIJALI I METODE.....	12
3.1. Materijali	12
3.2. Metode	13
3.2.1. Enzimske inkubacije ekstrakata planike	14
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	16
4.1. Utjecaj ekstrakata planike na enzimsku aktivnost CYP2C8.....	16
4.2. Biljni ekstrakti i njihov utjecaj na enzimsku aktivnost	18
5. ZAKLJUČAK.....	19
LITERATURA.....	20
SAŽETAK.....	28
SUMMARY	29
PRILOZI.....	30

Popis slika

Slika 1:	Diferencijalni spektar ugljikova monoksida CO citokroma P450 2B4.....	1
Slika 2:	Shematski prikaz aktivnog mjesta citokrom P450 enzima.....	2
Slika 3:	Shematski prikaz potencijalnih mjesta za vezanje ireverzibilnog inhibitora (željezo, hem, apoprotein).....	4
Slika 4:	Udio CYP enzima u metabolizmu lijekova.....	5
Slika 5:	Hrana bogata flavonoidima.....	7
Slika 6:	Opća struktura a) flavonoida i b) pojedine klase flavonoida.....	8
Slika 7:	<i>Arbutus unedo</i> L.	9
Slika 8:	Strukture nekih flavonoida izoliranih iz ekstrakta <i>A. unedo</i>	10
Slika 9:	Silika-gel s obrađenim silanolnim skupinama	13
Slika 10:	Shematski prikaz HPLC kromatografa.....	14
Slika 11:	Marker reakcija za CYP2C8 enzim.....	14
Slika 12:	Kromatogram kontrolnog uzorka.....	16
Slika 13:	Kromatogram uzorka s inhibitorom.....	16
Slika 14:	Preostala aktivnost enzima CYP2C8 za 12 uzoraka.....	17
Slika 15:	Preostala enzimaska aktivnost enzima CYP2C8 nakon inhibicije s aglikonima.....	18

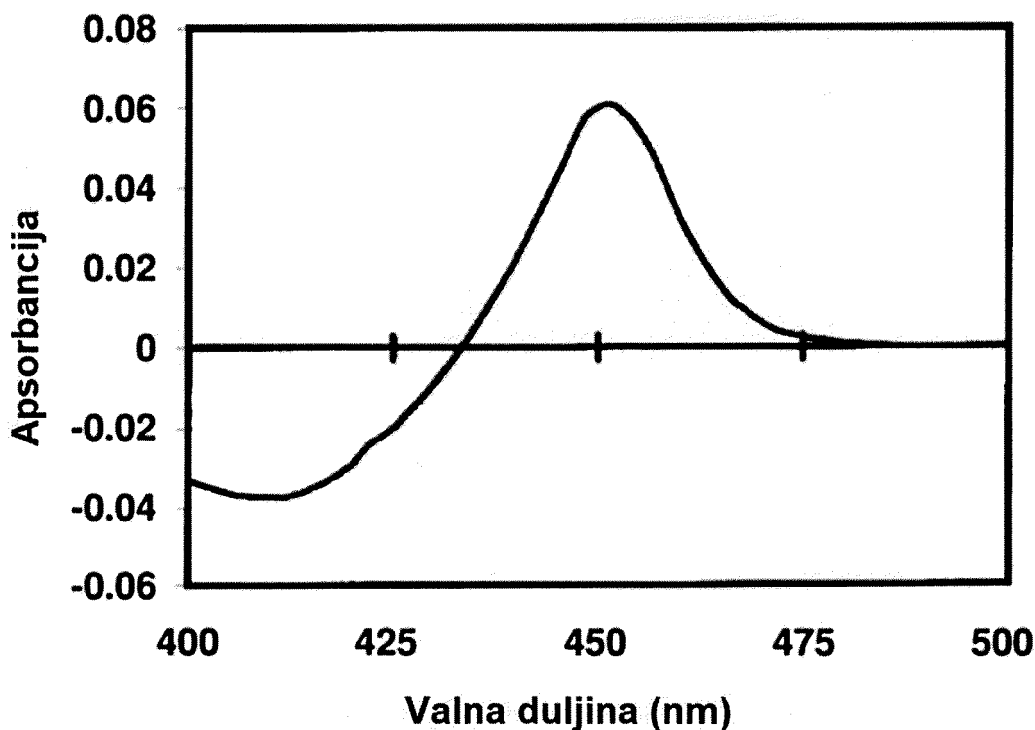
Popis tablica

Tablica 1: Marker supstrati i reakcije jetrenih enzima 3

1. UVOD

1.1. Citokrom P450 enzimi

CYP enzimi ili citokrom P450 enzimi pripadaju superporodici enzima koji su naziv dobili po maksimumu koji pokazuju u diferencijalnom spektru kompleksa s ugljikovim monoksidom nakon redukcije u odnosu na reducirani protein na $\lambda = 450$ nm (Slika 1).



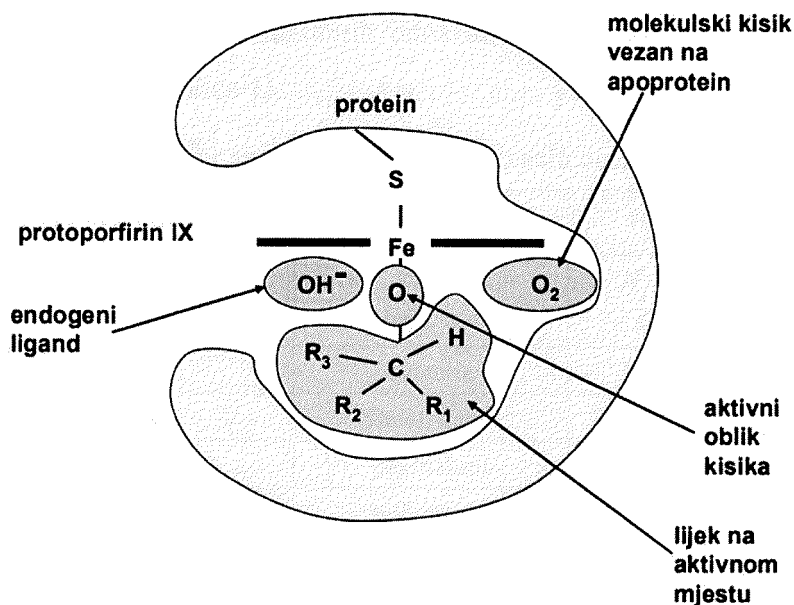
Slika 1: Diferencijalni spektar ugljikova monoksida CO citokroma P450 2B4 (Schenkman i Jansson, 2006)

Geni zaduženi za kodiranje enzima označavaju se s *CYP*, a cijela superporodica može se podijeliti na porodice kojima se dodjeljuju brojevi (*CYP1*, *CYP2*, ...), koje se dalje dijele na potporodice dodatkom slova (*CYP1A*, *CYP1B*, *CYP2A*, ...). Pojedini se enzimi označavaju dodatkom još jednog broja te je na taj način u potpunosti definiran jedan enzim.

Otkrivene su ukupno 74 porodice, od kojih je 14 prisutno u svim sisavcima, a u čovjeka je do sada identificirano 17 porodica i 57 enzima.

1.1.1. Građa i smještaj citokrom P450 enzima

Građeni su od apoproteina i prostetske skupine, odnosno hema. Sam hem građen je od protoporfirinskog prstena (sadrži četiri pirolna prstena) u središtu kojeg se nalazi željezo. Željezo je heksakoordinirano, što znači da ostvaruje šest veza: četiri s dušicima iz pirolnih prstena, jednu s atomom sumpora iz cisteina iz proteinskog dijela enzima te jednu s aktivnim oblikom kisika (Slika 2).



Slika 2: Shematski prikaz aktivnog mjesta citokrom P450 enzima (Rendić i Medić-Šarić, 2013)

Citokrom P450 enzimi su unutarstanični hemoproteini koji aktiviraju molekularni kisik za oksidativni metabolizam velikog spektra lipofilnih organskih spojeva.

Unutar stanice pronađeni su na više mjesta, odnosno u mitohondriju, Golgijevom aparatu, endoplazmatskom retikulumu (ER) te na membrani jezgre i na plazma membrani. Činjenicu da se nalaze na ER-u može se iskoristiti za dobivanje mikrosoma, jednog od osnovnih sustava za praćenje metaboličkih reakcija.

Iako su CYP enzimi pronađeni u gotovo svim organima u ljudskom tijelu, njihova koncentracija u jetri, probavnom sustavu i kori nadbubrežne žlijezde znatno je veća od drugih hemoproteina prisutnih u tijelu. Jetra je organ zadužen za biotransformaciju (detoksikaciju) velikog broja spojeva, među kojima i lijekova.

1.1.2. Uloga citokrom P450 enzima

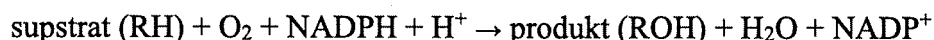
Kako se s vremenom otkrivao sve veći broj CYP enzima u ljudskom tijelu, tako su otkriveni razni procesi čiji su oni posrednici. Uloge ovih enzima, odnosno reakcije u kojima sudjeluju u tijelu su mnogobrojne, a neke od njih su: pretvorba kolesterola do androgena, estrogena, glukokortikoida i mineralokortikoida; sinteza i razgradnja prostaglandina i drugih nezasićenih masnih kiselina; pretvorba vitamina u aktivne forme; sinteza žučnih kiselina iz kolesterola; te velik broj reakcija uključujući metabolizam lijekova (Hasler i sur., 1999).

Neki lijekovi mogu biti supstrati različitih citokroma, no reakcije koju pojedini citokromi kataliziraju su specifične (Tablica 1).

Tablica 1: Marker supstrati i reakcije jetrenih enzima (Bojić, 2015)

CITOKROM P450	SUPSTRAT	REAKCIJA
1A2	kofein fenacetin	<i>N</i> ³ -demetilacija <i>O</i> -deetilacija
2A6	kumarin	7-hidroksilacija
2B6	<i>S</i> -mefenitoin	<i>N</i> -demetilacija
2C8	paklitaksel	6 α -hidroksilacija
2C9	tolbutamid	hidroksilacija metila
2C19	<i>S</i> -mefenitoin	4'-hidroksilacija
2D6	dekstometorfan	<i>O</i> -demetilacija
2E1	klorazoksazon	6-hidroksilacija
3A4/5	nifedipin testosteron midazolam	Oksidacija 6 β -hidroksilacija 1'-hidroksilacija
4A	laurinska kiselina	hidroksilacija

Gledajući prema katalitičkim značajkama, citokrom P450 enzimi pripadaju klasi enzima koji se nazivaju oksigenaze. Konkretno, oni su monooksigenaze ili oksidaze mješovitog djelovanja (engl. mixed function oxidase, MFO) (Cooper i sur., 1965). Kao terminalne monooksigenaze iz molekuskog kisika ugrađuju jedan atom u supstrat, dok drugi reduciraju do molekule vode. Opća reakcija posredovana CYP enzimom prikazana je sljedećom jednadžbom:

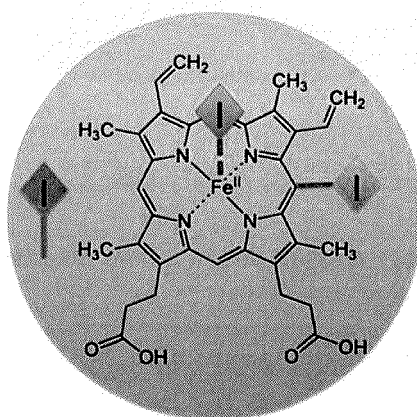


1.1.3. Inhibicija citokrom P450 enzima

Dva su osnovna tipa inhibicije: reverzibilna i ireverzibilna.

Reverzibilna se inhibicija može podijeliti na kompetitivnu, nekompetitivnu i akompetitivnu. Kompetitivni inhibitor natječe se sa supstratom u vezanju na aktivno mjesto enzima. Kod nekompetitivne inhibicije radi se o vezanju inhibitora na alosteričko mjesto. Akompetitivnu inhibiciju karakterizira vezanje inhibitora nakon formiranja enzim-supstrat kompleksa. Kada je riječ o citokromima P450, najčešće dolazi do kompetitivne inhibicije ili inhibicije mješovitog tipa (nekompetitivna). U slučaju reverzibilnog tipa inhibicije uslijed politerapije cjelokupna enzimaska aktivnost može se uspostaviti izbacivanjem inhibitora.

U slučaju ireverzibilne inhibicije enzimaska se aktivnost ne uspostavlja samim prestankom primjene lijeka inhibitora, već zahtijeva vrijeme potrebno za sintezu novog enzima (Bojić, 2015).



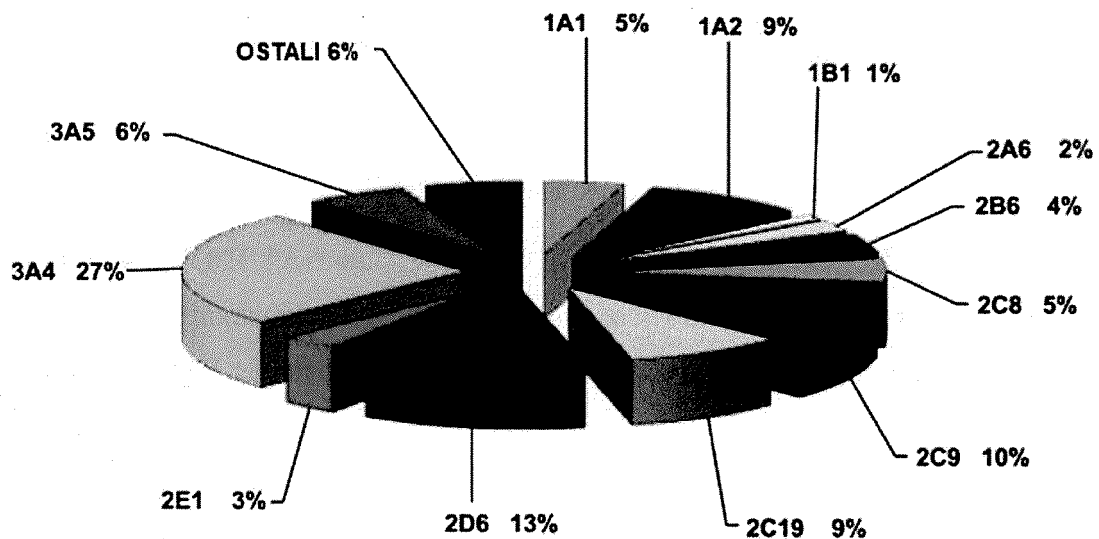
Slika 3: Shematski prikaz potencijalnih mjesta za vezanje ireverzibilnog inhibitora (željezo, hem, apoprotein) (Bojić, 2015)

Glavna karakteristika ireverzibilne inhibicije je da zahtijeva vrijeme. Vrijeme potrebno da se inhibicija uoči može biti posljedica sporog prodora inhibitora do aktivnog mjesta enzima kako bi nastao enzim-inhibitor kompleks – o vremenu ovisna inhibicija, koja nije karakteristična za citokrome (Bojić i sur., 2014).

Najznačajniji oblik inaktivacije citokroma P450 je o metabolizmu ovisna inhibicija koja nastaje kao posljedica reaktivnih metabolita. Nastali intermedijeri mogu inaktivirati enzim vezajući se na apoprotein, hem ili željezo (Slika 3) (Wienkers i Heath, 2005).

1.1.4. Enzim citokrom P450 2C8

Citokrom P450 superporodica enzima metabolizira većinu poznatih lijekova (96%), od čega najveći dio metaboliziraju CYP3A4/5 (33%), CYP2D6 (13%), CYP2C9 (10%), CYP2C19 (9%) i CYP1A2 (9%) (Slika 4) (Rendić i Guengerich, 2015).



Slika 4: Udio CYP enzima u metabolizmu lijekova (Rendić i Guengerich, 2015)

Enzimi potporodice CYP2C čine oko 20% svih CYP enzima u mikrosomima jetre i sudjeluju u metabolizmu oko 20% klinički korištenih lijekova (Goldstein i de Morais, 1994., Zanger i sur., 2018.). Ljudska potporodica CYP2C sastoji se od četiri enzima: CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18 i CYP2C19. U središtu ovog istraživanja nalazi se enzim CYP2C8 koji metabolizira oko 5% svih lijekova (Slika 4).

CYP2C8 igra glavnu ulogu u metabolizmu nekoliko terapijski važnih lijekova, poput kemoterapeutika, antiaritmika, antidiabetika, inhibitora HMG-CoA reduktaze te nesteroidnih protuupalnih lijekova. CYP2C8 također pretvara endogene tvari, poput arahidonske kiseline, u biološki aktivne metabolite (Totah i Rettie, 2005).

Inhibitori CYP2C8 enzima

Reakcija 6 α -hidroksilacije paklitaksela kompetitivno je inhibirana kvercetinom (Rahman i sur., 1994), trimetoprimom (Wen i sur., 2002) i gemfibrozilom (Wang i sur., 2002, Backman i sur., 2002). Montelukast, agonist leukotrienskog receptora, identificiran je kao potentni i selektivni kompetitivni inhibitor CYP2C8 *in vitro*. Međutim, potentnost mu zavisi o koncentraciji proteina te se treba utvrditi njegova korist kao *in vivo* inhibitora. Također, zamijećena je o mehanizmu ovisna inaktivacija za koju su zaslužni neki triciklički antidepressivi (TCA), inhibitori monoaminooksidaze (MAO) i blokatori kalcijevih kanala (Polasek i sur., 2004).

Smještaj i uloga CYP2C8 enzima

CYP2C8 je humani jetreni enzim koji čini oko 7% ukupnog sadržaja CYP enzima u jetri (Rendić i Carlo, 1997, Shimada i sur., 1994) u kojoj provodi oksidativni metabolizam (reakcije faze I) najmanje 5% lijekova.

Otkrivena je ekstrahepatička mRNA enzima u brojnim tkivima, uključujući bubreg, crijevo, nadbubrežnu žlijezdu, mozak, mliječne žlijezde, jajnike i srce, a pronađena je i u karcinomu dojke (Klose i sur., 1999, Nishimura i sur., 2003, Thum i Borlak, 2000, Knupfer i sur., 2004).

U bubregu je CYP2C8 važan u metabolizmu arahidonske kiseline do biološki aktivnih spojeva (Zeldin i sur., 1996). Ovi epoksidi imaju značajne fiziološke uloge: utjecaj na jetrenu glikogenolizu, lučenje peptidnih hormona gušterače i hipofize, agregacija trombocita, reapsorpcija vode i transport natrija u bubregu, upala i vaskularni tonus glatkih mišića (Rifkind i sur., 1995, Node i sur., 1999, Imig, 2000, Roman, 2001).

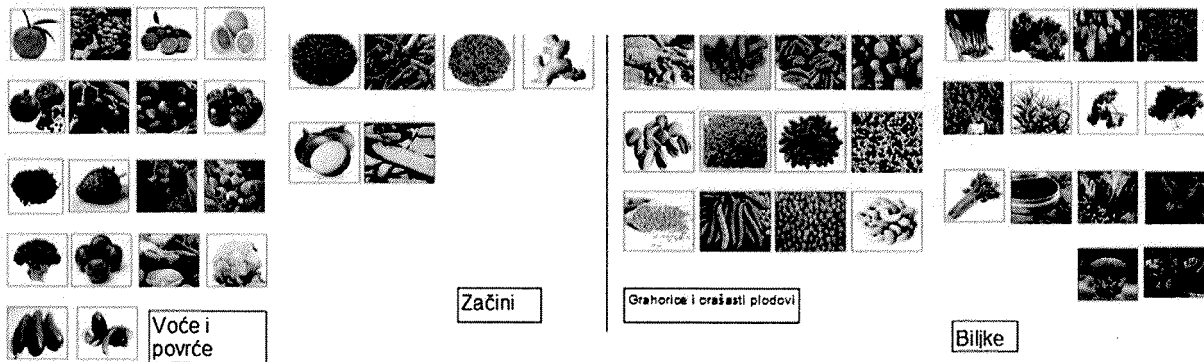
Supstrati CYP2C8 enzima

Supstrati enzima su relativno veliki, blago kiseli, bazični ili neutralni. Neki od terapeutika u čijem metabolizmu enzim CYP2C8 ima izrazit značaj su amiodaron, amodiakvin (Li i sur., 2002), arahidonska kiselina, cerivastatin, repaglinid, retinoična kiselina, roziglitazon (Baldwin i sur., 1999, Malinowski i Bolesta, 2000) i troglitazon (Yamazaki i sur., 1994).

Marker supstrat je paklitaksel, a 6 α -hidroksilacija ovog antitumorskog lijeka često se koristi kao marker reakcija.

1.2. Flavonoidi

Flavonoidi su prirodni polifenolni spojevi prisutni u višim biljkama (voću, povrću) te u nekim proizvodima dobivenih iz njih (vinu i propolisu) (Slika 5) (Parađiković i sur., 2011, Bojić i sur., 2018, Vinković Vrček i sur., 2011, Kale i sur., 2008).



Slika 5: Hrana bogata flavonoidima (<https://flavonoids.weebly.com/flavonoids.html>)

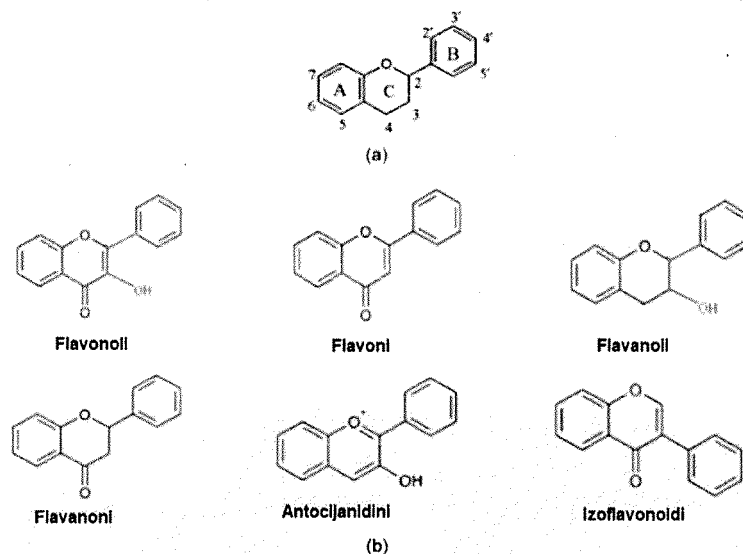
Flavonoidi igraju važnu ulogu u ljudskome tijelu, onu antioksidativnu, a time ulogu i u održavanju zdravlja, odnosno pokazuju protualergijski, protuupalni i antikancerogeni učinak (Bojić i sur., 2018, Benavente-Garcia i Castillo, 2008, Friščić i sur., 2018, Kale i sur., 2008).

1.2.1. Struktura flavonoida

Radi se o spojevima male molekulske mase koji su sastavljeni od dva benzenska prstena i propanskog mosta, zbog čega se često govori o C6-C3-C6 strukturi. Nakon ciklizacije propanskog mosta formira se još jedan prsten te se na sva tri mogu vezati različiti supstituenti o kojima uvelike ovise biološke i kemijske značajke.

U prirodi su prisutni u obliku konjugata, u esterificiranom ili u glikoziliranom obliku. Najčešće su vezani na šećere (npr. glukozidi, ramnoglukozidi, rutinozidi), a identificirano ih je više od 80 (Hollman i Arts, 2000).

Flavonoidi se mogu podijeliti u podgrupe na više načina, u ovome slučaju ovisno o prisutnosti okso skupine na položaju 4, dvostruke veze između ugljikovih atoma C2 i C3 te hidroksil skupine na položaju 3 središnjeg (C) prstena (Slika 6).



Slika 6: Opća struktura a) flavonoida i b) pojedine klase flavonoida (Kale i sur., 2008)

1.2.2. Metabolička sudbina flavonoida u organizmu

Da bi se u potpunosti moglo procijeniti potencijalno korisni učinci flavonoida za čovjekovo zdravlje, bitno je poznavati njihovu apsorpciju, bioraspoloživost i metabolizam. Dva su glavna mjesta u kojima se odvija metabolizam flavonoida. Riječ je o jetri i crijevnoj mikroflori koja, osim što cijepa šećer, razgrađuje flavonoide do fenolnih kiselina (Kale i sur., 2008).

Glavne metaboličke reakcije, kojima su podložni flavonoidi, su aromatske hidroksilacije i *O*-dealkilacije koje su katalizirane CYP enzimima (Benković i sur., 2019 a,b). Flavonoidi također mogu djelovati kao inhibitori metaboličkih enzima te uzrokovati klinički značajne interakcije (Nguyen i sur., 2014, Tam i sur., 2011).

1.3. Planika, *Arbutus unedo* L.

Arbutus unedo L. (Ericaceae) ili planika je vazdazelen grm ili malo drvo visine do 12 metara. Uglavnom u mediteranskom području raste u makijama, vazdazelenim grmovima, na rubnim područjima ili na stjenovitim padinama. Listovi *A. unedo* naizmjenični su, jednostavni, tamnozeleni, kožni, kratke stabljike i nazubljeni.

Cvjetovi su zvonastog oblika, s udubljenim režnjevima, dugi 8-9 mm, bijeli, često obojani ružičastom ili zelenom bojom, i mirisa meda.

Plodovi su okruglaste bobice (magine) promjera oko 15-20 mm; dok zriju, mijenjaju boju od žute do crvene i grimizne. Kako plodovi sazrijevaju oko 12 mjeseci, stablo istodobno nosi zrele plodove i cvjetove (Slika 7) (Domac, 2002, Šilić, 1988).



Slika 7: *Arbutus unedo* L. (<https://www.gardenia.net/plant/arbutus-unedo-strawberry-tree>)

Listovi biljke koriste se kao urinarni antiseptik, antidijaroik, adstringens, purgativ, antioksidans, antihipertenziv, antitrombotik i protuupalna tvar (Afkir i sur., 2008, Andrade i sur., 2009, Bnouham i sur., 2007, El Haouari i sur., 2007, Mariotto i sur., 2008, Pabuccuoglu i sur., 2003).

Kemijska ispitivanja listova i plodova pokazuju prisutnost fenolnih kiselina, flavonoida, trjeslovina, masnih kiselina, vitamina E i C, β -karotena, triterpena, iridoida, eteričnog ulja, šećera i organskih kiselina (Miguel i sur., 2014).

Kako se rijetko farmakološka aktivnost može pripisati grupi spojeva, što je slučaj s polifenolima i antioksidacijskom aktivnošću, od interesa je identifikacija i kvantifikacija pojedinačnih spojeva odgovornih za biološku aktivnost.

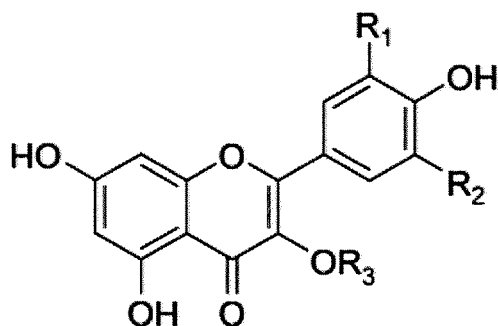
1.3.1. Polifenolni sastav ekstrakta planike

Među polifenolnim spojevima prisutnih u ekstraktu planike mogu se istaknuti neki aglikoni, poput kemferola, kvercetina i miricetina.

Flavonoli s kemferolom kao aglikonom su afzelin (ramnozid) i juglanin (arabinozid).

Kvercetin je prisutan u nizu spojeva, a veže se s raznim šećerima poput ramnoze (kvercitrin), arabinoze (avikularin), galaktoze (hiperin), rutinoze (rutin) i glukoze (izokvercitrin).

Miricetin se nalazi vezan na ramnozu i arabinozu, a još se mogu pronaći i galokatehin i katehin koji grade flavanole (Slika 8) (Dauguet and Foucher, 1982, Fiorentino i sur., 2007, Maleš i sur., 2006).



- $R_1 = H, R_2 = H, R_3 = \alpha\text{-L-ramnopiranozil}$
- $R_1 = OH, R_2 = H, R_3 = \alpha\text{-L-ramnopiranozil}$
- $R_1 = OH, R_2 = OH, R_3 = \alpha\text{-L-ramnopiranozil}$
- $R_1 = H, R_2 = H, R_3 = \beta\text{-D-arabinofuranozil}$
- $R_1 = OH, R_2 = H, R_3 = \beta\text{-D-arabinofuranozil}$
- $R_1 = OH, R_2 = OH, R_3 = \beta\text{-D-arabinofuranozil}$

Slika 8: Strukture nekih flavanoida izoliranih iz ekstrakta *A. unedo* (Fiorentini i sur., 2007)

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Planika, vazdazelena biljka mediteranskog područja, pokazuje širok spektar primjene: njezini listovi koriste se kao urinarni antiseptik, antidijaroik, adstringens, purgativ, antioksidans, antihipertenziv, antitrombotik i protuupalna tvar.

Polifenolni spojevi, posebice flavonoidi, ističu se kao spojevi s poznatim mnogobrojnim korisnim učincima u ljudskom organizmu. Oni su prisutni u velikom broju biljnih vrsta, a tako i u planiki, stoga se njezini pozitivni učinci djelomično mogu pripisati upravo polifenolnim sastavnicama.

Ali, osim pozitivnih, polifenolni spojevi mogu imati i nepovoljne učinke. Riječ je o njihovom potencijalu za inhibiciju enzima zaduženih za metabolizam velikog broja ksenobiotika, među kojima i lijekova.

Budući da se biljka nalazi u svakodnevnoj primjeni, od važnosti je procijeniti njezinu potencijalnu inhibiciju CYP enzima kako bi se mogao predvidjeti farmakološki učinak brojnih, preko CYP enzima metaboliziranih, lijekova. U središtu ovog rada jest CYP2C8, enzim zaslužan za oksidativni metabolizam 5% lijekova.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

Korišteno je 12 uzoraka planike prikupljenih tijekom 12 mjeseci tijekom 2018. godine.

OTAPALA I REAGENSI

- Metanol
- Diklormetan
- Acetonitril
- Ultračista voda (MILIQ)
- Ljudski jetreni mikrosomi (engl. human liver microsomes, HLM)
- Kalij fosfat pH = 7,4
- NADP⁺
- Glukoza-6-fosfat dehidrogenaza (DH)
- Glukoza-6-fosfat (G-6-P)
- Standard paklitaksela
- Standard 6-hidroksipaklitaksela

LABORATORIJSKO POSUĐE I INSTRUMENTI

- Tikvice s okruglim dnom
- Filter šprice
- Odmjerne tikvice
- Epruvete
- Mikropipete
- Vodena kupelj
- Analitička vaga
- Termometar
- Centrifuga
- Vortex uređaj
- HPLC-UV

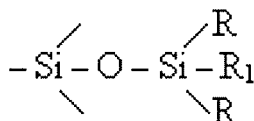
3.2. Metode

- Obrnuto fazna tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti spregnuta s UV detekcijom provedena je na Agilent 1100 instrumentu, na Zorbax SB koloni. Za odvajanje analita korištena je gradijentna metoda.
- Mobilna faza A: voda/acetonitril/ledena octena kiselina = 90/10/0,1 (v/v)
Mobilna faza B: voda/acetonitril/ledena octena kiselina = 10/90/0,1 (v/v)
Gradijent (t/min, %B): (0, 50), (2, 50), (10, 90), (11, 50), (17, 50)
Brzina protoka: 1 mL/min
Valna duljina detekcije: 227 nm
Volumen inkubacijske smjese: 10 µL
Vrijeme kromatografiranja: 17 min
Vrijeme zadržavanja produkta (6-hidroksipaklitaksela): 6,9 min

Princip tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (engl. High Pressure Liquid Chromatography, HPLC) je sljedeći: mobilna faza pod tlakom prolazi kroz čeličnu kolonu napunjenu česticama stacionarne faze. Uzorak se unosi preko ventila te se sastavnice smjese odjeljuju mehanizmom koji ovisi o vrsti stacionarne faze.

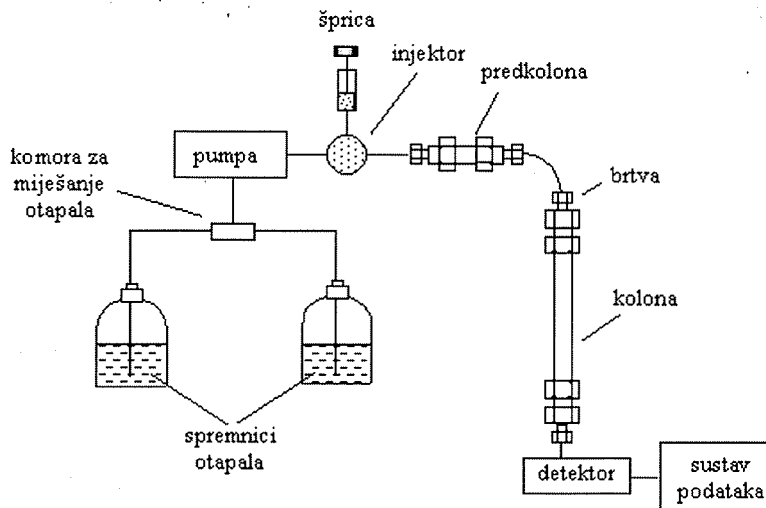
Najčešće korišten princip odvajanja pri tekućinskoj kromatografiji je razdioba kojim se odjeljuju nepolarne i slabo polarne tvari. Na njihovo odvajanje utječe više faktora: polarnost ispitivanog analita te polarnost mobilne i stacionarne faze (Watson, 1999).

U ovome radu korištena je kromatografija obrnutih faza (engl. reverse phase, RP), odnosno stacionarna je faza bila nepolarna. Kao nosač stacionarne faze najčešće je prisutan silika-gel, čije su silanolne skupine obrađene organoklorsilanom. U reakciji nastaje siloksan gdje je alkilna skupina R_1 u praksi najčešće $-C_{18}H_{37}$ (n-oktadecil) ili $-C_8H_{17}$ (n-oktil) (Slika 9).



Slika 9: Silika-gel s obrađenim silanolnim skupinama (http://free-zg.t-com.hr/Svjatlana_Luterotti/09/091/09131.htm)

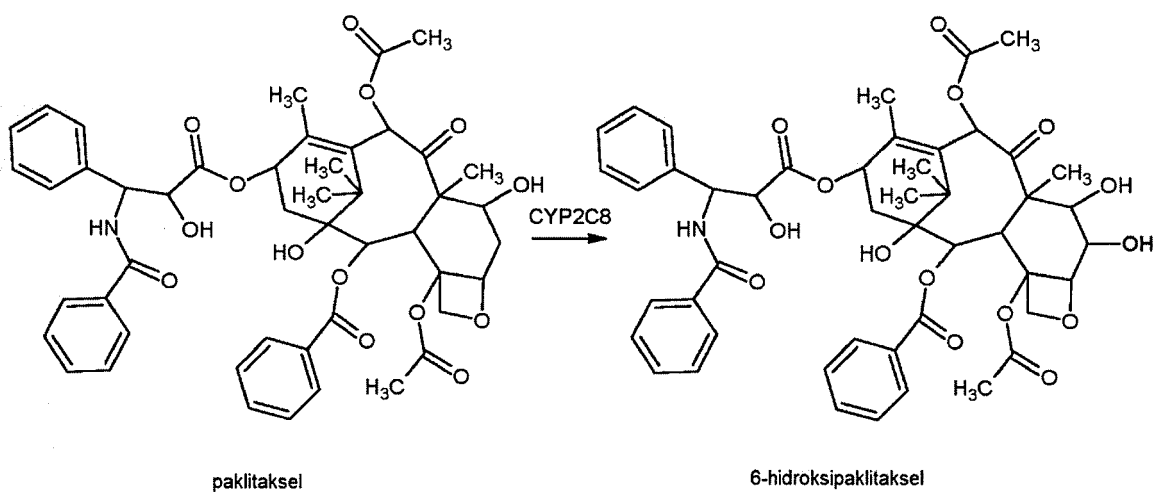
Sam tekućinski kromatograf građen je od nekoliko osnovnih dijelova: spremnika mobilne faze, sustava za obradu otapala, pumpe, sustava za unošenje uzorka (šprica i injektor), kolone (veličina čestica 3-10 μm), detektora te sustava za obradu podataka (Slika 10).



Slika 10: Shematski prikaz HPLC kromatografa (http://free-zg.t-com.hr/Svjetlana_Luterotti/09/091/09131.htm)

3.2.1. Enzimske inkubacije ekstrakata planike

Da bi se ispitao inhibitorni učinak flavonoida ekstrahiranih iz *A. unedo*, odnosno preostala enzimski aktivnost enzima CYP2C8, korištena je marker reakcija za navedeni enzim. Radi se o 6 α -hidroksilaciji marker supstrata paklitaksela (Slika 11), a cijeli postupak naveden je niže.



Slika 11: Marker reakcija za CYP2C8 enzim (Bojić i sur., 2019)

Ekstrakcija flavonoida

- Po 0,5 grama droge ekstrahiralo se je u 10 mL metanola na vodenoj kupelji (60 °C) kroz 5 minuta.
- Dobiveni ekstrakti su ohlađeni i filtrirani u odmjerne tikvice od 10 mL te su razrijeđeni 20 puta.
- Otuda je uzeto 5 µL ekstrakta koji su upareni do suha na vodenoj kupelji (37 °C).

Sva ispitivanja rađena su u triplicatu te su provedena i na tri kontrolna uzorka (bez inhibitora, odnosno bez ekstrakta).

Priprema generirajućeg sustava (GS)

- Za pripremu GS-a potrebno je pripremiti omjer $G-6-P/NADP^+/DH = 100/50/2$.

Priprema sustava za inkubaciju

- Pripremljeni su uzorci od 100 µL koji sadrže kalij fosfat (50 mM), CYP2C8 (100 pmol), supstrat paklitaksel (200 µM), generirajući sustav (15%) i ultrapročišćenu vodu.

Budući da reakcija započinje dodatkom GS-a, on se dodaje posljednji. Reakcija se provodi 30 minuta na 37 °C u vodenoj kupelji uz mućkanje.

Zaustavljanje reakcije

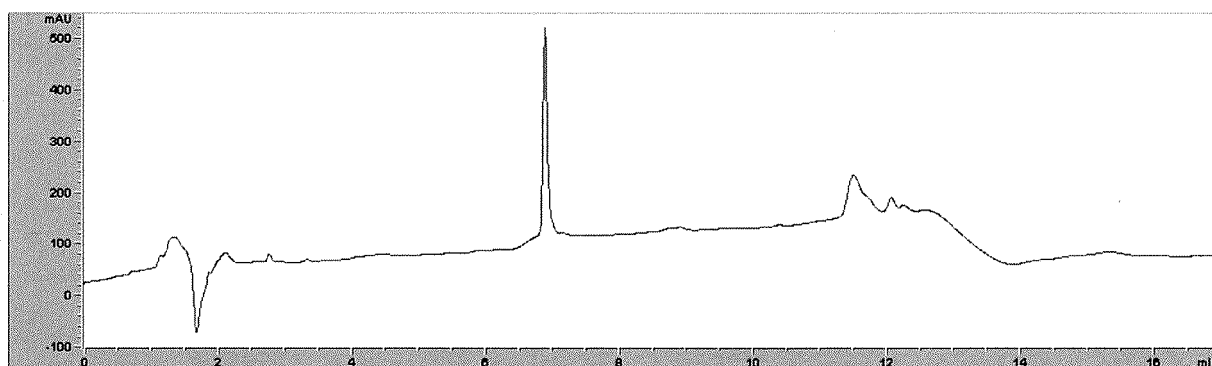
- Nakon provedene reakcije ona se zaustavlja dodatkom 1 mL hladnog diklormetana te se epruveta vorteksira.

Uzorci se centrifugiraju 5 minuta na 1000 okr/min pri čemu se odvajaju vodeni (gornji) i organski sloj (donji). Mikropipetom prenosi se 900 µL organskog sloja u čiste epruvete te se uzorci upare do suha na kupelji (37 °C). Nakon hlađenja na sobnu temperaturu dodaje se 30 µL metanola, vorteksira i sadržaj epruvete prenese u vijalu, čime je uzorak pripremljen za analizu.

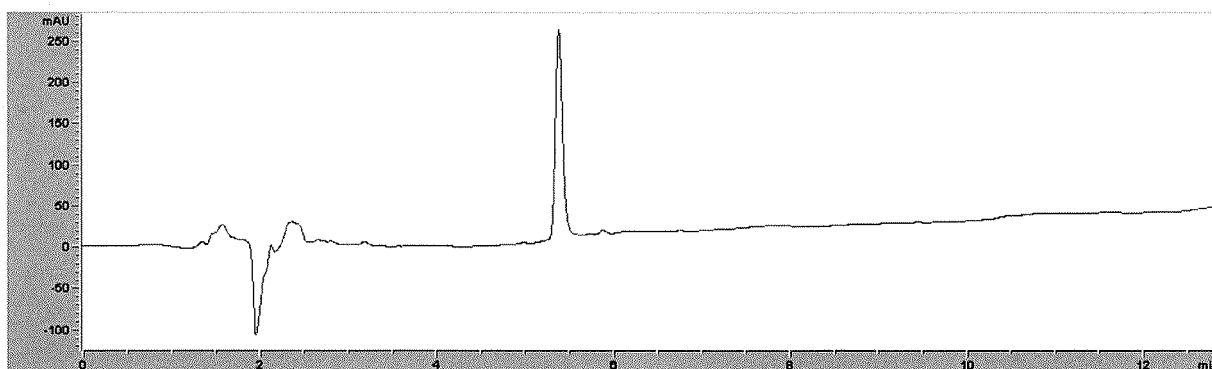
4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Utjecaj ekstrakata planike na enzimsku aktivnost CYP2C8

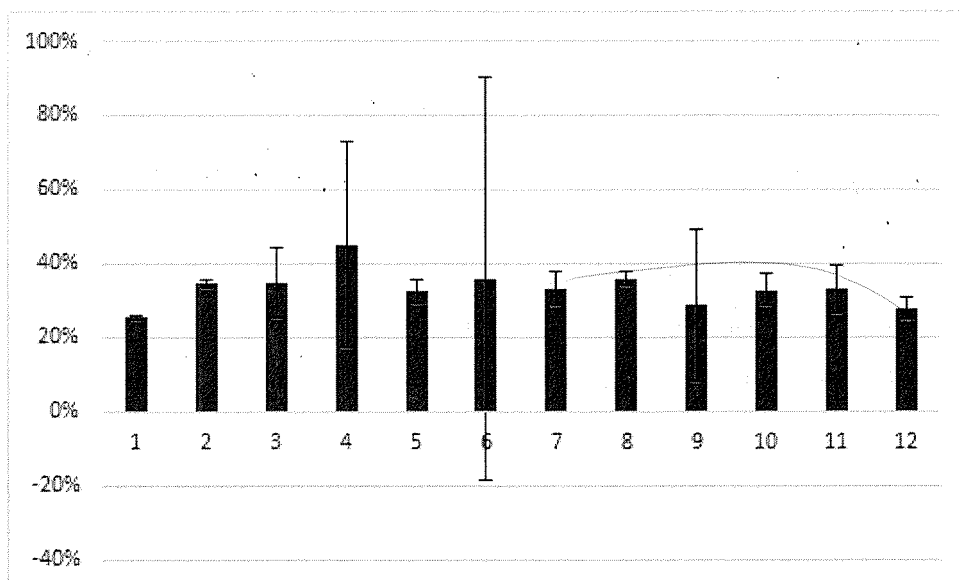
Svaki od 12 ispitanih uzoraka inhibirao je nastanak 6-hidroksipaklitaksela što se može vidjeti usporedbom kromatograma kontrolnog i uzorka s ekstraktom planike (Slike 12 i 13). Uspoređujući površine pikova (12857,7 odnosno 8036,8) jasno je da je došlo do inhibicije enzima (Slika 14).



Slika 12: Kromatogram kontrolnog uzorka



Slika 13: Kromatogram uzorka s inhibitorom



Slika 14: Preostala aktivnost enzima CYP2C8 za 12 uzoraka

Pojedini uzorci pokazuju različit stupanj inhibicije. Sudeći prema rezultatima, najznačajniju inhibiciju pokazao je uzorak broj 1 (s 27% preostale aktivnosti), a najslabiju uzorak broj 4 (s 54% preostale aktivnosti).

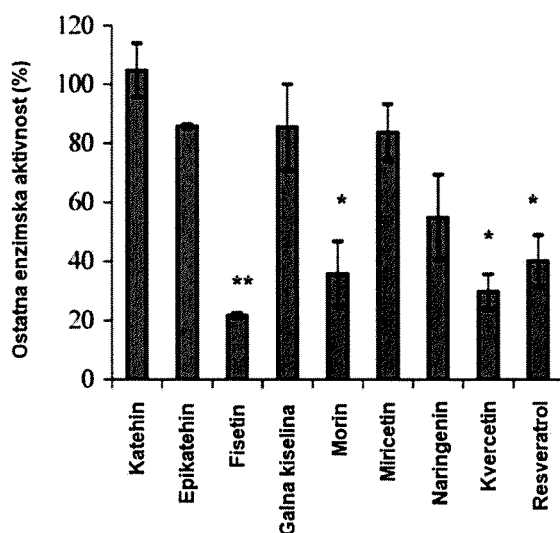
Dio inhibitornog učinka može se pripisati flavonoidima, a njihova količina i sastav se mijenja kroz godinu dok biljka sazrijeva. Stoga 12 uzoraka, s različitim sastavima, različito inhibiraju CYP enzim.

4.2. Biljni ekstrakti i njihov utjecaj na enzimsku aktivnost

Među dostupnom literaturom malo je podataka o ispitivanju inhibitornog učinka ekstrakta planike na CYP2C8 enzim. Stoga su predstavljeni rezultati ispitivanja pojedinih spojeva (flavonoida i/ili aglikona) identificiranih u biljci na enzimsku aktivnost.

Poznato je da je reakcija 6 α -hidroksilacije paklitaksela inhibirana kvercetinom (Rahman i sur., 1994), što su potvrdili i Pang i suradnici (2012). Zaključili su da sam aglikon ima inhibitorni učinak, ali da kvercitrin, flavonoid s istim aglikonskim dijelom, nema takav učinak.

Nadalje, Václavíková i suradnici (2003) su ustvrdili da miricetin slabo inhibira CYP2C8 (približno 10%), dok katehin uopće ne (Slika 15).



Slika 95: Preostala enzimaska aktivnost enzima CYP2C8 nakon inhibicije s aglikonima (Václavíková i sur., 2003)

Ispitujući učinak ekstrakta zelenog čaja Misaka i suradnici (2013) su uočili inhibiciju CYP2C8 koristeći reakciju *N*-deetilacije amodiakvina. Ekstrakt je bogat katehinima (86,5% w/w) pa se zaključuje da neki od tih spojeva imaju inhibitorni učinak, isključivši katehin.

U radu Muthiah i suradnika (2016) ispitivao se učinak pet tradicionalno i često korištenih biljaka: *Eurycoma longifolia* Jack, *Labisia pumila* (Blume) Fern.-Vill., *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees, *Ginkgo biloba* L., *Echinacea purpurea* L. (Moench) na CYP2C8. Sve biljke inhibirale su reakciju *N*-deetilacije amodiakvina, s tim da je najpotentniji inhibitor bila *L. pumila*, zatim *E. longifolia*, *G. biloba*, *A. paniculata* te *E. purpurea*.

5. ZAKLJUČAK

Rezultati ukazuju da ekstrakti planike mogu utjecati na enzimsku aktivnost CYP2C8, a temeljem usporedbe s kemijskim sastavom ekstrakata inhibitorni učinak se djelomično može povezati s polifenolnim sastavnicama biljke.

Istraživanja provedena u okviru ovoga diplomskog rada proširila su saznanja o metabolizmu flavonoida koja su nam izuzetno bitna kako bi se spriječile moguće interakcije lijekova putem citokroma. Literatura na temu inhibicije CYP2C8 enzima ekstraktom planike je oskudna te bi valjalo napraviti opširniju analizu i svakom flavonoidu, odnosno aglikonu pripisati određeni učinak.

LITERATURA

Afkir S, Nguelefack TB, Aziz M, Zoheir J, Cuisinaud G, Bnouham M, Mekhfi H, Legssyer A, Lahlou S, Ziyat A. *Arbutus unedo* prevents cardiovascular and morphological alterations in LNAME-induced hypertensive rats. Part I: cardiovascular and renal hemodynamic effects of *Arbutus unedo* in L-NAME-induced hypertensive rats. *J Ethnopharmacol*, 2008, 116(2), 288–295.

Andrade D, Gil C, Breitenfeld L, Domingues F, Duarte AP. Bioactive extracts from *Cistus ladanifer* and *Arbutus unedo* L. *Ind Crops Prod*, 2009, 30(1), 165–167.

Backman JT, Kyrklund C, Neuvonen M, Neuvonen PJ. Gemfibrozil greatly increases plasma concentrations of cerivastatin. *Clin Pharmacol Ther*, 2002, 72, 685–691.

Baldwin SJ, Clarke SE, Chenery RJ. Characterization of the cytochrome P450 enzymes involved in the *in vitro* metabolism of rosiglitazone. *Br J Clin Pharmacol*, 1999, 48, 424–432.

Benavente-Garcia O, Castillo J. Update on uses and properties of citrus flavonoids: New findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. *J Agric Food Chem*, 2008, 56, 6185–6205.

Benković G, Bojić M, Maleš Ž, Tomić S. Screening of flavonoid aglycons' metabolism mediated by the human liver cytochromes P450. *Acta Pharm*, 2019b, 69(4), 541–562.

Benković G, Rimac H, Maleš Ž, Tomić S, Lončar Z, Bojić M. Characterization of O-demethylations and Aromatic Hydroxylations Mediated by Cytochromes P450 in the Metabolism of Flavonoid Aglycons. *Croat Chem Acta*, 2019a, 92, 115–123.

Bnouham M, Merhfour FZ, Legssyer A, Mekhfi H, Maallem S, Ziyat A. Antihyperglycemic activity of *Arbutus unedo*, *Ammoides pusilla* and *Thymelaea hirsuta*. *Pharmazie*, 2007, 62(8), 630–632.

Bojić M, Antolić A, Tomičić M, Debeljak Ž, Maleš Ž. Propolis ethanolic extracts reduce adenosine diphosphate induced platelet aggregation determined on whole blood. *Nutr J*, 2018, 17, 52.

Bojić M, Barbero L, Dolgos H, Freisleben A, Gallemann D, Riva S, Guengerich FP. Time- and NADPH-dependent inhibition of cytochrome P450 3A4 by the cyclopentapeptide cilengitide: significance of the guanidine group and accompanying spectral changes. *Drug Metab Dispos*, 2014, 42, 1438–1446.

Bojić M, Kondža M, Rimac H, Benković G, Maleš Ž. The Effect of Flavonoid Aglycones on the CYP1A2, CYP2A6, CYP2C8 and CYP2D6 Enzymes Activity. *Molecules*, 2019, 24(17), 3174.

Bojić M. Preklinička ispitivanja inhibicijskog i interakcijskog potencijala novih lijekova na razini citokroma P450. *Farmaceutski glasnik*, 2015, 71, 229-242.

Cooper DY, Levin S, Narasimhulu S, Rosenthal O, Estabrook RW. Photochemical Action Spectrum of the Terminal Oxidase of Mixed Function Oxidase Systems. *Science*, 1965, 147(3656), 400–402.

Dauguet JC, Foucher JP. Flavonoids of *Arbutus unedo* L. (Ericaceae). *Medicinal plants and phytotherapy*, 1982, 16, 185.

Domac R. Flora of Croatia: Manual for determination of plants. Zagreb, Hrvatska, Školska knjiga, 2002.

El Haouari M, L'opez JJ, Mekhfi H, Rosado JA, Salido GM. Antiaggregant effects of *Arbutus unedo* extracts in human platelets. *J Ethnopharmacol*, 2007, 113(2), 325–331.

Fiorentino A, Castaldi S, D'Abrosca B, Natale A, Carfora A, Messere A, Monaco P. Polyphenols from the hydroalcoholic extract of *Arbutus unedo* living in a monospecific Mediterranean woodland. *Biochem Syst Ecol*, 2007, 35(11), 809–811.

- Friščić M, Štibrić Baglama M, Milović M, Hazler Pilepić K, Maleš Ž. Content of Bioactive Constituents and Antioxidant Potential of *Galium* L. Species. *Croat Chem Acta*, 2018, 91, 411–417.
- Goldstein JA, de Morais SMF. Biochemistry and molecular biology of the human CYP2C subfamily. *Pharmacogenetics*, 1994, 4, 285–299.
- Guengerich FP. Analysis and Characterization of Enzymes and Nucleic Acids Relevant to Toxicology. U: Hayes' Principles and Methods of Toxicology, 6. izdanje. Boca Raton, FL, CRC Press, 2014, str. 1905–1964.
- Hasler JA, Estabrook R, Murray M, Pikuleva I, Waterman M, Capdevila J, Beaune P. Human cytochromes P450. *Mol Asp Med*, 1999, 20(1-2), 1–137.
- Hollman PC, Arts IC. Flavonols, flavones and flavanols - nature, occurrence and dietary burden. *J Sci Food Agric*, 2000, 80(7), 1081–1093.
- Imig J. Eicosanoid regulation of renal vasculature. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2000, 279, 965–9681.
- Kale A, Gawande S, Kotwal S. Cancer phytotherapeutics: Role for flavonoids at the cellular level. *Phytother Res*, 2008, 22, 567–577.
- Klose TS, Blaisdell JA, Goldstein JA. Gene structure of CYP2C8 and extrahepatic distribution of the human CYP2Cs. *J Biochem Mol Toxicol*, 1999, 13, 289–295.
- Knupfer H, Schmidt R, Stanitz D, Brauckhoff M, Schonfelder M, Preiss R. CYP2C and IL-6 expression in breast cancer. *Breast*, 2004, 13, 28–34.
- Li XQ, Bjorkman A, Andersson TB, Ridderstrom M, Masimirembwa CM. Amodiaquine clearance and its metabolism to N-desethylamodiaquine is mediated by CYP2C8: a new high

affinity and turnover enzymespecific probe substrate. *J Pharmacol Exp Ther*, 2002, 300, 399–407.

Males Z, Plazibat M, Vundac VB, Zuntar I. Qualitative and quantitative analysis of flavonoids of the strawberry tree—*Arbutus unedo* L. (Ericaceae). *Acta Pharm*, 2006, 56, 245–250.

Malinowski JM, Bolesta S. Rosiglitazone in the treatment of type 2 diabetes mellitus: a critical review. *Clin Ther*, 2000, 22, 1151–1168.

Mallat Z, Nakamura T, Ohan J, Guy L, Tedgui A, Maclouf J, Murphy R. The relationship of hydroxyecosatetraenoic acids and F2-isoprostanes to plaque instability in human carotid atherosclerosis. *J Clin Invest*, 1999, 103, 421–427.

Mariotto S, Esposito E, Di Paola R, Ciampa A, Mazzon E, de Prati AC, Darra E, Vincenzi S, Cucinotta G, Caminiti R, Suzuki H, Cuzzocrea S. Protective effect of *Arbutus unedo* aqueous extract in carrageenan-induced lung inflammation in mice. *Pharmacol Res*, 2008, 57(2), 110–124.

Meyer UA. The molecular basis of genetic polymorphism of drug metabolism. *J Pharm Pharmacol*, 1994, 46, 409–415.

Miguel MG, Faleiro ML, Guerreiro AC, Antunes MD. *Arbutus unedo* L.: chemical and biological properties. *Molecules*, 2014, 19, 15799–15823.

Misaka S, Kawabe K, Onoue S, Werba JP, Girolini M, Tamaki S, Yamada S. Effects of Green Tea Catechins on Cytochrome P450 2B6, 2C8, 2C19, 2D6 and 3A Activities in Human Liver and Intestinal Microsomes. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2013, 28(3), 244–249.

Muthiah YD, Ong CE, Sulaiman SA, Ismail R. Inhibition of Human Cytochrome P450 2C8-catalyzed Amodiaquine N-desethylation: Effect of Five Traditionally and Commonly Used Herbs. *Pharmacogn Res*, 2016, 8(4), 292–297.

- Nguyen S, Huang H, Foster BC, Tam TW, Xing T, Smith ML, Arnason JT, Akhtar H. Antimicrobial and P450 inhibitory properties of common functional foods. *J Pharm Pharm Sci*, 2014, 17, 254–265.
- Nishimura M, Yaguti H, Yoshitsugu H, Naito S, Satoh T. Tissue distribution of mRNA expression levels of human cytochrome P450 isoforms assessed by highselectivity real-time reverse transcription PCR. *Yakugaku Zasshi*, 2003, 123, 369–375.
- Node K, Huo Y, Ruan X, Yang B, Spiecker M, Ley K, Zeldin DC, Liao JK. Anti-inflammatory properties of cytochrome P450 epoxygenase-derived eicosanoids. *Science*, 1999, 285, 1276–1279.
- Pabuccuoglu A, Kivcak B, Bas M, Mert T. Antioxidant activity of *Arbutus unedo* leaves. *Fitoterapia*, 2003, 74(6), 597–599.
- Pallauf K, Rivas-Gonzalo JC, del Castillo MD, Cano MP, de Pascual-Teresa S. Characterization of the antioxidant composition of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruits. *J Food Compos*, 2008, 21(4), 273–281.
- Pang CY, Mak JW, Ismail R, Ong CE. *In vitro* modulatory effects of flavonoids on human cytochrome P450 2C8 (CYP2C8). *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2012, 1385(5), 495–502.
- Parađiković N, Vinković T, Vinković Vrček I, Žuntar I, Bojić M, Medić-Šarić M. Effect of natural biostimulants on yield and nutritional quality: An example of sweet yellow pepper (*Capsicum annuum* L.) plants. *J Sci Food Agric*, 2011, 91, 2146–2152.
- Polasek TM, Elliot DJ, Lewis BC, Miners JO. Mechanism-based inactivation of human cytochrome P4502C8 by drugs *in vitro*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2004, 311, 996–1007.
- Rahman A, Korzekwa KR, Grogan J, Gonzalez FJ, Harris JW. Selective biotransformation of taxol to 6-hydroxytaxol by human cytochrome P450 2C8. *Cancer Res*, 1994, 54, 5543–5546.

Rendić S, Carlo F. Human cytochrome P450 enzymes: a status report summarizing their reactions, substrates, inducers and inhibitors. *Drug Meta. Rev*, 1997, 29, 413–580.

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

Rendić SP, Guengerich FP. Survey of Human Oxidoreductases and Cytochrome P450 Enzymes Involved in the Metabolism of Chemicals. *Chem Res Toxicol*, 2015, 28, 38–42.

Rifkind AB, Lee C, Chang TK, Waxman DJ. Arachidonic acid metabolism by human cytochrome P450s 2C8, 2C9, 2E1, and 1A2: regioselective oxygenation and evidence for a role for CYP2C enzymes in arachidonic acid epoxyoxygenation in human liver microsomes. *Arch Biochem Biophys*, 1995, 320, 380–389.

Roman R. P-450 metabolites of arachidonic acid in the control of cardiovascular function. *Physiol Rev*, 2001, 82, 131–185.

Schenkman JB, Jansson I. *Methods in Molecular Biology*, vol. 320: Cytochrome P450 Protocols: Second Edition. Spectral Analyses of Cytochromes P450. Totowa, NJ, Humana Press, 2006, str. 11–18.

Shema HPLC uređaja http://free-zg.t-com.hr/Svjetlana_Luterotti/09/091/09131.htm pristupljeno 21.1.2020.

Shimada T, Yamazaki H, Mumura M, Inui Y, Guengerich FP. Interindividual variation in human liver cytochrome P450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J Pharmacol Exp Ther*, 1994, 270, 414–422.

Strawberry tree <https://www.gardenia.net/plant/arbutus-unedo-strawberry-tree> pristupljeno 19.1.2020.

- Šilić Č. Atlas of trees and shrubs 3rd edition. Sarajevo, Bosna i Hercegovina, Svjetlost, 1988.
- Tam TW, Akhtar H, Arnason JT, Cvijovic K, Boon H, Cameron DW, Drouin CE, Jaeger W, Tsuyuki RT, Vohra S, Foster BC. Inhibition of human cytochrome P450 metabolism by blended herbal products and vitamins. *J Pharm Pharm Sci*, 2011, 14, 1–16.
- Testa B, Krämer SD. The Biochemistry of Drug Metabolism - An Introduction. *Chem Biodivers*, 2007, 4(3), 257–405.
- Thum T, Borlak J. Gene expression in distinct regions of the heart. *Lancet*, 2000, 355, 979-983.
- Thummel KE, Kunze KL, Shen DD. Enzyme-catalysed processes of first-pass hepatic and intestinal drug extraction. *Adv Drug Deliv Rev*, 1997, 27, 99–127.
- Total RA, Rettie AE. Cytochrome P450 2C8: substrates, inhibitors, pharmacogenetics, and clinical relevance. *Clin Pharmacol Ther*, 2005, 77, 341–352.
- Tsao R. Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients*, 2010, 2(12), 1231–1246.
- Václavíková R, Horský S, Šimek P, Gut I. Paclitaxel metabolism in rat and human liver microsomes is inhibited by phenolic antioxidants. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2003, 368(3), 200–209.
- Vinković Vrček I, Bojić M, Žuntar I, Mendaš G, Medić-Šarić M. Phenol content, antioxidant activity and metal composition of Croatian wines deriving from organically and conventionally grown grapes. *Food Chem*, 2011, 124, 354–361.
- Wang JS, Neuvonen M, Wen X, Backman JT, Neuvonen PJ. Gemfibrozil inhibits CYP2C8-mediated cerivastatin metabolism in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos*, 2002, 30, 1352–1356.

- Watson DG. *Pharmaceutical Analysis: A textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists*. London, Churchill Livingstone, 1999, str. 237–276.
- Wen X, Wang JS, Backman JT, Laitila J, Neuvonen PJ. Trimethoprim and sulfamethoxazole are selective inhibitors of CYP2C8 and CYP2C9, respectively. *Drug Metab Dispos*, 2002, 30, 631–635.
- Wienkers LC, Heath TG. Predicting *in vivo* drug interactions from *in vitro* drug discovery data. *Nat Rev Drug Discov*, 2005, 4, 825–833.
- Yamazaki H, Shibata A, Suzuki M, Nakajima M, Shimada N, Guengerich FP, Yokoi T. Oxidation of troglitazone to a quinone-type metabolite catalyzed by cytochrome P-450 2C8 and P-450 3A4 in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos*, 1999, 27, 1260–1266.
- Zanger UM, Turpeinen M, Klein K, Schwab M. Functional pharmacogenetics/ genomics of human cytochromes P450 involved in drug biotransformation. *Anal Bioanal Chem*, 2008, 392, 1093–1108.
- Zeldin DC, Moomaw CR, Jesse N, Tomer KB, Beetham J, Hammock BD, Wu S. Biochemical characterization of the human liver cytochrome P450 arachidonic acid epoxygenase pathway. *Arch Biochem Biophys*, 1996, 330, 87–96.

SAŽETAK

Arbutus unedo L. ili planika je biljka koja raste u mediteranskom području, a njeni listovi koriste se kao urinarni antiseptik, antidijaroik, adstringens, purgativ, antioksidans, antihipertenziv, antitrombotik i protuupalna tvar. Biljka je bogata raznim spojevima poput fenolnih kiselina, trjeslovina, masnih kiselina, vitamina E i C, β -karotena, triterpena, iridoida, eteričnog ulja, šećera, organskih kiselina i flavonoida. Zadnje navedena skupina spojeva odgovorna je za pozitivne učinke u ljudskom tijelu. Radi se o polifenolnim spojevima koji su inače prisutni i u velikom broju drugih biljaka te u biljnim proizvodima. Iako su flavonoidi pokazali brojne pozitivne učinke na ljudsko tijelo, oni također mogu utjecati na enzimsku aktivnost metaboličkih enzima zaduženih za biotransformaciju lijekova te na taj način interferirati s farmakološkim učinkom lijeka. Ponajprije se misli na citokrom P450 enzime, zaslužne za oksidativnu biotransformaciju 96% lijekova, koji se većinom nalaze u jetri.

Cilj ovog rada bio je utvrditi utjecaj metanolnih ekstrakata planike na enzimsku aktivnost CYP2C8. U tu svrhu korišteno je 12 uzoraka planike skupljenih tijekom 12 mjeseci tijekom 2018. godine. Aktivnost CYP2C8 praćena je primjenom paklitaksela kao marker supstrata koji se djelovanjem navedenog enzima prevodi u 6-hidroksipaklitaksel. Nastali metabolit određen je primjenom obrnuto fazne tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti spregnute s UV detekcijom. Rezultat je iskazan kao postotak nastalog metabolita u odnosu na kontrolu bez inhibitora. Svi ispitani uzorci inhibirali su nastanak 6-hidroksipaklitaksela te je preostala enzimska aktivnost iznosila od 27% do 54%. Rezultati ukazuju da ekstrakti planike mogu utjecati na enzimsku aktivnost CYP2C8, a temeljem usporedbe s kemijskim sastavom ekstrakata učinak se djelomično može povezati s polifenolnim sastavnicama ekstrakta planike.

Ključne riječi: *Arbutus unedo*, flavonoidi, citokrom P450, HPLC.

SUMMARY

Arbutus unedo L. or strawberry tree is a plant that grows in the Mediterranean area and its leaves are used as urinary antiseptic, antidiarrheal, astringent, purgative, antioxidant, antihypertensive, antithrombotic and anti-inflammatory substance. The plant is rich in various compounds, such as phenolic acids, tannins, fatty acids, vitamins E and C, β -carotene, triterpenes, iridoids, essential oils, sugars, organic acids and flavonoids. The latter group of compounds is responsible for the positive effects in the human body. Flavonoids are polyphenolic compounds that are otherwise present in many other plants and plant products. Although they have shown numerous positive effects in the human body, they can also interact with certain enzymes responsible for drug metabolism and thus interfere with the pharmacological effect of the drug. This primarily refers to cytochrome P450 enzymes, responsible for oxidative biotransformation of 96% of drugs.

The aim of this study was to determine the influence of methanolic extracts of strawberry tree on CYP2C8 enzymatic activity. For this purpose, 12 samples of the plant collected over 12 months during 2018 were used. CYP2C8 activity was monitored by the use of paclitaxel as a marker substrate, which is converted to 6-hydroxypaclitaxel by the enzyme. The resulting metabolite was determined using high performance reverse phase liquid chromatography coupled with a UV detection. The result is expressed as the percentage of metabolite produced relative to the control without inhibitors. All tested samples inhibited the formation of 6-hydroxypaclitaxel and the residual enzyme activity ranged from 27% to 54%. The results indicate that strawberry tree extracts can influence the enzymatic activity of CYP2C8, and on the basis of comparison with the chemical composition of the extracts, the effect can be partially related to the polyphenolic constituents of strawberry tree extract.

Key words: *Arbutus unedo*, flavonoids, cytochrome P450, HPLC.

PRILOZI

I. CD-R disc



Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

Ispitivanje učinka ekstrakta planike (*Arbutus unedo* L.) na enzimsku aktivnost CYP2C8

Marija Škrlec

SAŽETAK

Arbutus unedo L. ili planika je biljka koja raste u mediteranskom području, a njeni listovi koriste se kao urinarni antiseptik, antidijaroik, adstringens, purgativ, antioksidans, antihipertenziv, antitrombotik i protuupalna tvar. Biljka je bogata raznim spojevima, poput fenolnih kiselina, trjeslovina, masnih kiselina, vitamina E i C, β -karotena, triterpena, iridoida, eteričnog ulja, šećera, organskih kiselina i flavonoida. Zadnje navedena skupina spojeva odgovorna je za pozitivne učinke u ljudskom tijelu. Radi se o polifenolnim spojevima koji su inače prisutni i u velikom broju drugih biljaka te u biljnim proizvodima. Iako su flavonoidi pokazali brojne pozitivne učinke na ljudsko tijelo, oni također mogu utjecati na enzimsku aktivnost metaboličkih enzima zaduženih za biotransformaciju lijekova te na taj način interferirati s farmakološkim učinkom lijeka. Ponajprije se misli na citokrom P450 enzime, zaslužne za oksidativnu biotransformaciju 96% lijekova, koji se većinom nalaze u jetri. Cilj ovog rada bio je utvrditi utjecaj metanolnih ekstrakata planike na enzimsku aktivnost CYP2C8. U tu svrhu korišteno je 12 uzoraka planike skupljenih tijekom 12 mjeseci tijekom 2018. godine. Aktivnost CYP2C8 praćena je primjenom paklitaksela kao marker supstrata koji se djelovanjem navedenog enzima prevodi u 6-hidroksipaklitaksel. Nastali metabolit određen je primjenom obrnuto fazne tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti spregnute s UV detekcijom. Rezultat je iskazan kao postotak nastalog metabolita u odnosu na kontrolu bez inhibitora. Svi ispitani uzorci inhibirali su nastanak 6-hidroksipaklitaksela te je preostala enzimska aktivnost iznosila od 27% do 54%. Rezultati ukazuju da ekstrakti planike mogu utjecati na enzimsku aktivnost CYP2C8, a temeljem usporedbe s kemijskim sastavom ekstrakata učinak se djelomično može povezati s polifenolnim sastavnicama ekstrakta planike.

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

Rad sadrži: 31 stranicu, 15 grafičkih prikaza, 1 tablicu i 68 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: *Arbutus unedo*, flavonoidi, citokrom P450, HPLC

Mentor: **dr. sc. Mirza Bojić**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **dr. sc. Mirza Bojić**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

dr. sc. Kristina Pavić, poslijedoktorandica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

dr. sc. Hrvoje Rimac, poslijedoktorand Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: Travanj, 2020.

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

Assessment of the effect of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) extract on CYP2C8 enzyme activity***Marija Škrlec*****SUMMARY**

Arbutus unedo L. or strawberry tree is a plant that grows in the Mediterranean area and its leaves of the plant are used as urinary antiseptic, antidiarrheal, astringent, purgative, antioxidant, antihypertensive, antithrombotic and anti-inflammatory substance. The plant is rich in various compounds, such as phenolic acids, tannins, fatty acids, vitamins E and C, β -carotene, triterpene, iridoids, essential oils, sugars, organic acids and flavonoids. The latter group of compounds is responsible for the positive effects in the human body. Flavonoids are polyphenolic compounds that are otherwise present in many other plants and plant products. Although they have shown numerous positive effects in the human body, they can also interact with certain enzymes responsible for drug metabolism and thus interfere with the pharmacological effect of the drug. This primarily refers to cytochrome P450 enzymes, responsible for oxidative biotransformation of 96% of drugs.

The aim of this study was to determine the influence of methanolic extracts of strawberry tree on CYP2C8 enzymatic activity. For this purpose, 12 samples of the plant collected over 12 months during 2018 were used. CYP2C8 activity was monitored by the use of paclitaxel as a marker substrate, which is converted to 6-hydroxypaclitaxel by the enzyme. The resulting metabolite was determined using high performance reverse phase liquid chromatography coupled with a UV detection. The result is expressed as the percentage of metabolite produced relative to the control without inhibitors. All samples tested inhibited the formation of 6-hydroxypaclitaxel and the residual enzyme activity ranged from 27% to 54%. The results indicate that strawberry tree extracts can influence the enzymatic activity of CYP2C8, and on the basis of comparison with the chemical composition of the extracts, the effect can be partially related to the polyphenolic constituents of strawberry tree extract.

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

Thesis includes: 31 pages, 15 figures, 1 table and 68 references. Original is in Croatian language.

Keywords: *Arbutus unedo*, flavonoids, cytochrome P450, HPLC

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
Kristina Pavić, Ph.D. postdoctoral researcher, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Hrvoje Rimac, Ph.D. postdoctoral researcher, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: April, 2020