Metabolizam flavonoida posredovan citokromom P450 2D6

Šarčević, David

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:179163

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

David Šarčević

Metabolizam flavonoida posredovan citokromom P450 2D6

DIPLOMSKI RAD

predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2017.

David Šarčević

Metabolizam flavonoida posredovan citokromom P450 2D6

DIPLOMSKI RAD

predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2017.

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

Zahvaljujem se mentoru doc. dr. sc. Mirzi Bojiću na stručnom vodstvu, pomoći i savjetima pri izradi ovoga rada te Goranu Benkoviću, mag.pharm. uz čiju je pomoć napisan ovaj rad.

SADRŽAJ

1. UVOD **1**

1.1. FLAVONOIDI 2

1.1.1. KEMIJSKA STRUKTURA I KLASIFIKACIJA FLAVONOIDA 2

1.1.2. FLAVONOIDI U PREHRANI 4

1.1.3. METABOLIZAM FLAVONOIDA 6

1.2 CITOKROM P450 8

1.2.1. MEHANIZAM REAKCIJE 9

1.2.2. CITOKROM P450 2D6 10

2. OBRAZLOŽENJE TEME **12**

3. MATERIJALI I METODE **14**

3.1. MATERIJALI 15

3.2. METODE 18

4. REZULTATI I RASPRAVA **21**

4.1. AKACETIN 22

4.2. 7-HIDROKSIFLAVON 26

4.3. GALANGIN 26

4.4. TANGERETIN 27

5. ZAKLJUČAK **29**

6. LITERATURA **31**

7. SAŽETAK / SUMMARY **35**

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA / BASIC DOCUMENTATION CARD

POPIS KRATICA

COMT	katehol-*O*-metiltransferaza
CYP	citokrom
EIC	kromatogram izdvojenog iona
ESI	ionizacija elektro-raspršenjem
FAD	flavinadenindinukleotid
FMN	flavinmononukleotid
LC/MS	tekućinska kromatografija spregnuta sa spektrometrijom masa
MALDI	matricom potpomognuta ionizacija laserskom desorpcijom
NADH	nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfat
TOF	vrijeme proleta
UV-Vis	UV-vidljivi dio spektra

1. UVOD

1.1. FLAVONOIDI

Flavonoidi su skupina fenolnih spojeva koje nalazimo u biljkama. Do danas, poznato ih je oko šest tisuća, a samo su neki od njih važni u prehrani. Podijeljeni su u nekoliko podskupina i razlikuju se u kemijskim i biološkim svojstvima. Interes za proučavanje flavonoida porastao je spoznajom o njihovom djelovanju kao antioksidansa, odnosno o njihovom potencijalnom kardioprotektivnom djelovanju (Erlund, 2004). Prema Basheer i Kerem (2014) opažen je kod flavonoida antivirusni, antibakterijski, protuupalni i neuroprotektivni učinak. Neke biljne droge kao što su gospina trava (*Hypericum perforatum*), ginseng (*Panax ginseng*), ehinacea (*Echinacea purpurea*), brusnica (*Vaccinium macrocarpon*) i đumbir (*Zingiber officinale*) su bogat izvor polifenolnih spojeva.

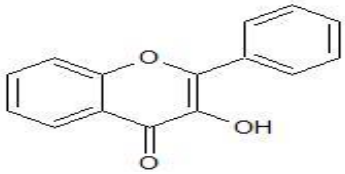
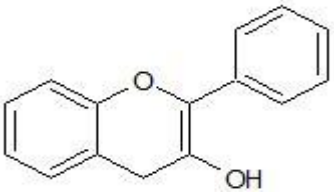
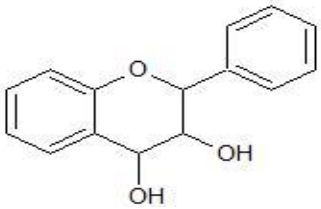
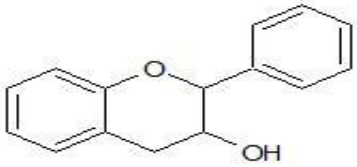
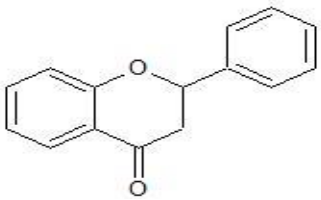
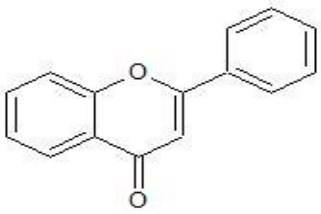
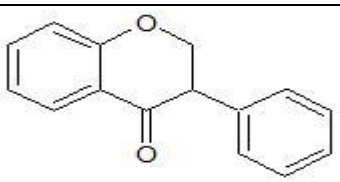
S farmakološkog i toksikološkog gledišta važni su zbog moguće interferencije s enzimima koji metaboliziraju razne ksenobiotike na razini indukcije, inhibicije ili moduliranja njihove enzimatske aktivnosti što može rezultirati korisnim ili štetnim učincima za zdravlje čovjeka (Sergent i sur., 2009).

1.1.1. KEMIJSKA STRUKTURA I KLASIFIKACIJA FLAVONOIDA

Prema Erlund (2004) flavonoidi se sastoje od dva benzenska prstena (prsten A i B) koji su povezani pirenskim prstenom (prsten C). Oni spojevi koji sadrže hidroksilnu skupinu u poziciji C-3 pirenskog prstena nazivaju se 3-hidroksiflavonoidi (flavonoli, antocijanidini, leukoantocijanidini, katehini), a oni koji nemaju hidroksilnu skupinu na C-3 su 3-deoksiflavonoidi (flavanoni i flavoni). Daljnja klasifikacija temelji se na postojanju i raspodjeli dodatnih hidroksilnih i metilnih skupina. Izoflavonoidi razlikuju se od ostalih skupina jer je prsten B povezan s prstenom C na položaju C-3, a ne na položaju C-2, kako je uobičajeno. Izdvajaju se antocijanidini i katehini kojima na položaju C-4 nedostaje karbonilna skupina.

Tablica 1 prikazuje strukturu i podjelu flavonoida te primjer spoja za svaku pojedinu skupinu.

Tablica 1. Strukturna podjela flavonoida

Podjela flavonoida	Kemijska struktura	Primjeri
3 - HIDROKSIFLAVONOIDI		
flavonoli		miricetin kvercetin
antocijanidini		pelargonidin malvidin
leukoantocijanidini		leukomalvidin leukodelfinidin
katehini		katehin epikatehin
3-DEOKSIFLAVONOIDI		
flavanoni		hesperetin naringenin
flavoni		luteolin apigenin
IZOFLAVONOIDI		
izoflavonoidi		ganistein daidzein

Flavonoidi su prisutni u biljkama uglavnom u obliku glikozida. Različiti monosaharidi i njihove kombinacije poput disaharida i trisaharida mogu biti povezani preko hidroksilne skupine (na položaju C-3 ili C-7) flavonoidnog aglikona u strukturu glikozida. Radi se uglavnom o O-glikozidima, a najčešći šećeri koji formiraju istu vezu su D-glukoza i L-ramnoza. Dakle, brojne kombinacije različitih aglikona i šećera rezultiraju velikim brojem različitih flavonoida (Erlund, 2004).

1.1.2. FLAVONOIDI U PREHRANI

Flavonoidi su često zastupljeni u voću i povrću, a tip flavonoida varira među vrstama. Tablica 2 prikazuje neke flavonoide i njihove prehrambene izvore.

FLAVONOLI

Najčešći flavonol kojeg ljudi unose prehranom je kvercetin. Nalazimo ga u voću i povrću, a u najvećoj koncentraciji prisutan je u crvenom luku. Japanci i Nizozemci unose kvercetin uglavnom kroz čaj, Talijani kroz vino, dok Amerikanci, Finci i Grci unose najviše kvercetina koji je prisutan u luku i jabukama. Kvercetin dolazi u raznim glikozidnim oblicima koji se razlikuju ovisno o izvoru koji ga sadrži. U luku nalazimo kvercetin-4'-glukozid i kvercetin-3,4'-glukozid, a u jabukama galaktozide kvercetina. Crveni luk je namirnica koja se ne konzumira u velikim količinama, ali je važan izvor zbog izrazito visoke koncentracije kvercetina, dok se vino i čaj konzumiraju znatno češće, ali je udio kvercetina u njima relativno manji.

Ostali flavonoli koje nalazimo u prehrambenim sirovinama su kemferol kojeg ima u brokuli, miricetin iz bobičastog voća i izoramnetin koji je zastupljen u luku.

FLAVANONI

Flavanoni su zastupljeni gotovo samo u citrusnom voću, gdje su najviše zastupljeni u čvrstom tkivu, a manje koncentracije nađene su i u soku. Hesperidin (hesperetin-7-rutinozid) i narirutin (naringenin-7-rutinozid) su glavni flavonoidi naranča i mandarina, dok je primjerice naringin (naringenin-7-neohesperozid) najzastupljeniji u grejpu. Niske koncentracije naringenina pronalazimo i u rajčici.

Tablica 2. Glavni flavonoidi u prehrani i njihovi izvori (Erlund, 2004)

Flavonoid	**Izvor**	**Sadržaj aglikona (mg/kg)**
FLAVONOL		
kvercetin-3,4'-glukozid	crveni luk	284 – 486
kvercetin-3-glukozid		
kvercetin-3-ramnoglukozid (rutin)	crni čaj	10 – 25
kvercetin-3-galaktozid	jabuka	21 – 72
FLAVON		
luteolin-7-apiozilglukozid	crveni papar	7 – 14
FLAVANON		
hesperetin-7-ramnoglukozid (hesperidin)	sok naranče	116 – 201
naringenin-7-ramnoglukozid (narirutin)		15 – 42
naringenin-7-ramnoglukozid (naringin)	sok grejpa	68 – 302
naringenin-7-ramnoglukozid (narirutin)		
FLAVONOLI		
(+)-katehin	jabuka	4 – 16
(-)-epikatehin		67 – 103
(+)-katehin	crno vino	16 – 53
(-)-epikatehin		9 – 42
(epi)katehin i njegovi galati	crni čaj	102 – 418
ANTOCIJANINI		
cijanidin-3-glukozid	crni ribiz	760
delfinidin-3-glukozid		590
IZOFLAVONI		
genistein-7-glikozid	soja	480
daidzein-7-glikozid		33

KATEHINI

Katehini se pojavljuju kao aglikoni ili su esterificirani s galnom kiselinom. Katehin i epikatehin značajno su zastupljeni u jabukama, kruškama, breskvama i grožđu, a najviše koncentracije katehina nađene su u čaju i crvenom vinu.

FLAVONI

Od flavona kroz hranu unosimo najviše apigenin i luteolin. Značajno su zastupljeni u samo nekoliko biljaka koje se konzumiraju, a najznačajniji izvori su crvena paprika i celer.

ANTOCIJANIDINI

Najznačajniji antocijanidini su pelargonidin, cijanidin, delfinidin i malvidin, a njihovi glikozidi odgovorni su za crvenu, plavu i ljubičastu boju različitog voća. Zastupljeni su primjerice u jabukama, patlidžanu i bobičastom voću.

IZOFLAVONOIDI

Najviše koncentracije izoflavonoida nađene su u sojinim produktima, nešto manje u mahunarkama, a najniže koncentracije ovih flavonoida nalaze se u drugom voću i povrću. Najznačajniji su genistein i daidzein koje unosimo kroz mahunarke.

1.1.3. METABOLIZAM FLAVONOIDA

Flavonoidi koji bivaju apsorbirani iz gastrointestinalnog trakta pokazuju brojne farmakološke učinke, ali prije toga se metaboliziraju endogenim enzimima i enzimima mikroorganizama (Hodek, 2012). Dakle, flavonoidi u cirkulaciji obično nisu istovjetni nativnom obliku flavonoida koje unosimo hranom. Metabolizam flavonoida čine reakcije prve i druge faze. Glikozidi flavonoida prvo podliježu enzimskoj hidrolizi od strane β-glukozidaza nakon čega se nastali aglikon može apsorbirati. Spomenuta reakcija hidrolize katalizirana je glikozidazama prisutnim u biljkama koje konzumiramo, onima koje su proizvedene u stanicama crijevne mukoze ili glikozidazama crijevne mikroflore. Većina flavonoida koje su preuzeli enterociti bivaju metabolizirani prije nego dospiju u portalnu cirkulaciju. Flavonoidi apsorbirani u duodenum ponovo ulaze u cirkulaciju kao konjugati nastali u reakcijama metilacije, sulfokonjugacije, konjugacije s glukuronidima ili glicinom u slučaju fenolnih

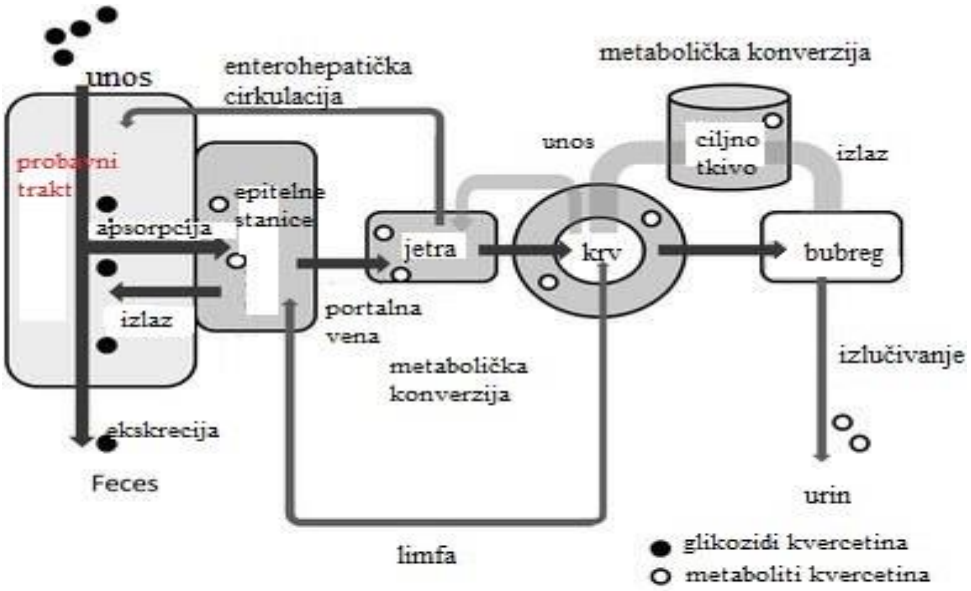
kiselina. Opseg glukuronidacije ovisi o kemijskoj strukturi pojedinog spoja te je tako izrazito osjetljiva na položaje hidroksilnih skupina na B prstenu. Iako je procijenjeno da u tankom crijevu možemo pronaći manje od 1% mase citokroma P450 iz jetre, studije na ljudima pokazuju da enterički citokromi P450 značajno doprinosi metabolizmu prvog prolaza ksenobiotika. Samo će nekolicina flavonoida unesenih hranom (5-10%) u plazmu ući kao nepromijenjeni flavonoid iz biljke. Još uvijek neapsorbirani flavonoidi kreću se prema donjih dijelovima kolona gdje bivaju metabolizirani crijevnom mikroflorom.

Dalje se metabolizam nastavlja u jetri gdje glukozidaze odcjepljuju konjugate. Hidroksilne skupine flavonoida dostupne su za metilaciju COMT-om, a hidroksimetilne skupine demetilaciji uz CYP. Uz *O*-demetilaciju metoksiliranih flavonoida sustav citokrom P450 monooksigenaza također katalizira *C*-hidroksilaciju skeleta flavonoida. Također, u jetri je moguća konjugacija sa sulfatom i glukuronatom, ali se dekonjugacija do slobodnog aglikona brzo odvije. Važno je napomenuti da tijek metabolizma ovisi o dozi flavonoida: ako se radi o većoj dozi unesenih flavonoida, najveći dio će se metabolizirati u jetri, dok prilikom konzumiranja manjih doza flavonoida glavnu ulogu metabolizatora ima tanko crijevo. Manji dio metabolizma flavonoida poput deglikozilacije mogu obavljati druga tkiva.

Iz jetre se metaboliti flavonoida luče u žuč (što označava povratak prema tankom crijevu) te transferiraju u plazmu kako bi bili spremni za bubregom posredovanu eliminaciju. Značaj enterohepatičke cirkulacije ovih spojeva jest u tome da može osigurati značaju retenciju flavonoida u organizmu čovjeka.

Ingestirane flavonoide organizam eliminira urinom ili fecesom. Kada mikroflora razbije skelet flavonida, konačni produkt je ugljikov dioksid koji se eliminira plućima, a karboksilne kiseline mogu se eliminirati znojem. Flavonoidi se pretežno eliminiraju u formi glukokonjugata i sulfokonjugata. Urinarnu ekskreciju preferiraju mali konjugati kao što su monosulfati, dok oni veći preferiraju transport putem žuči.

Slika 1 pojednostavljeno prikazuje metabolizam flavonoida na primjeru kvercetina.



Slika 1. Prikaz procesa metabolizma flavonoida (preuzeto s pubs.rsc.org)

1.2. CITOKROM P450

Citokrom P450 skupno je ime za velik broj različitih skupina hem-tiolatnih enzima (više od 20.000), koji su prisutni u različitim oblicima života: biljkama, insektima, ribama, sisavcima, mikroorganizmima, pa i virusima. Po svom su enzimskom djelovanju tipične monoksigenaze koje mogu djelovati kao oksidaze i peroksidaze, a kataliziraju i druge reduktivne reakcije.

Enzimi citokrom P450 imaju molekulsku masu oko 57 kDa te su građeni od oko 500 aminokiselinskih ostataka i sadrže jedan ekvivalent hemske skupine po polipeptidnom lancu. To su hemproteini kod kojih je apoprotein, preko sumpora iz cisteinskog ostatka, aksijalno koordiniran na atom željeza porfirinskog prstena (protoporfirin IX).

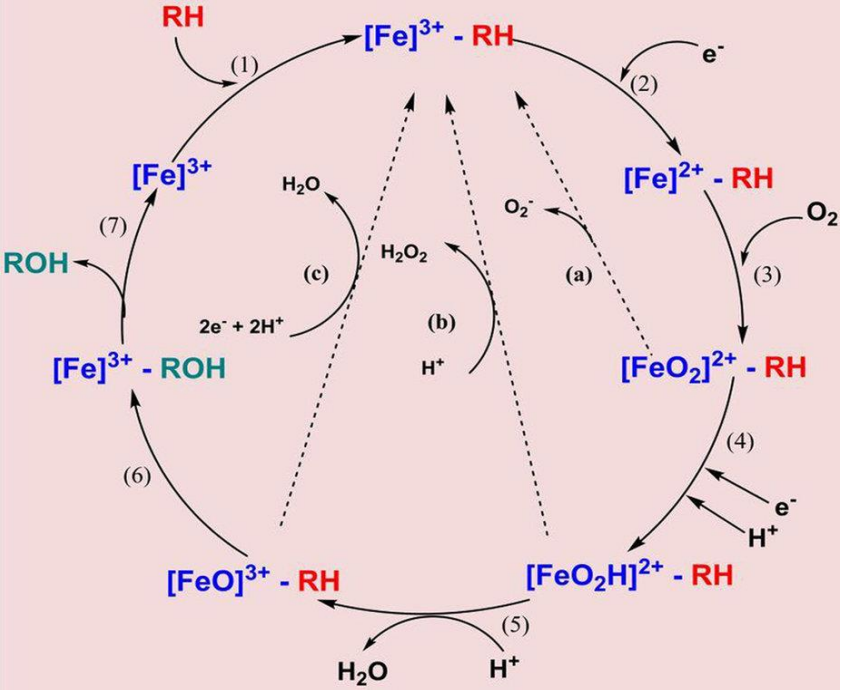
Određivanje strukture gena i proteina omogućilo je njihovu identifikaciju i strukturnu karakterizaciju, te su geni i enzimi na temelju strukturnih značajki svrstani u porodice i potporodice. Na temelju sličnosti slijeda aminokiselina u proteinskom lancu pojedini enzimi klasificirani su unutar superporodicu CYP. Enzimi citokrom P450 koji pripadaju istoj porodici imaju sličan slijed aminokiselina u lancu više od 40%, a oni koji pripadaju istoj potporodici imaju sličnost u slijedu aminokiselina više od 55%. Na koncu pojedinačni enzim posjeduje sličnost slijeda aminokiselina više od 98%. U čovjeka je identificirano i strukturno karakterizirano 57 funkcionalnih enzima citokroma P450, koji su klasificirani u 18 porodica i

44 potporodice. Od 57 funkcionalnih enzima citokroma P450 u čovjeka, pet enzima citokrom P450 (CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4) kataliziraju 90-95% reakcija u kojima kao supstrati sudjeluju lijekovi. Od toga gotovo 35% otpada na enzim CYP3A4. Za metabolizam ksenobiotika važna je značajka polimorfizam enzima CYP2C19 i CYP2D6 te indukcija i inhibicija aktivnosti enzima koju mogu prouzrokovati drugi ksenobiotici (Rendić i Medić-Šarić, 2013).

1.2.1. MEHANIZAM REAKCIJE

Enzim citokrom P450 je vezan za membranu endoplazmatskoga retikuluma te je blisko vezan na NADPH-citokrom P450 reduktazu koja pripada u skupinu flavoproteina koji sadrži 1 mol flavinadenindinukleotida (FAD) i 1 mol flavinmononukleotida (FMN) po molu apoproteina. Glavna uloga ovoga sustava je prijenos 2 elektrona u dva koraka na P450 sustav, čime se omogućuje oksidacija ksenobiotika. Reduktaza omogućava redukciju trovalentnog željeza i aktivaciju molekule kisika. Osim NADPH-reduktaze sustav sadrži i citokrom b_5, mali membranski hemoprotein s pripadajućom nikotinamidadenindinukleotid (NADH)-ovisnom reduktazom koji također može služiti kao alternativni izvor elektrona za P450.

U idealnim uvjetima, ksenobiotik se veže za citokrom P450 dok je željezo u oksidiranom, Fe^{3+} obliku. Većina se ksenobiotika veže za hidrofobni proteinski nastavak citokroma koji je dovoljno blizu molekuli hema kako bi moglo doći do interakcije između kisika i konformacijske promjene molekule ksenobiotika. U tom slučaju, željezo prelazi iz stanja niskog spina u stanje visokoga spina. Dalje slijedi prva redukcija elektronom koji donira NADPH-reduktaza. Ion željeza reducira se u Fe^{2+} oblik, nakon čega slijedi vezanje molekulskog kisika za taj kompleks te pregradnja kompleksa. Slijedi još jedna redukcija elektronom, pri čemu jedan kisikov atom ulazi u sastav ksenobiotika, a drugi se veže s vodikovim ionom te se formira molekulu vode. Nastaje aktivni oblik enzima $(FeO)^{3+}$ -RH koji reagira sa supstratom prevodeći ga u radikalnu formu na koju se veže hidroksilna skupina iz $(FeOH)^{3+}$. Nastali oksidirani produkt disocira s citokroma, a željezo u oksidiranom stanju spremno je za novi ciklus (Slika 2; Zangar i sur., 2004).

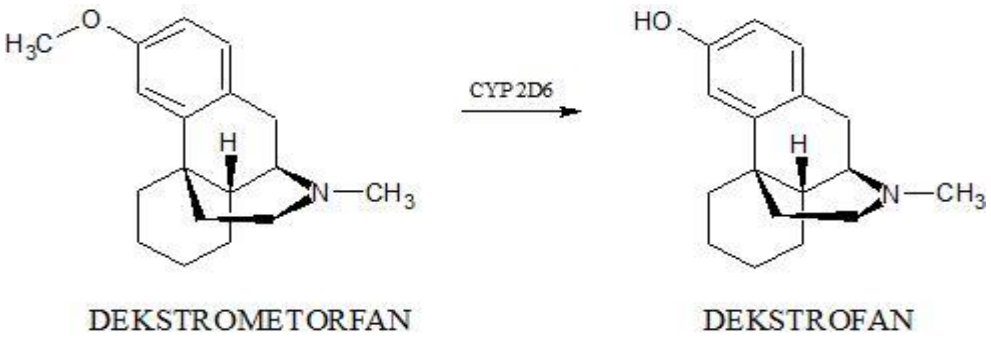


Slika 2. Prikaz reakcija oksigenacije supstrata kataliziranih citokromima P450 (preuzeto s www.researchgate.net)

1.2.2. CITOKROM P450 2D6

Sedamdesetih godina prošloga stoljeća područje farmakogenetike obilježilo je otkriće enzima citokrom P450 2D6 (dalje u tekstu CYP2D6), produkt transkripcije gena *CYP2D6*. Gen je smješten u blizini dva pseudogena citokroma P450 na kromosomu 22, a danas se zna da je izravno povezan u metabolizam više od 25% korištenih lijekova (Ingelman-Sundberg, 2005). U stanicama jetre na enzim CYP2D6 otpada oko 4% svih CYP enzima (Rendić, 1995). Istraženo je više od 80 varijanti gena *CYP2D6*, a rezultat polimorfizma gena su četiri fenotipa koja se razlikuju po brzini razgradnje lijekova: spori metabolizatori (engl. *poor*), intermedijarni metabolizatori (*intermediate*), brzi metabolizatori (*extensive*) te ultra brzi metabolizatori (*ultrarapid*) lijekova. Gen *CYP2D6* aktivira ili inaktivira ksenobiotik, stoga je potrebno dozu nekog lijeka prilagoditi pojedinom pacijentu s obzirom na alel gena *CYP2D6*. Posljedice polimorfizma, ako se koristi uobičajena doza lijeka, mogu biti ili nuspojave ili izostanak terapijskog učinka (Ingelman-Sundberg, 2005).

Fenotipizacija se za CYP2D6 najčešće provodi s dekstrometorfanom (Slika 3; Baumann i sur., 1988).



Slika 3. Marker reakcija za CYP2D6

Enzim je uključen u metabolizam velikog broja često propisivanih lijekova. Tablica 3 prikazuje neke od lijekova koje metabolizira navedni enzim te vrstu reakcije koja se odvija.

Tablica 3. Lijekovi po terapijskim skupinama i pripadajuća reakcija (Zanger, 2004)

Terapijska skupina	Lijek	Reakcija
Analgetici	hidrokodon	*N*-demetilacija
anti adhd lijekovi	atomoksetin	Aromatska hidroksilacija
Antiaritmici	propafenon	Aromatska hidroksilacija
antidementni lijekovi	galantamin	*O*-demetilacija
TCA	amitriptilin	benzilna hidroksilacija
ostali antidepresivi	paroksetin	demetilacija
Antidijabetici	fenformin	aromatska hidroksilacija
Antiestrogenici	tamoksifen	aromatska hidroksilacija
antihipertenzivi	gvanoksan	aromatska hidroksilacija
Antiemetici	ondansetron	aromatska hidroksilacija
Antihistaminici	prometazin	aromatska hidroksilacija
Antipsihotici	haloperidol	*N*-dealkilacija
betablokatori	timolol	*O*-dealkilacija
antagonisti kalcija	perheksilin	alifatska hidroksilacija
MAO inhibitori	amiflamin	*N*-demetilacija
vazodilatatori	cinarizin	aromatska hidroksilacija

Osim u metabolizmu ksenobiotika, enzim se ističe u metabolizmu endogenih supstrata važnih u funkciji sredošnjeg živčanog sustava kao što su steroidi i amini (Ingelman-Sunberg, 2005).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Flavonoidi su široko rasprostranjeni sekundarni metaboliti u biljkama s različitim metaboličkim funkcijama, a ljudi ih unose konzumacijom voća i povrća (Ferreyra, 2002). Za flavonoide koje unosimo prehranom dugo se smatralo da su korisni u prevenciji mnogih bolesti, od kojih je najvažnije spomenuti kardiovaskularne bolesti i rak. Međutim, bioraspoloživost im je niska, a ograničena je slabom apsorpcijom i ekstenzivnim metabolizmom. Poznato je da metabolizam flavonoida uključuje reakcije oksidacije i konjugacije, ali je vrlo malen broj sustavnih informacija o metabolizmu ovih spojeva u ljudi (Otake i sur, 2002).

Godine 1989. prvi je puta zabilježena interakcija komercijalno dostupnog soka od grejpa s blokatorom kalcijevih kanala felodipinom, a dovela je do povećane koncentracije felodipina u krvi i tako pojačala njegov učinak (Sica, 2006). Otkako je zabilježen izvještaj te interakcije, sve se više prikupljaju dokazi o potencijalnim interakcijama između lijekova i prehrambenih namirnica, pri čemu je važno spomenuti prikupljanje podataka o biljnim lijekovima i flavonoidima. Flavonoide i lijekove smatramo ljudskom organizmu stranim spojevima - ksenobioticima te su u njihov metabolizam uključeni isti ili slični enzimi. Ta činjenica implicira da su flavonoidi potencijalni modulatori metabolizma lijekova te posljedično imaju utjecaj na terapijski učinak lijeka (Hodek, 2012).

Svrha ovoga rada je ispitati metabolizam flavonoida i odrediti odvija li se posredstvom citokroma P450 2D6. Citokrom P450 2D6 jedan je od glavnih enzima koji su uključeni u metabolizam ksenobitoika (Guengerich, 2005). U ispitivanje je uzeto jedanaest flavonoida koji su prethodnim probiranjem na humanim jetrenim mikrosomima pokazali metabolizam posredovan citokromom P450. Metoda kojom identificiramo metabolite pojedinih flavonoida je tekućinska kromatografija spregnuta sa spektrometrijom masa (LC-MS) i UV-Vis detektorom. Služeći se podatcima dobivenih iz UV kromatograma, kromatograma izdvojenih iona i vremena zadržavanja analita na koloni, možemo uspješno zaključiti o prisutnosti metabolita pojedinog flavonoida i tako potvrditi reakciju biotransformacije posredovanu citokromom P450 2D6.

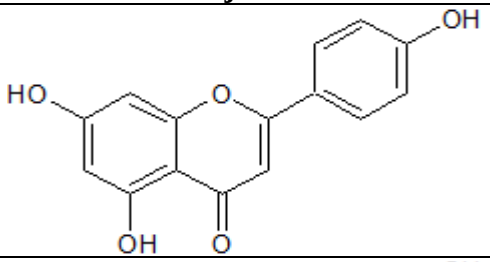
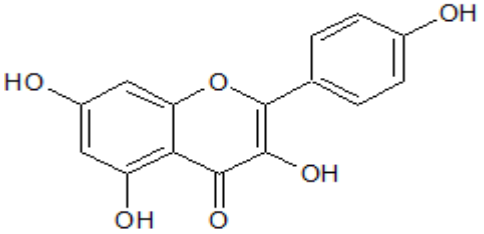
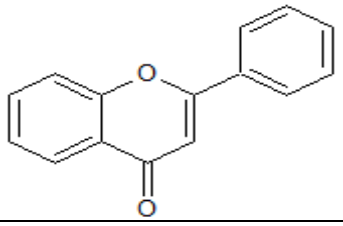
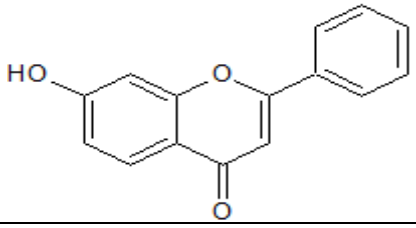
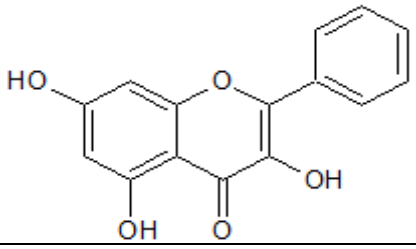
Prehrana bogata flavonoidima ima primjenu u prevenciji raznih bolesti te poboljšanju kvalitete života. Stoga se javlja se potreba za što više znanstvenih istraživanja flavonoida (http://www.naturalremedies.org).

3. MATERIJALI I METODE

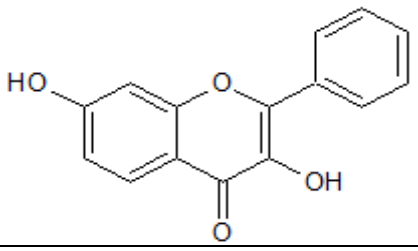
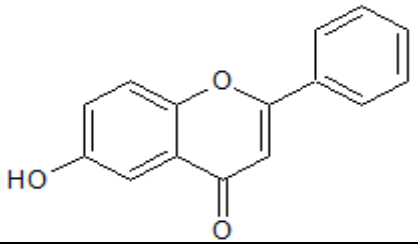
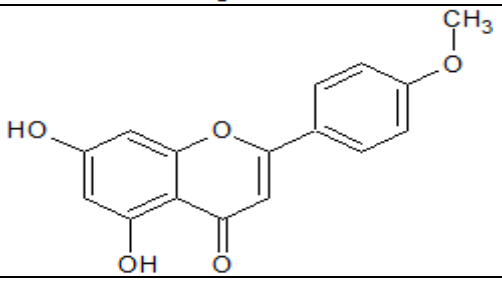
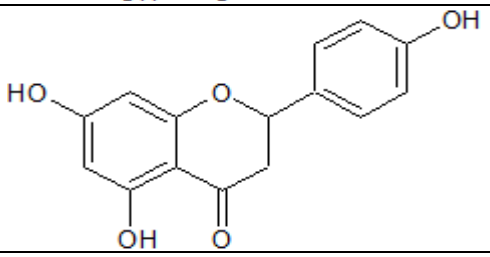
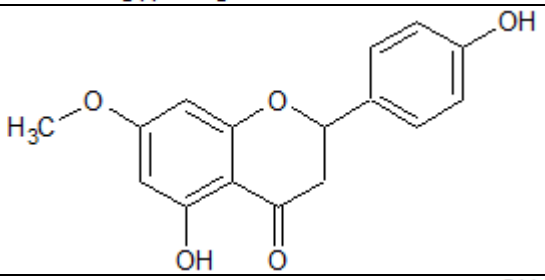
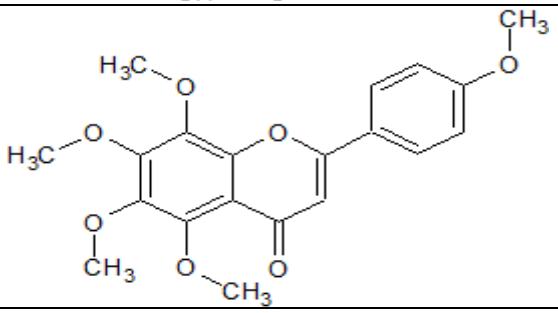
3.1. MATERIJALI

Metabolizam flavonoida ispitan je citokromom P450 2D6 na jedanaest različitih flavonoida. Prethodno je napravljeno probiranje tako što je trideset flavonoida inkubirano s humanim jetrenim mikrosomima te je jedanaest od njih pokazalo nastanak novih spojeva koji predstavljaju potencijalne metabolite. Tablica 4 prikazuje imena i strukture jedanaest ispitanih flavonoida.

Tablica 4. Ispitivani flavonoidi

Flavonoid	Kemijska struktura
APIGENIN	
KEMFEROL	
FLAVON	
7-HIDROKSIFLAVON	
GALANGIN	

Tablica 4. Ispitivani flavonoidi (*nastavak*)

Flavonoid	Kemijska struktura
3,7-DIHIDROKSIFLAVON	
6-HIDROKSIFLAVON	
AKACETIN	
NARINGENIN	
SAKURANETIN	
TANGERETIN	

Inkubacije

- Bakulosomi CYP2D6 koji sadržavaju NADPH-P450 reduktazu i P450 (10 pmol), volumen po inkubaciji: 10 μL
- Kalijev fosfat (pH=7,4, volumen po inkubaciji: 5μ, 50 mmol)
- Voda (do ukupnog volumena inkubacije od 100 μL: 69 μL)
- Generirajući sustav (volumen po inkubaciji: 15 μL):
    - glukoza-6-fosfat
    - glukoza-6-fosfat dehidrogenaza
    - $NADP^+$ u omjeru 100:50:2
- Acetonitril (volumen po inkubaciji: 100 μL)
- Smjesa flavonoida u metanolu (volumen po inkubaciji: 1 μL)

Oprema

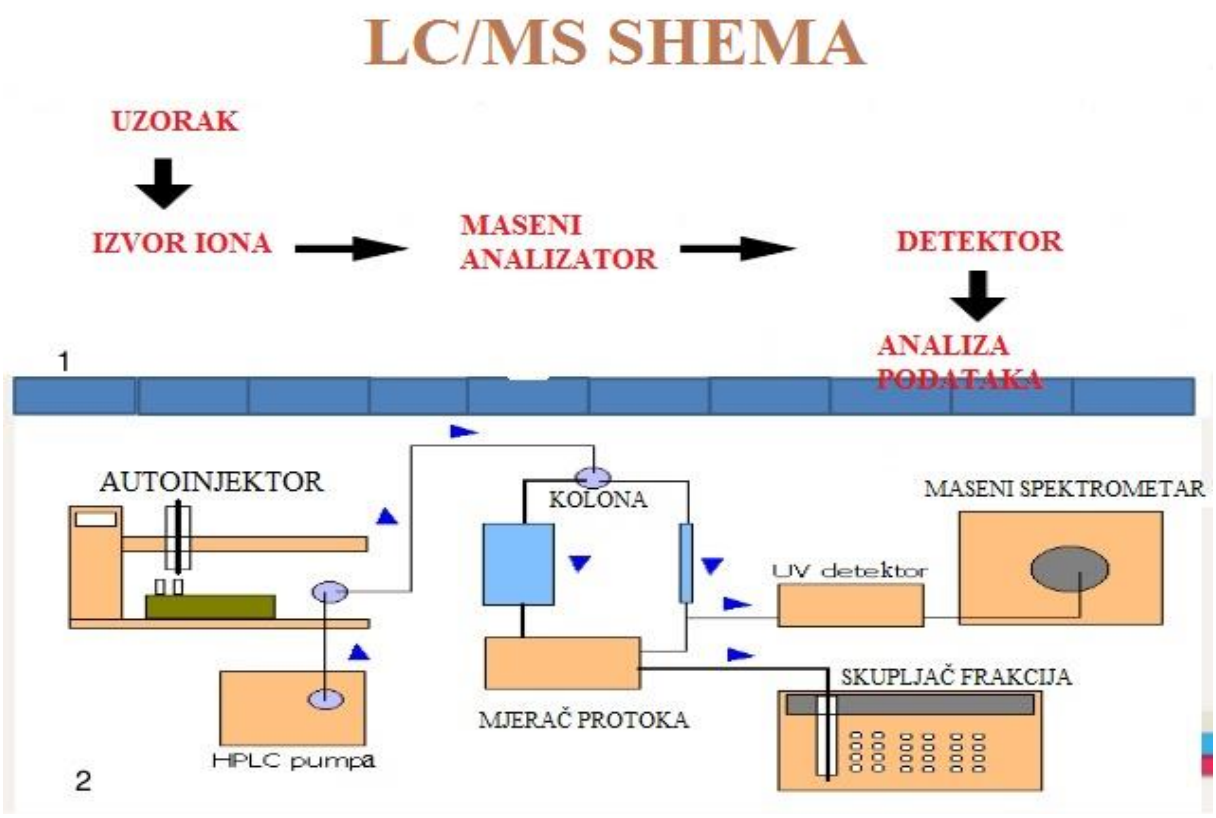
- Mikropipeta
- Epruvete

3.2. METODE

Provođenje inkubacija – procedura

- U epruvetu dodamo kalijev fosfat, vodu, enzim, supstrat
- Reakciju pokrećemo dodatkom generirajućeg sustava
- Inkubacija se provodi tijekom 30 min na 37°C u vodenoj kupelji uz miješanje
- Reakciju zaustavljamo dodatkom ledenog acetonitrila i centrifugiramo
- Bistri sloj podvrgne se LC-MS analizi

Metoda koja je omogućila potvrdu metabolita pojedinih flavonoida jest tekućinska kromatografija spregnuta sa spektrometrijom masa (LC/MS) i UV-Vis detektorom. To je analitička tehnika koja kombinira moć razlučivanja tekućinske kromatografije i sposobnost detekcije specifičnosti masenom spektrometrijom. Tekućinska kromatografija odvaja pojedine komponente uzorka te ih uvodi u maseni spektrometar koji stvara i detektira ione od interesa. Analiza LC/MS-om osigurava informacije o molekulskoj masi, strukturi i kvantificira pojedine komponente uzorka (Slika 4).



Slika 4. Shematski prikaz LC/MS analize (preuzeto s www.slideshare.net)

U masenoj spektroskopiji nužna je ionizacija. Postoji nekoliko načina ionizacije analita. Jedna od njih je elektronska ionizacija u kojoj je ispareni analit podvrgnut "bombardiranju" energijskim elektronima (tipično 70 eV). Tijekom posljednjih desetljeća razvijeno je nekoliko ionizacijskih tehnika za analize nehlapljivih i termički nepostojanih spojeva, uz ionizaciju elektroraspršenjem (engl. *electrospray ionization*, ESI) i ionizaciju potpomognutu matriksom uz desorpciju laserskim zračenjem (engl. *matrix-assisted laser desorption ionization*, MALDI). ESI je korištena za potrebe ovoga rada, a ioni se stvaraju iz tekućine pri atmosferskom tlaku. Smatra se blagom ionizacijskom tehnikom koja ne razara čak ni nekovalentno vezane biomolekularne komplekse.

TOF-maseni analizatori, koji su u načelu jedan od najjednostavnijih uređaja u masenoj spektrometriji, odvajaju ione na temelju njihove brzine koja je ovisna o masi. Svi se ioni odjednom stvaraju u ionskom izvoru i zatim se ubrzavaju kroz fiksni potencijal. Zbog toga ioni male mase pristižu u detektor prije od iona velike mase (Seger i Griesmacher, 2007).

Uz TOF korišten je i UV-Vis detektor. Analit se dokazuje tako što se mjeri količina apsorbiranog svjetla na različitim valnim duljinama i uspoređuje sa standardom. UV detektori koji mjere apsorpciju na različitim valnim duljinama su osjetljiviji (HPLC UV detektor, www.biocompare.com).

Sljedeći podatci se odnose na LC/MS analizu.

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

Interpretacija rezultata

UV kromatogramom inkubacijske smjese za pojedini flavonoid bez dodatka generirajućeg sustava potvrđujemo identitet flavonoida, a uz pomoć kromatograma izdvojenog iona očitavamo molekulsku formulu i masu.

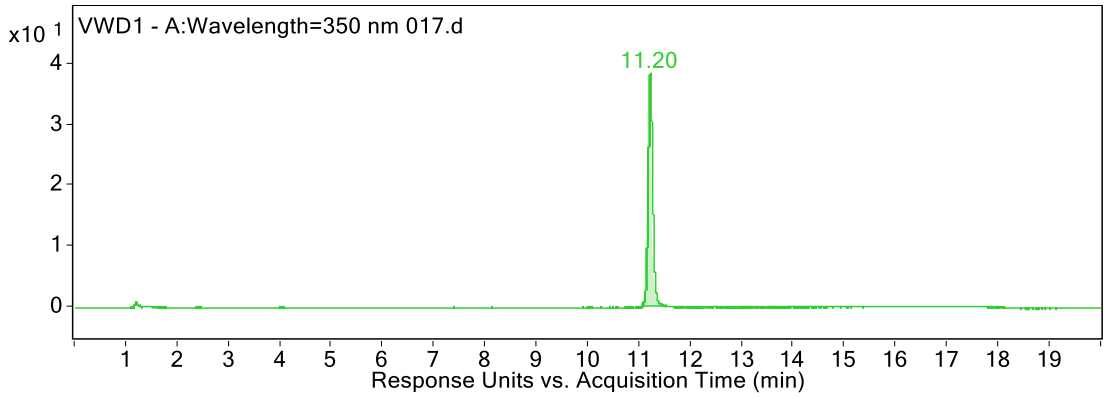
Ako UV kromatogram nakon dodatka generirajućeg sustava prikazuje određene pikove kojima se u kromatogramu izdvojenog iona odredi masa i molekulska formula, možemo potvrditi da je biotransformacija pojedinog flavonoida posredovana citokromom P450 2D6 i zaključiti o kojoj je reakciji riječ.

4. REZULTATI I RASPRAVA

U poglavlju Materijali i metode tablicom (Tablica 4) je prikazano koji su flavonoidi uzeti u analizu. Od analiziranih jedanaest flavonoida, za četiri flavonoida potvrdili smo reakcije biotransformacije posredovane citokromom P450 2D6. Detaljan prikaz rezultata opisat će se na primjeru akacetina.

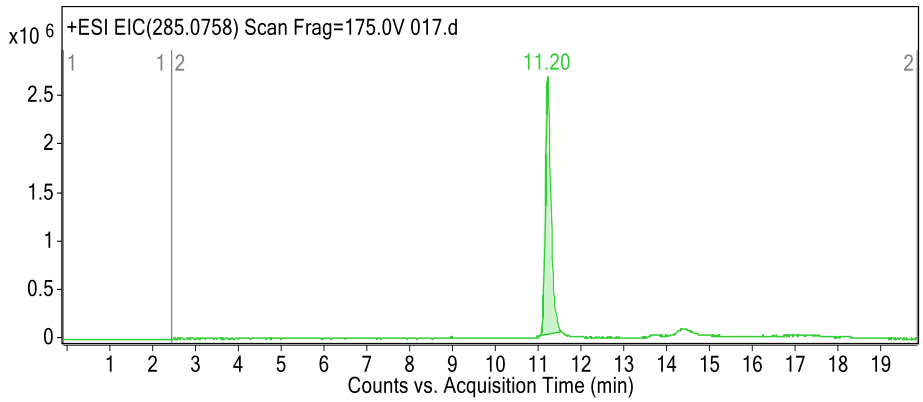
4.1. AKACETIN

UV kromatogramom smjese za akacetin prije dodavanja generirajućeg sustava potvrdili smo da je u smjesi flavonoid akacetin, čije je vrijeme zadržavanja na ovoj koloni 11,20 minuta (Slika 5).



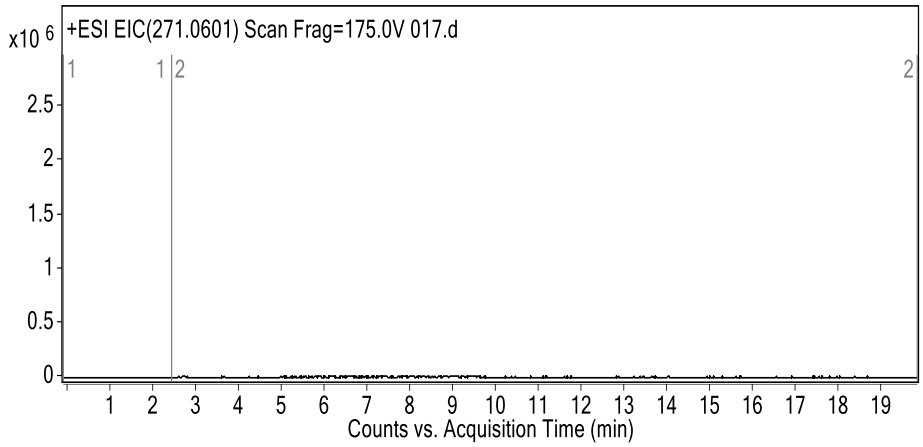
Slika 5. UV kromatogram inkubacijske smjese za akacetin bez dodanog generirajućeg sustava

Kromatogram izdvojenog iona daje nam podatak o omjeru mase i naboja za akacetin koji iznosi 285,0785, a pik koji se pojavljuje u 11,20 minuta odgovara akacetinu (Slika 6).



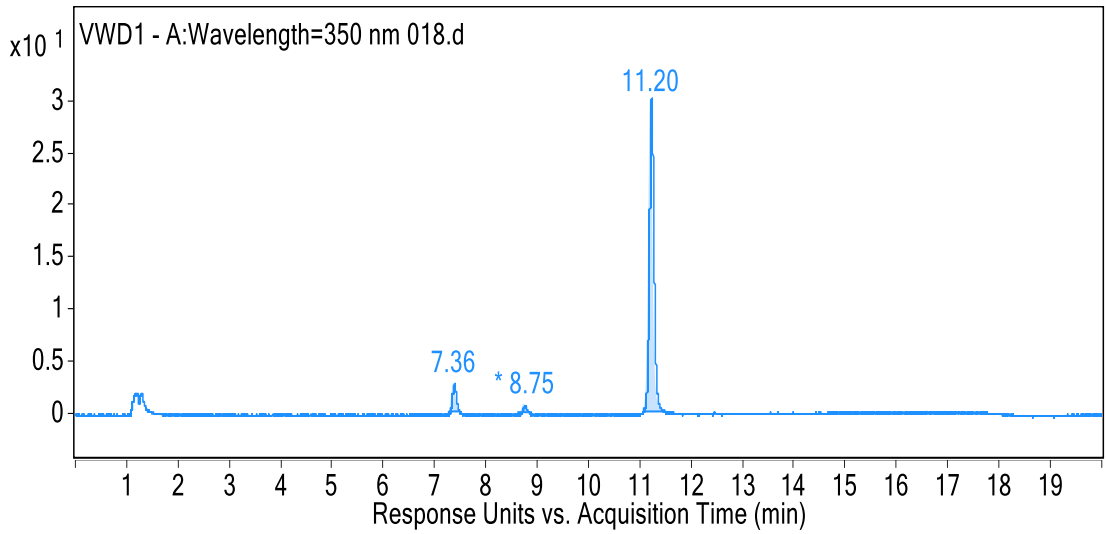
Slika 6. Kromatogram izdvojenog iona (eng. *Extracted Ion Chromatogram*, EIC) akacetina (*m/z* = 285,0758) inkubacijske smjese za akacetin bez dodanog generirajućeg sustava

Budući da generirajući sustav osigurava koenzim potreban za pokretanje reakcije, za metabolit akacetina – apigenin (m/z = 271,0601) na kromatogramu izdvojenog iona prije dodatka generirajućeg sustava ne pronalazimo odgovarajući pik (Slika 7).



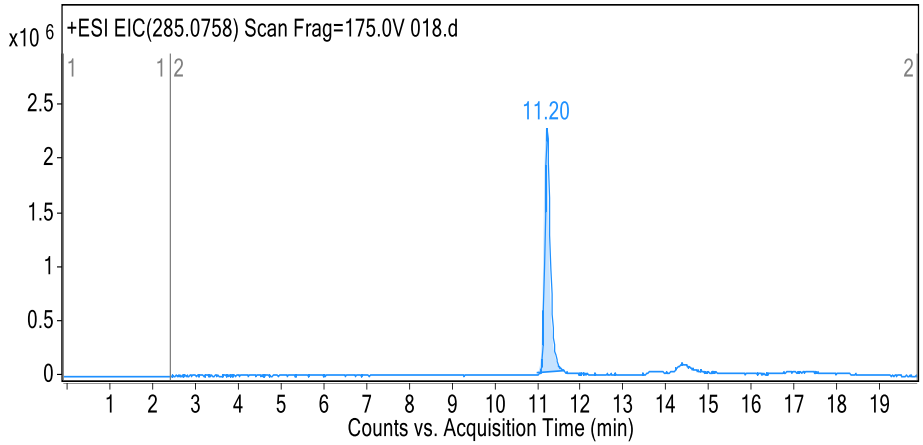
Slika 7. Kromatogram izdvojenog iona (eng. *Extracted Ion Chromatogram*, EIC) apigenina (m/z = 271,0601) inkubacijske smjese za akacetin bez dodanog generirajućeg sustava

Nakon dodatka generirajućeg sustava UV kromatogram daje informacije o tri značajna analita sa vremenima zadržavanja: 7,36 minuta, 8,75 minuta i 11,20 minuta. Najveći pik označava akacetin koji se s kolone eluirao posljednji (Slika 8).



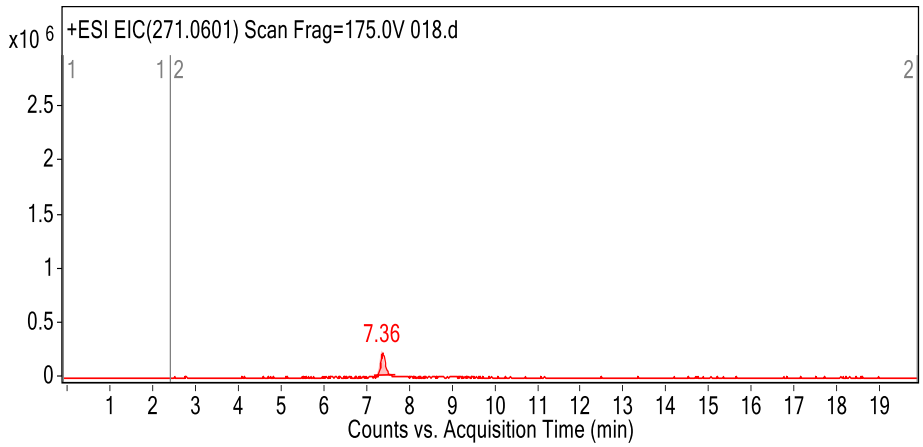
Slika 8. UV kromatogram inkubacijske smjese za akacetin s dodanim generirajućim sustavom

Kromatogram izdvojenog iona akacetina (*m/z* = 285,0758) nakon dodatka generirajućeg sustava prikazan je na Slici 9.



Slika 9. Kromatogram izdvojenog iona (eng. *Extracted Ion Chromatogram*, EIC) akacetina (m/z = 285,0758) inkubacijske smjese za akacetin s dodanim generirajućim sustavom

Kromatogram izdvojenog iona apigenina (*m/z* = 271,0601) nakon dodatka generirajućeg sustava u reakcijsku smjesu potvrđuje da je iz flavonoida akacetina u reakciji biotransformacije posredovane citokromom P450 2D6 nastao metabolit apigenin čije je vrijeme zadržavanja na koloni 7,36 minuta (Slika 10).



Slika 10. Kromatogram izdvojenog iona (eng. *Extracted Ion Chromatogram*, EIC) apigenina (m/z = 271,0601) inkubacijske smjese za akacetin s dodanim generirajućim sustavom.

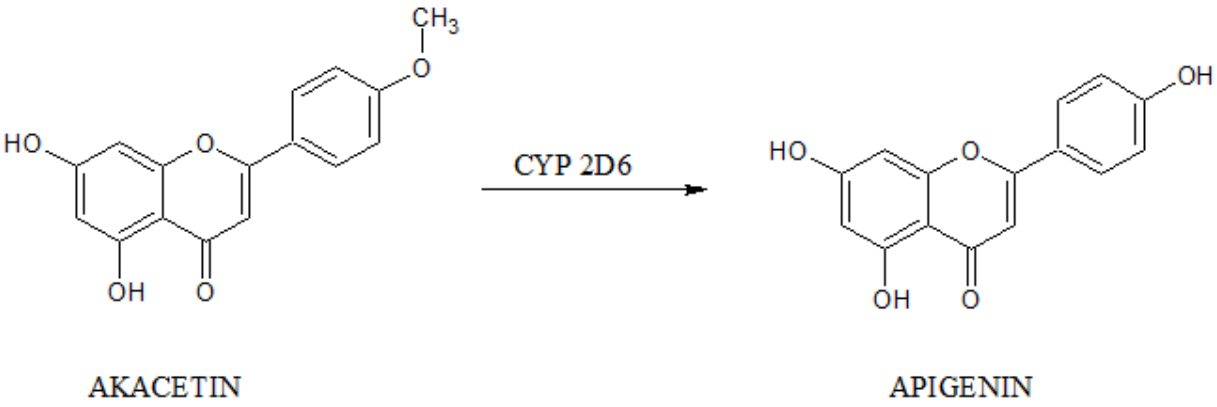
LC/MS tehnika osim podataka o identifikaciji analita, osigurava i podatke o molekulskoj formuli pojedinoga analita. Tako po završetku analize imamo sljedeće podatke za akacetin:

- Vrijeme zadržavanja: 11,20 minuta
- Molekulska masa: 285,0758
- Molekulska formula: $C_{16}H_{12}O_5$

Dobiveni su i podatci za apigenin:

- Vrijeme zadržavanja: 7,36 minuta
- Molekulska masa: 271,0601
- Molekulska formula: $C_{15}H_{10}O_5$

Razlika u molekulskim masama akacetina i apigenina je 14,0157, a u molekulskim formulama razlikuju se za CH_2 skupinu te zaključujemo da je posredstvom citokroma P450 2D6 došlo do demetilacije akacetina te je nastao apigenin (Slika 11).

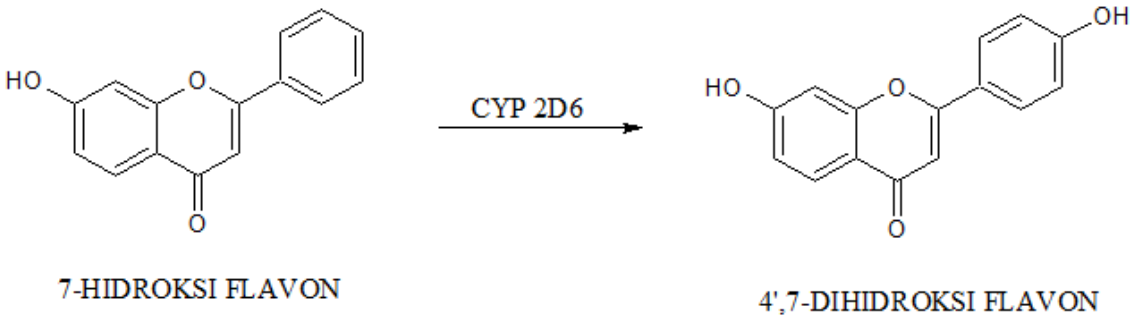


Slika 11. Demetilacija akacetina

Apigenin je flavon pronađen u povrću, začinima i narančama, a ističe se po antikarcinogenim, protuupalnim i antimutagenim svojstvima te je zbog toga važan za procjenu potencijalnih zdravstvenih učinaka pojedinih prehrambenih namirnica. Prethodno je pokušano odrediti metabolite apigenina u urinu kod ljudi nakon uzimanja ekstrakta kamilice koji sadrži apigenin. Međutim, zbog nedovoljne specifičnosti i osjetljivosti korištene metode, pokus nije uspješno završio. Kasnije se uz pomoć osjetljivijih metoda pokazalo da je u urinu glodavaca prisutan 4′-metilirani akacetin, tj. apigenin (Nielsen i Dragsted, 1998).

4.2. 7-HIDROKSIFLAVON

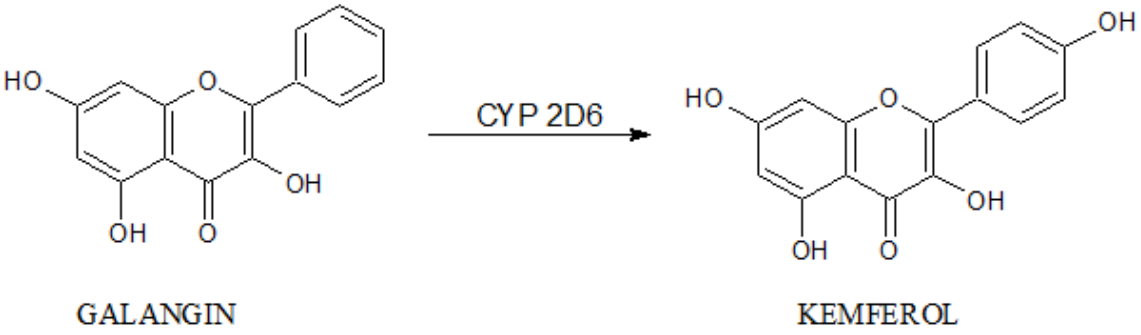
Analizom podataka kako je prikazano na primjenu akacetina, LC/MS tehnikom detektirali smo za flavonoid 7-hidroksiflavon ($C_{15}H_{10}O_3$, *m/z* = 238,0633) metabolit čija je formula $C_{15}H_{10}O_4$ (*m/z* = 255,0652, a nastao je reakcijom hidroksilacije posredstvom citokromom P450 2D6 (Slika 12).



Slika 12. Hidroksilacija 7-hidroksi flavona

4.3. GALANGIN

Analizom podataka kako je prikazano na primjenu akacetina, LC/MS tehnikom detektirali smo za flavonoid galangin (*m/z* = 270,0531, $C_{15}H_{10}O_5$) metabolit koji nastaje reakcijom hidroksilacije, a katalizira je citokrom P450 2D6 (Slika 13). Metabolit ima molekulsku formulu $C_{15}H_{10}O_6$, *m/z* = 286,0474, te je poznat pod imenom kemferol.



Slika 13. Hidroksilacija galangina

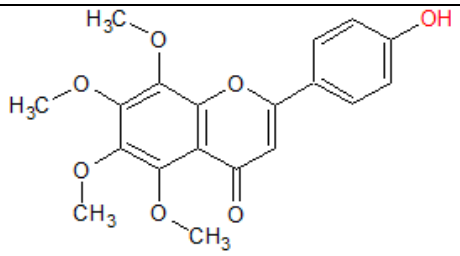
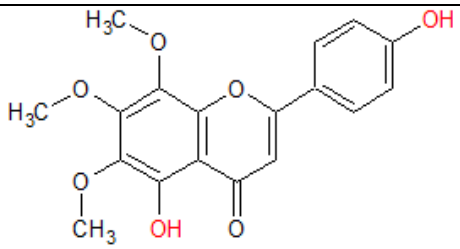
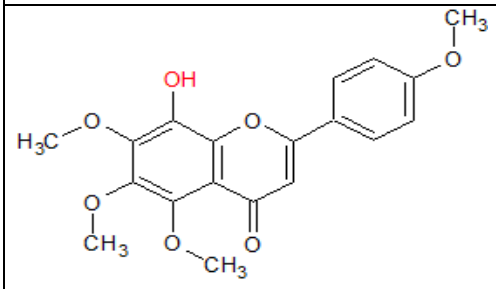
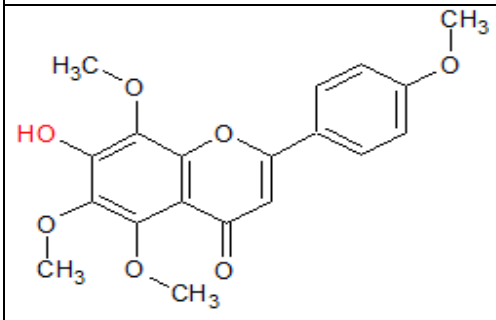
Galangin je prisutan u propolisu (Quiroga i sur., 2006) i u začinu galanga *(Alpinia officinarum;* Matsuda i sur., 2006). Studije govore o njegovoj potencijalnoj antikarcinogenoj i

antioksidativnoj aktivnosti. Ekstenzivno se oksidira na poziciji 4' do kemferola. Reakciju većinom katalizira CYP1A2 i CYP2C9 (Otake i Walle, 2002).

4.4. TANGERETIN

Analizom podataka kako je prikazano na primjenu akacetina, LC/MS tehnikom detektirali smo za flavonoid tangeretin četiri različita metabolita, a nastali su posredstvom citokroma P450 2D6. Tablica 5 prikazuje predložene strukture metabolita tangeretina te reakciju kojom su nastali.

Tablica 5. Metaboliti tangeretina

Struktura	Formula	Ime	Reakcija
	$C_{19}H_{18}O_7$	4'-OH-tangeretin	demetilacija tangeretina na položaju 4'
	$C_{18}H_{14}O_7$	4',5-diOH-tangeretin	demetilacija tangeretina na položaju 4' i 5
	$C_{19}H_{17}O_7$	8-OH-tangeretin	demetilacija tangeretina na položaju 8
	$C_{19}H_{18}O_7$	7-OH-tangeretin	demetilacija tangeretina na položaju 7

Za preostale analizirane flavonoide (apigenin, kemferol, flavon, 3,7-dihidroksiflavon, 6-hidroksiflavon, naringenin i sakuranetin) LC/MS analizom nisu potvrđene reakcije biotransformacije posredovane citokromom P450 2D6.

5. ZAKLJUČAK

Tekućinska kromatografija spregnuta sa spektrometrijom masa (LC-MS) i UV-Vis detektorom omogućuje pouzdano detektiranje metabolita pojedinog flavonoida. Nakon provedene analize dobivamo kromatograme koji nam daju informacije o identitetu spoja, njegovoj molekulskoj masi te o vremenu zadržavanja na koloni.

Generirajući sustav čine glukoza-6-fosfat, glukoza-6-fosfat dehidrogenaza i $NADP^+$, a njihovim dodatkom u reakcijski sustav osigurava se koenzim potreban za reakcije oksigenacije katalizirane citokromom P450. Kromatogrami koji prikazuju stanje reakcijskog sustava prije dodatka generirajućeg sustava služe nam kao potvrda identiteta ispitivanoga flavonoida. Kromatogrami koji su snimljeni nakon dodatka generirajućeg sustava u reakcijsku smjesu prikazuju potencijalne metabolite. Usporedbom molekulskih formula metabolita i flavonoida možemo zaključiti o vrsti reakcije koja se odvila posredstvom citokroma P450 2D6.

Za potrebe ovoga rada ispitano je jedanaest flavonoida koji su prethodnim probiranjem na humanim jetrenim mikrosomima pokazali metabolizam posredovan citokromima P450. Ispitani su sljedeći flavonoidi: apigenin, kemferol, flavon, 7-hidroksi flavon, galangin, 3,7-hidroksiflavon, 6-hidroksiflavon, akacetin, naringenin, sakuranetin i tangeretin. Za četiri flavonoida pokazano je da se njihova biotransformacija do hidrofilnijih metabolita odvija posredstvom citokroma P450 2D6. Navedeni enzim u reakciji sa 7-hidroksiflavonom daje hidroksilirani metabolit, u reakciji s galanginom također hidroksilirani metabolit - kemferol, u reakciji hidroksilacije s akacetinom daje novi flavonoid apigenin, a u reakcijama demetilacije s tangeretinom daje 4 različita metabolita, od kojih je jedan demetiliran na dvije pozicije.

Citokrom P450 po svom su djelovanju tipične monooksigenaze, a na analiziranim flavonoidima najčešće posreduju u reakcijama demetilacije i hidroksilacije.

Tako je pokazano da se put biotransformacije ova četiri flavonoida odvija posredstvom citokroma P450 2D6, što je vrlo važna informacija za osobe koje koriste lijekove koji se metaboliziraju istim enzimom.

6. LITERATURA

Basheer L, Kerem Z. Interactions between CYP3A4 and Dietary Polyphenols. *Oxid Med Cell Longev*, 2014, Article ID 854015.

Basic of LC/MS. Hewlett Packard, 1998, 23, 5968-2543E.

Baumann P, Jonzier-Perey M. GC and GC-MS procedures for simultaneous phenotyping with dextromethorphan and mephenytoin. *Clin Chem Acta*, 1988, 171, 211-222.

Conjugated quercetin glucuronides, http://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2011/fo/c0fo00106f/unauth#!divAbstract , pristupljeno 23.05.2017.

Erlund I. Review of flavonoids quercetin, hesperetin and naringenin, Dieatary sources, bioactivities, bioavailability and epidemiology. *Nutr Res*, 2002, 24, 851-874.

Falcone Ferreyra ML, Rius SP, Casati P. Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. *Front Plant Sci*, 2012, 3, Article ID 222.

Flavonoids, 2012., http://www.naturalremedies.org/flavonoids/, pristupljeno 19.5.2017.

Guengerich FP. Human Cytochrome P450 Enzymes. *AAPS J*, 2006, 8, E101-111.

Hodek P. Metabolism of drugs and other xenobiotics. Weinheim, Wiley-VCH Verlag, 2012, str. 543-575.

HPLC UV detector, 2017., http://www.biocompare.com/Lab-Equipment/13036-HPLC-UV-Detector-UV-Visible-HPLC-Detectors/, pristupljeno 18.05.2017.

Ingelman-Sundberg M. Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity. *Pharmacogenomics J*, 2005, 5, 6-13.

LC/MS shematic, 2017., https://www.slideshare.net/saptarshi920/liquid-chromatography-and-mass-spectrometrylcms, pristupljeno 16.05.2017.

Matsuda H, Ando S, Kato T, Morikawa T, Yoshikawa M. Inhibitors from the rhizomes of Alpinia officinarum on production of nitric oxide in lipopolysaccharide-activated macrophages and the structural requirements of diarylheptanoids for the activity. *Bioorg Med Chem*, 2006, 14, 138-142.

Nielsen SE, Dragsted LO. Column-switching high-performance liquid chromatographic assay for determination of apigenin and acacetin in human urine with ultraviolet absorbance detection. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 1998, 13, 379-386.

Otake Y, Hsieh F, Walle T Glucuronidation versus Oxidation of the Flavonoid Galangin by Human Liver Microsomes and Hepatocytes. *Drug Metab Dispos*, 2002, 30, 576-581.

Otake Y, Walle T. Oxidation of the flavonoids galangin and kaempferide by human liver microsomes and CYP1A1, CYP1A2 and CYP2C9. *Drug Metab Dispos*, 2002, 30, 103–105.

Quiroga EN, Sampietro JR, Sgariglia MA, Vattuone MA. Propolis from the northwest of Argentina as a source of antifungal principles. *J Appl Microbiol*, 2006, 101, 103–110.

Rendić S, Medić-Šarić M. Metabolizam lijekova i odabranih ksenobiotika. Zagreb, Medicinska naklada, 2013, str. 132-153.

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

Seger C, Griesmacher A. Važni aspekti uspostave dvojne spektrometrije masa u uvjetima rutinskoga kliničkog laboratorija. *Biochem Med*, 2007, 17, 29-51.

Sergent T, Dupont I, Van Der Heiden E, Scippo ML, Pussemier L, Larondelle Y, Schneider YJ. CYP1A1 and CYP3A4 modulation by dietary flavonoids in human intestinal Caco-2 cells. *Toxicol Lett*, 2009, 191, 216-222.

Sica DA, Interaction of Grapefruit Juice and Calcium Channel Blockers. *Am J Hypertens*, 2006, 19, 768–773.

The catalytic cycle of cytochrome P450 with its branchpoints/shunt pathways, 2017., https://www.researchgate.net/figure/305075104_fig8_Figure-1-The-catalytic-cycle-of-cytochrome-P450-with-its-branchpointsshunt-pathways, pristupljeno 21.05.2017.

Zangar RC, Davydov DR, Verma S. Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2004, 199, 316-331.

Zanger UM, Raimundo S, Eichelbaum M. Cytochrome P450 2D6: overview and update on pharmacology, genetics, biochemistry. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2004; 369, 23-37.

7. SAŽETAK

SAŽETAK

Flavonoidi su heterogena skupina fenolnih spojeva koje sintetiziraju biljke, a ljudi ih unose putem voća i povrća. Osnovni skelet čine dva benzenska prstena povezana piranskim prstenom, a daljnje se razlike temelje na postojanju i raspodjeli dodatnih hidroksilnih i metilnih skupina. Interes za proučavanje flavonoida porastao je spoznajom o njihovom djelovanju kao antioksidansa te kardioprotektivnom, protuupalnom ili pak antivirusnom djelovanju. S farmakološkog gledišta ističu se zbog mogućih interakcija s enzimima koji metaboliziraju ksenobiotike, a to su u najvećem postotku enzimi superporodice citokroma P450.

Postoje studije koje pokazuju da je biotransformacija pojedinih flavonoida posredovana CYP enzimima, a flavonoidi na njih mogu imati inhibicijski ili aktivacijski učinak. Stoga je potrebno detaljno istražiti put metabolizma flavonoida i tako predvidjeti medikacijske pogreške koje mogu nastati ako se pacijent liječi lijekom čiji je put metabolizma uključuje enzime koji također metabolizira flavonoide unosene kroz prehrambene namirnice ili kao dodatak prehrani.

Ispitano je jedanaest različitih flavonoida koji su prethodnim probiranjem pokazali metabolizam u reakciji kataliziranoj CYP enzimima. LC-MS je kromatografska metoda koja nam daje uvid u postojanje metabolita jer osigurava informacije o molekulskoj masi i strukturi spoja. Potvrdili smo identitet metabolita za četiri flavonoida, a nastali su reakcijama oksigenacije koje posreduje citokrom P450 2D6. Navedeni enzim u reakciji sa 7-hidroksiflavonom i galanginom daje hidroksilirane metabolite, u reakciji hidroksilacije s akacetinom daje novi flavonoid apigenin, a u reakcijama demetilacije s tangeretinom daje četiri različita metabolita, od kojih je jedan demetiliran na dvije pozicije.

S obzirom na polimorfizam citokroma P450 2D6 te spoznaju da postoje četiri fenotipa koja se razlikuju po brzini biotransformacije lijekova, ovi su nam rezultati važni jer možemo predvidjeti potencijalnu interakciju lijek-flavonoid i osigurati dobar terapijski učinak lijeka i flavonoida.

SUMMARY

Flavonoids are a heterogeneous group of phenolic compounds that are biosynthesize by plants, and people ingest them through fruits and vegetables. The basic flavonoid skeleton consists of two benzene rings connected by a pyran. Further differences are based on the existence and distribution of additional hydroxyl and methyl groups. The interest in the study of flavonoids has increased with the knowledge of their action as antioxidants and cardioprotective, anti-inflammatory or antiviral activity. From a pharmacological point of view, they are interesting due to possible interactions with enzymes that metabolize xenobiotics, which are in the highest percentage memebers of cytochromes P450 superfamily.
There are studies that show that biotransformation of certain flavonoids is mediated by CYP enzymes, and flavonoids may have an inhibitory or activating effect. Therefore, it is necessary to thoroughly explore the path of flavonoid metabolism and thus to predict medical errors that may arise if a patient is treated with a drug whose metabolic pathways includes an enzyme that also metabolizes flavonoids that are introduced through food or nutritional supplements.
Eleven different flavonoids were tested, which by previous screening demonstrated the metabolism catalyzed by CYP enzymes. LC-MS is a chromatographic method that gives us an insight into the existence of a metabolite because it provides information on the molecular weight and structure of the compound. We confirmed the identity of the metabolites for four flavonoids, and they were generated by cytochrome P450 2D6. This enzyme in the reaction with 7-hydroxyphenol and galangine gives hydroxylated metabolites, in the reaction with acacetin hydroxylation gives a new flavonoid apigenin, and in the reactions of tangerine demethylation it gives four different metabolites, one of which is demethylated in two positions.
With regard to the cytochrome P450 2D6 polymorphisms and existence of four phenotypes that differ in the rate of biotransformation of drugs, these results are important because we can predict the potential drug-flavonoid interaction and providing a good therapeutic effect of the drug when combinde with flavonoids.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA / BASIC DOCUMENTATION CARD

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

METABOLIZAM FLAVONOIDA POSREDOVAN CITOKROMOM P450 2D6

David Šarčević

SAŽETAK

Flavonoidi su heterogena skupina fenolnih spojeva koje sintetiziraju biljke, a ljudi ih unose putem voća i povrća. Osnovni skelet čine dva benzenska prstena povezana piranskim prstenom, a daljnje se razlike temelje na postojanju i raspodjeli dodatnih hidroksilnih i metilnih skupina. Interes za proučavanje flavonoida porastao je spoznajom o njihovom djelovanju kao antioksidansa te kardioprotektivnom, protuupalnom ili pak antivirusnom djelovanju. S farmakološkog gledišta ističu se zbog mogućih interakcija s enzimima koji metaboliziraju ksenobiotike, a to su u najvećem postotku enzimi superporodice citokroma P450.

Postoje studije koje pokazuju da je biotransformacija pojedinih flavonoida posredovana CYP enzimima, a flavonoidi na njih mogu imati inhibicijski ili aktivacijski učinak. Stoga je potrebno detaljno istražiti put metabolizma flavonoida i tako predvidjeti medikacijske pogreške koje mogu nastati ukoliko se pacijent liječi lijekom čiji je put metabolizma uključuje enzime koji također metabolizira flavonoide unosene kroz prehrambene namirnice ili kao dodatak prehrani.

Ispitano je jedanaest različitih flavonoida koji su prethodnim probiranjem pokazali metabolizam u reakciji kataliziranoj CYP enzimima. LC-MS je kromatografska metoda koja nam daje uvid u postojanje metabolita jer osigurava informacije o molekulskoj masi i strukturi spoja, identifikaciji i kvantifikaciji pojedinih komponenti uzorka. Potvrdili smo identitet metabolita za četiri flavonoida, a nastali su reakcijama oksigenacije koje posreduje citokrom P450 2D6. Navedeni enzim u reakciji sa 7-hidroksiflavonom i galanginom daje hidroksilirane metabolite, u reakciji hidroksilacije s akacetinom daje novi flavonoid apigenin, a u reakcijama demetilacije s tangeretinom daje četiri različita metabolita, od kojih je jedan demetiliran na dvije pozicije.

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

Rad sadrži:	37 stranica, 13 grafičkih prikaza, 5 tablica i 25 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.
Ključne riječi:	Flavonoidi, metabolizam, citokrom P450 2D6
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. Erim Bešić, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: svibanj 2017.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

METABOLISM OF FLAVONOIDS MEDIATED BY CYTOCHROME P450 2D6

David Šarčević

SUMMARY

Flavonoids are a heterogeneous group of phenolic compounds that are biosynthesize by plants, and people ingest them through fruits and vegetables. The basic flavonoid skeleton consists of two benzene rings connected by a pyran. Further differences are based on the existence and distribution of additional hydroxyl and methyl groups. The interest in the study of flavonoids has increased with the knowledge of their action as antioxidants and cardioprotective, anti-inflammatory or antiviral activity. From a pharmacological point of view, they are interesting due to possible interactions with enzymes that metabolize xenobiotics, which are in the highest percentage memebers of cytochromes P450 superfamily.

There are studies that show that biotransformation of certain flavonoids is mediated by CYP enzymes, and flavonoids may have an inhibitory or activating effect. Therefore, it is necessary to thoroughly explore the path of flavonoid metabolism and thus to predict medical errors that may arise if a patient is treated with a drug whose metabolic pathways includes an enzyme that also metabolizes flavonoids that are introduced through food or nutritional supplements.

Eleven different flavonoids were tested, which by previous screening demonstrated the metabolism catalyzed by CYP enzymes. LC-MS is a chromatographic method that gives us an insight into the existence of a metabolite because it provides information on the molecular weight and structure of the compound, the identification and quantification of the individual sample components. We confirmed the identity of the metabolites for four flavonoids, and they were generated by cytochrome P450 2D6. This enzyme in the reaction with 7-hydroxyphenol and galangine gives hydroxylated metabolites, in the reaction with acacetin hydroxylation gives a new flavonoid apigenin, and in the reactions of tangerine demethylation it gives four different metabolites, one of which is demethylated in two positions.

With regard to the cytochrome P450 2D6 polymorphisms and existence of four phenotypes that differ in the rate of biotransformation of drugs, these results are important because we can predict the potential drug-flavonoid interaction and providing a good therapeutic effect of the drug when combinde with flavonoids.

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

Thesis includes: 3 pages, 13 figures, 5 tables and 25 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Flavonoids, metabolism, citokrom P450 2D6

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

Reviewers: **Mirza Bojić**, **Ph.D.** *Assistant Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Željan Maleš, Ph.D. *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Erim Bešić, Ph.D. *Assistant Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: May 2017.