

Metabolizam flavonoida posredovan citokromom P450 3A4

Posavčević, Marija

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:163:532740>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-19**



Repository / Repozitorij:

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



Marija Posavčević

**Metabolizam flavonoida posredovan
citokromom P450 3A4**

DIPLOMSKI RAD

predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2017.

Marija Posavčević

**Metabolizam flavonoida posredovan
citokromom P450 3A4**

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, savjetima i pomoći pri izradi ovoga rada i Goranu Benkoviću, mag.pharm. uz čiju je pomoć napisan ovaj rad.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. FLAVONOIDI.....	2
1.1.1. Klasifikacija i strukturna karakterizacija.....	2
1.1.2. Flavonoidi u hrani.....	5
1.1.3. Metabolizam.....	6
1.1.4. Učinak na zdravlje čovjeka.....	7
1.2. CITOKROM P450 3A4.....	8
1.2.1. Ekspresija i klinički značaj citokroma P450 A4.....	9
1.2.2. Supstrati i reakcije.....	9
1.2.3. Interakcije.....	10
2. OBRAZLOŽENJE TEME	13
3. MATERIJALI	16
3.1. Materijali.....	17
3.2. Metode.....	18
4. REZULTATI I RASPRAVA	22
4.1. SAKURANETIN.....	25
4.2. 7-HIDROKSI FLAVON.....	31
4.3. TANGERETIN.....	32
5. ZAKLJUČAK	34
6. LITERATURA	36
7. SAŽETAK / SUMMARY	39
7.1. SAŽETAK.....	40
7.2. SUMMARY.....	41
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA / BASIC DOCUMENTATION CARD	

POPIS KRATICA:

COMT	katehol-O-metiltransferaza
COX	ciklooksigenaza
CYP	citokrom
EI	elektroionizacija
EIC	kromatogram izdvojenog iona
GABA	gamaaminomaslačna kiselina
LC-MS	tekućinska kromatografija spregnuta sa spektrometrijom masa
LOX	lipooksigenaza
NOS	reaktivne dušikove vrste
ROS	reaktivne kisikove vrste
RT	vrijeme zadržavanja
SULT	sulfotransferaza
TOF	vrijeme proleta
UGT	UDP-glukuronoziltransferaza
UV-Vis	UV-vidljivi dio spektra

1. UVOD

1.1. FLAVONOIDI

Flavonoidi su velika grupa biljnih sekundarnih metabolita kategoriziranih kao fenolni spojevi. Godine 1930. nobelovac Albert Szent Gyorgyi izolirao je novi spoj iz naranče, vjerujući da se radi o novoj vrsti vitamina te ga nazvao vitamin P. Kasnije se ispostavilo da je riječ o flavonoidu (rutin) te su započela brojna istraživanja kojima se pokušalo izolirati različite pojedinačne flavonoide te utvrditi njihovi mehanizmi djelovanja. Iako su zbog svojih svojstava čovjeku korisni za zdravlje, oni su strane tvari (ksenobiotici) pa se njihov unos u ljudski organizam treba promatrati s oprezom (Hodek, 2012).

Pojavio se povećani interes za istraživanje flavonoida iz biljnih izvora zbog njihovih svestranih dobrobiti za zdravlje čovjeka zabilježenih u različitim epidemiološkim studijama. Borba protiv oksidativnog stresa i poticanje rasta čine ih važnima u biljnome svijetu, a u ljudi ističu se po antioksidativnoj aktivnosti, sposobnosti hvatanja slobodnih radikala, prevenciji koronarnih bolesti, hepatoprotektivnosti, protuupalnim i protutumorskim svojstvima. Otkako se flavonoidima pridao značaj u ljudskoj prehrani i zdravlju, pojavljuje se i potreba usporediti odnos njihove strukture i funkcije (Kumar i Pandey, 2013).

1.1.1. Klasifikacija i strukturna karakterizacija

Uobičajeni C6-C3-C6 ugljikov skelet nalazimo u temeljnoj strukturi flavonoida (Slika 1). Ovi spojevi derivati su benzopirana, 4H-kromena kojemu benzenski i piranski prsten daju bicikličku strukturu.



Slika 1. Uobičajeni ugljikov skelet flavonoida

U svojoj strukturi sadržavaju dva benzenska prstena (A i B) koje povezuje prsten (C) koji sadrži kisik. Flavonoidi koji na poziciji C-3 u prstenu C sadrže hidroksilnu grupu svrstani su u

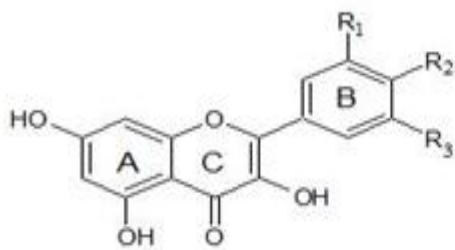
grupu 3-hidroksiflavonida u koje ubrajamo flavonole, antocijanidine, leukoantocijanidine i katehine. Flavonoide kojima nedostaje spomenuta hidroksilna skupina nazivamo 3-deoksiflavonoidima. U toj se skupini nalaze flavanoni i flavoni.

Kojoj će od navedenih skupina pripadati pojedini flavonoid, ovisi o prisutnosti i položaju funkcionalnih skupina na prstenu C. Izoflavonoidi razlikuju se od ostalih grupa jer je B prsten povezan na C prsten na poziciji C-3, a ne na poziciji C-2, kako je uobičajeno. Antocijanidinima i katehinima nedostaje karbonilna skupina na C-4 (Slika 2; Erlund, 2004).

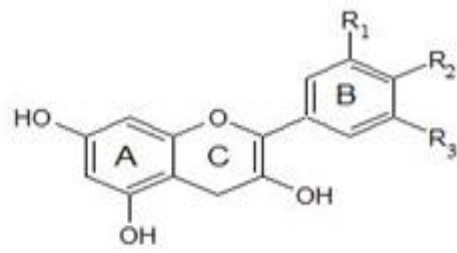
Flavonoidi se u biljkama uglavnom pojavljuju u obliku glikozida. Glikozidi su spojevi koji sadržavaju ugljikohidratni i neugljikohidratni dio u istoj molekuli. Ugljikohidratni dio povezuje se s neugljikohidratnim dijelom (aglikon) acetalnom vezom. Ugljikohidratna komponenta jest šećer i naziva se glikon. Aglikonom nazivamo formu bez šećerne komponente (Glycosides, <http://www.friedli.com>).

Flavonoidi se kao aglikoni rjeđe pojavljuju. Najmanje osam različitih monosaharida ili njihovih kombinacija mogu se vezati na različite hidroksilne grupe flavonoidskih aglikona. Mnoštvo različitih kombinacija aglikona i glikona rezultira velikim brojem različitih flavonoida. Najčešći šećerni motiv koji se ponavlja jest *D*-glukoza i *L*-ramnoza. Glikozidi su najčešće *O*-glikozidi gdje je šećerni ostatak vezan na hidroksilnu grupu na C-3 ili C-7 poziciji (Erlund, 2004).

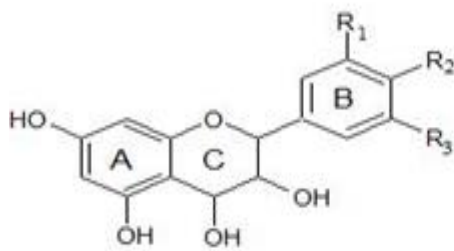
3-HIDROKSI FLAVONOIDI



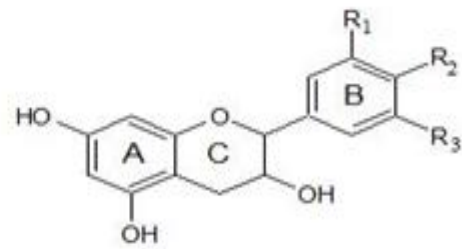
FLAVONOLI



ANTOCIJANIDINI

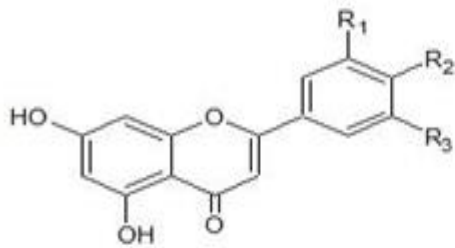


LEUKOANTOCIJANIDINI

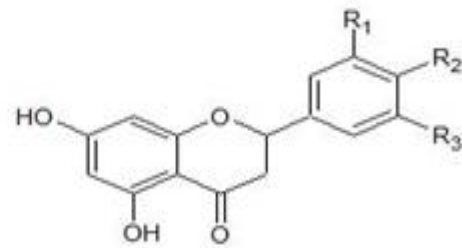


KATEHINI

3-DEOKSIFLAVONOIDI

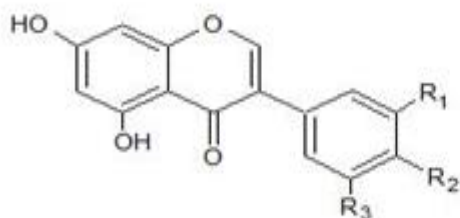


FLAVONI



FLAVANONI

IZOFLAVONOIDI



Slika 2. Strukturna karakterizacija flavonoida

1.1.2. Flavonoidi u hrani

Flavonoidi se pojavljuju u većini jestivog voća i povrća, ali vrsta flavonoida razlikuje se u različitim prehrambenim izvorima (Slika 3).

Ljudi normalnom dnevnom prehranom, osobito voćem i povrćem, unose 1-2 g flavonoida dnevno (Kumar i Pandey, 2013).



Slika 3. Hrana bogata flavonoidima (preuzeto s www.foodinsight.org)

Kvercetin je najuobičajeniji flavonol u prehrani i to u najvećoj koncentraciji u bijelom luku. Glikozide kvercetina nalazimo i u jabukama te u bobičastom voću.

U citrusnom voću pojavljuju se isključivo flavanoni. Najviše koncentracije nalazimo u čvrstom tkivu, dok se nešto manje nalaze i u soku. Hesperidin i narirutin glavni su flavonoidi naranča i mandarina. U grejpu najzastupljeniji su naringin i narirutin. Niske koncentracije naringenina također možemo pronaći u rajčicama i proizvodima od rajčice.

Katehine, osim kao glavne flavonoide crnog čaja i crvenoga vina, možemo naći i u jabukama, kruškama, grožđu i breskvama.

Glavni izvor flavona apigenina i luteolina su crveni papar i celer.

Antocijanidini i njihovi glikozidi odgovorni su za crvenu, plavu ili ljubičastu boju jestivoga voća i povrća kao što su šljive, jabuke, patlidžan i bobičasto voće. Najzastupljeniji su pelargonidin, cijanidin, delfinidin i malvidin.

Mahunarke su bogate izoflavonoidima genisteinom i daidzeinom. U najvišim koncentracijama nađeni su u soji i produktima soje, a u manjim koncentracijama i u drugim mahunarkama (Erlund, 2004).

1.1.3. Metabolizam

Kao i drugi ksenobiotici, i flavonoidi su podložni metaboličkoj eliminaciji iz organizma pri čemu prolaze kroz reakcije oksidacije, metilacije, demetilacije, hidrolize i konjugacije s glukuronskom kiselinom te sulfatom. Kako je enzim citokrom P450 3A4 (dalje u tekstu CYP3A4) najzastupljeniji u metabolizmu ksenobiotika, za očekivati je da neki flavonoidi imaju potencijal za interakcije s lijekovima na razini navedenoga enzima (Bojić M i sur., 2015).

Za početak, potrebno je da se flavonoidi apsorbiraju iz gastrointestinalnoga trakta. Flavonoidi koje unesemo hranom obično se u cirkulaciju ne apsorbiraju u svojoj nativnoj formi, nego se uz pomoć endogenih enzima i/ili mikrobnih enzima metaboliziraju u formu koja se može apsorbirati. Metabolizam se, generalno, odvija kroz fazu I i fazu II biotransformacije, kako vrijedi i za većinu ksenobiotika.

Prva glavna meta su glikozidi flavonoida koji podliježu enzimatskoj hidrolizi do aglikona koji je kao takav spreman za *C*-hidroksilaciju i/ili *O*-demetilaciju. Dalje su flavonoidi podložni *O*-metilaciji i konjugaciji s glukuronatom, sulfatom ili glicinom. Krajnji produkti, većinom glukuronati i sulfati flavonoida, transportiraju se žučnim vodom u tanko crijevo ili plazmu, odakle se znatan broj metabolita luči putem urina.

Ključno mjesto u intestinalnom metabolizmu flavonoida je jetra, gdje se apsorbirani flavonoidi dalje metaboliziraju. Reakcije uključuju hidrolitičku dekonjugaciju β -glukuronidazama, konjugaciju aglikona UGT-om i/ili SULT-om. Hidroksilne grupe na flavonoidima podliježu metilaciji pomoću COMT, a hidroksimetilne grupe demetilaciji pomoću CYP. CYP enzimi također kataliziraju *C*-hidroksilaciju (Hodek, 2012).

1.1.4. Učinak na zdravlje čovjeka

Flavonoidi su generalno prihvaćeni kao supstancije iz biljnoga svijeta koje promoviraju zdravlje. Prije nego se pokazao širok spektar bioloških učinaka flavonoida na zdravlje čovjeka, često su bili nazivani kemoprotektivnim supstancijama. Danas se zna da i ti spojevi, ukoliko se primjene u visokim dozama, ne nose nužno benefit našem organizmu.

Među mnogim poželjnim učincima flavonoida na zdravlje često se ističe njihova antioksidativna moć. Kao antioksidansi djeluju na više načina: utječu na status ROS putem enzima ili uplićući se u signalne putove, hvatači su NOS, keliraju i izmjenjuju metalne ione. Zbog sposobnosti zaštite stanica od štete uzrokovane ROS-om smatra ih se kemopreventivnim specijama. Također, antikancerogena svojstva zaslužili su svojom sposobnošću blokiranja enzima koji aktiviraju karcinogene na razini ekspresije ili aktivnosti. Stanice štite i interferirajući s procesom apoptoze, gdje u mitohondrijima reduciraju aktivnost citokroma c. Važno je napomenuti da unatoč korisnim antioksidativnim sposobnostima, istovremeno mogu djelovati kao prooksidansi, osobito kada se primjenjuju u visokim dozama.

Pokazalo se da antivirusna svojstva flavonoidi postižu zahvaljujući metilnoj skupini na prstenu A. Na virusnu infekciju utječu na razini inhibicije ulaska virusa u stanicu i njegove replikacije.

Interagirajući s ATPovisnim proteinima imaju važnu ulogu u staničnoj diferencijaciji, apoptozi, angiogenezi i metastazi. Zbog sposobnosti vezanja za specifične receptore makromolekula (estrogen, GABA) flavonoidi pokazuju antiestrogeni i anksiolitički efekt.

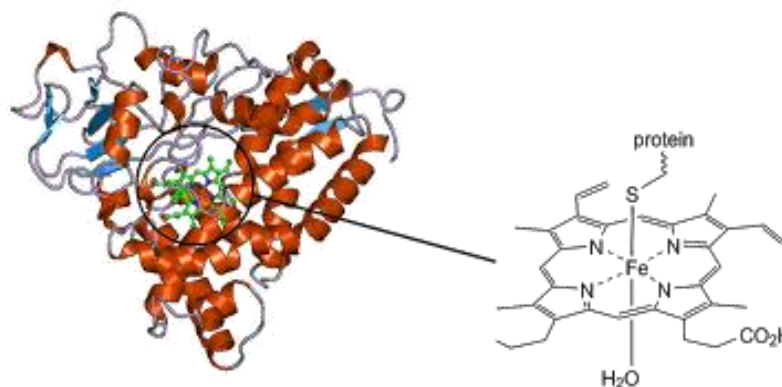
U tradicionalnoj biljnoj medicini znani su po protuupalnim svojstvima jer inhibiraju COX i LOX enzime, uključene u biosintezu leukotriena i prostaglandina. Brojni znanstvenici smatraju da im djelovanje na COX i LOX enzime osigurava antitrombotski učinak te posljedično ulogu u prevenciji kardiovaskularnih bolesti.

Biljnu hranu koja sadrži ove spojeve danas se naziva „funkcionalna hrana“. Termin „nutraceutici“, koji dolazi od riječi „nutrition“ i „farmaceutici“, čuva se za onu funkcionalnu hranu koja može osigurati dobrobit za zdravlje ili se koristiti u prevenciji ili tretiranju bolesti (Hodek, 2012).

Kako god ih nazivali, uvijek moramo imati na umu kompleksan metabolizam ovih spojeva, osigurati prikladno doziranje za pravu indikaciju kako ne bismo bili žrtve neželjenih posljedica koje, dakako, flavonoidi mogu uzrokovati.

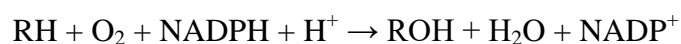
1.2. CITOKROM P450 3A4

Citokromi P450 su hemoproteini čije aktivno mjesto čini željezo vezano na porfirinski prsten i cisteinski ostatak na apoproteinskom dijelu (Slika 4).



Slika 4. Aktivno mjesto citokroma P450 (preuzeto s www.chem-is-you.blogspot.hr)

Smješteni su na membranama endoplazmatskoga retikuluma i mitohondrija. Funkcionalno predstavljaju monooksigenaze koje inkorporiraju hidroksilnu skupinu iz molekuskog kisika u supstrat te kao nusprodukt daju molekulu vode (Bojić, 2015).



Istraživanjima koja su koristila različite eksperimentalne životinje i induktore identificirano je preko 20.000 različitih vrsta citokroma P450. Klasifikacija i označavanje zasniva se na sličnosti primarne strukture proteina te je prema ovoj klasifikaciji superporodica gena odgovorna za biosintezu apoproteina citokroma P450. Enzimi citokrom P450 pripadat će istoj porodici ukoliko im je aminokiselinski slijed u lancu sličan više od 40% te ih označavamo brojem, a u potporodice smještamo proteine sa sličnošću aminokiselina više od 60% te ih označavamo velikim slovom. Pojedine enzime označavamo brojevima u slijedu (Rendić, 1995).

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

1.2.1. Ekspresija i klinički značaj citokroma P450 3A4

U ljudskom je tijelu CYP3A4 najzastupljeniji citokrom P450. Najviše ga možemo naći u ljudskoj jetri i tankom crijevu. Procjenjuje se da prosječna frakcija CYP3A4 od ukupne frakcije citokrom P450 u jetri iznosi oko 25%, a u tankome crijevu još i više. Enzim je također eksprimiran i u drugim ekstrahepatičkim tkivima: pluća, abdomen, kolon, mozak, nadbubrežna žlijezda. Nije zabilježen u bubrezima, prostati, testisima ili timusu za razliku od drugih enzima iz istoimene porodice.

Glavni klinički ishodi povezani s CYP3A4 utemeljeni su na brzom klirensu ksenobiotika, promjenljivoj bioraspoloživosti te indukciji i inhibiciji enzima. Visoka aktivnost enzima prema ksenobiotiku smanjit će biodostupnost, a promjene u koncentracijama CYP3A4 mogu uzrokovati kliničke probleme u slučaju uske terapijske širine lijeka.

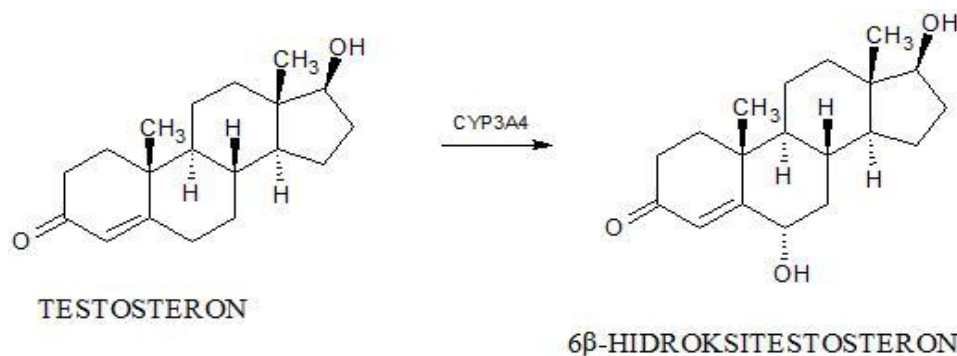
Promatrajući utjecaj bolesti na CYP3A4, zaključilo se da ekspresija enzima opada u slučaju ciroze jetre ili raka. Razine enzima također su snižene u celijakiji te promijenjene ukoliko nastupe promjene u prehrani.

Javlja se interes za proučavanje enzima u pogledu raka, egzogenih karcinogena, citostatika, steroida te ostalih spojeva koji mogu utjecati na pojavu raka ili odgovor na kemoterapiju (Guengerich, 2006).

1.2.2. Supstrati i reakcije

CYP3A4 doprinosi metabolizmu više od 50% lijekova na tržištu te onih u fazi istraživanja. Mnogi od njih vrlo su važni poput simvastatina i ostalih statina, inhibitora hipertrofije prostate finasterida, imunosupresiva ciklosporina, inhibitora proteaze indinavira te vazodilatatora sildenafilila, poznatog pod generičkim nazivom Viagra[®]. Enzim također katalizira i neke atipične reakcije koje uključuju desaturaciju, oksidativno cijepanje estera karboksilnih kiselina i oksidaciju nitrila do amida. Neočekivana reakcija pokazala se u laboratoriju gdje je enzim oksidirao alkilfenileter neionske deterdžente koji se obično koriste prilikom pročišćavanja enzima, a također imaju i medicinsku i industrijsku primjenu.

Jedna od klasičnih reakcija, a i najbržih, katalizirana istoimenim enzimom je hidroksilacija testosterona na položaju 6 β (Slika 5). Povijesno gledajući, ova je reakcija među prvima identificirana te se i dalje koristi *in vitro*, skupa s oksidacijom nifedipina.



Slika 5. 6β-Hidroksilacija testosterona

Enzim također oksidira kolesterol u 4β-hidroksikolesterol, glavni oksisterol u cirkulaciji (Guengerich, 2006).

Osim toga, važna je njegova uloga u hidroksilaciji žučnih kiselina i steroidnih hormona, održavajući tako njihovu homeostazu. Relativna citotoksičnost žučnih kiselina povezana je s njihovom hidrofobnošću, a hidroksilacije i konjugacije na oba prstena smanjuju hidrofobnost molekule te ih tako CYP3A4 detoksificira i čini dostupnima za izbacivanje transporterima (Stedman i sur. 2004).

Ulogu ima i u metabolizmu lijekova u kemoterapiji, a posebnu pažnju daje se aktivaciji lijekova i kemijskih karcinogena. Enzim ima sposobnost aktivacije tamoksifena, antagonista estrogenog receptora, producirajući DNA adukte. Drugi primjer karcinogene aktivnosti uključuje aflatoxin B₁ koji se 3α-hidroksilacijom detoksificira te formira mutageni 8,9-ekso-epoksid.

Pokazano je da CYP3A4 ima važnu ulogu u biosintezi endogenog morfina u sisavaca, katalizirajući ciklizaciju (*R*)-retikulina do salutaridina i *O*⁶-demetilaciju tebaina uključene u kasnije faze sinteze morfina (Guengerich, 2005).

1.2.3. Interakcije

Lijek-lijevak interakcije podijeljene su u tri glavne skupine: farmaceutske, farmakodinamičke i farmakokinetičke. U farmakokinetičke interakcije stupaju lijekovi u fazi apsorpcije, raspodjele, metabolizma i eliminacije. Glavne klinički značajne interakcije u ovoj skupini pripadaju fazi metabolizma, a predvođeni su aktivnošću citokroma P450, od čega najveći značaj ima CYP3A4 zbog velikog udjela u metabolizmu svih ksenobiotika.

Lijek-inhibitor citokroma reducira metabolizam drugoga lijeka kompetitivnim mehanizmom: oba se lijeka natječu za isto vezno mjesto te je posljedično klirens jednoga ili oba lijeka

usporen. Ukoliko je inhibicija ireverzibilna, jedan će se lijek kovalentno vezati i inaktivirati enzim te tako usporiti klirens drugom lijeku. Takva pojava može dovesti do iznimno visokih koncentracija pojedinoga lijeka odnosno toksičnosti. Indukciju opažamo kada lijek pojačava proizvodnju ili aktivnost citokroma P450, dovodeći do brzoga metabolizma drugoga lijeka. Indukcija može rezultirati niskim koncentracijama lijeka, hipodoziranjem te neuspjehom u liječenju. Tablica 1 prikazuje neke od čestih inhibitora i induktora CYP3A4 enzima (Lohr, 2009).

Tablica 1. Neki inhibitori i induktori CYP3A4 (Lohr, 2009)

CYP3A4 inhibitori	CYP3A4 induktori
alopurinol	barbiturati
amiodaron	bosentan
kloramfenikol	fenitoin
klaritromicin	gospina trava
ciklosporin	karbamazepin
cimetidin	kortikosteroidi
eritromicin	nevirapin
flukonazol	omeprazol
ketokonazol	okskarbazepin
ritonavir	
sok grejpa	
tamoksifen	
verapamil	
vorikonazol	

David G. Bailey prvi je izvijestio o inhibicijskom utjecaju soka grejpa na CYP3A4. Inhibicija se pokazala točnom za sok grejpa i neke druge vrste citrusa, ali ne i sok naranče. Danas oznake upozorenja uključuju mnoge spojeve. Naringen pokazuje određeni efekt, ali čini se da su najaktivniji spojevi furanokumarini, bergamotin i 6',7'-dihidroksibergamotin, čija se inaktivacija temelji na razaranju crijevnoga CYP3A4 enzima. Važnost interakcija varira od lijeka do lijeka, a među njima ističu se statini, buspiron, terfenadin, astemizol, amiodaron (Guengerich, 2006).

Kvercetin također inhibira konstitutivnu aktivnost CYP3A4 i inhibira 1,25-vitaminom D₃ uzrokovanu aktivaciju istoga enzima direktno interagirajući s enzimom. Krisin i ganistein također direktno inhibiraju CYP3A4, ali ne pokazuju antagonistički efekt kao kvercetin.

Važno je naglasiti potrebu za pažljivim proučavanjem neželjenih učinaka i potencijalne koristi ksenobiotika prije nego ih odlučimo preporučiti te pacijenta prikladno informirati o mogućim interakcijama (Sergent i sur., 2009).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Kako je pojašnjeno u uvodu, flavonoidi pokazuju i korisne i štetne učinke na ljudski organizam. Pokazuju značajke citoprotektivnu i citotoksičnu, antioksidativnu i prooksidativnu, antikarcinogenu i prokarcinogenu aktivnost te antiestrogeni i estrogeni efekt. Takva dvosmislena svojstva uvelike ovise o načinu promjene molekule flavonoida, pri tom misleći na dozu, put primjene, vrijeme izloženosti, predmet liječenja, izloženost drugim ksenobioticima ili karcinogenima. Važnu ulogu u konačnom učinku flavonoida imaju i genetski polimorfizmi enzima koji su važni u metabolizmu ksenobiotika. Naglasak ove problematike jest u flavonoid-lijek interakcijama koje mogu rezultirati nepredvidljivim promjenama u farmakokinetici lijeka te tako prouzrokovati ozbiljan udar na čovjekovo zdravlje.

Otkako je 1989. zabilježen prvi izvještaj o interakciji sok grejpa-lijek, prikupljala se dokumentacija koja svjedoči o interakcijama lijek-hrana, lijek-biljka, lijek-flavonoid. I lijekove i flavonoide smatramo ksenobioticima te su tako u njihov metabolizam uključeni isti ili slični enzimi. Ta činjenica nagovještava potencijalno modulirajuće djelovanje flavonoida na spomenute enzime što za posljedicu ima promjene u farmakokinetici lijeka i terapijski efekt. Modulacija od strane flavonoida može imati dvojako značenje: indukcija enzima, koja može rezultirati ubrzanom eliminacijom lijeka ili povećanom koncentracijom aktivnog oblika lijeka, ili pak inhibicija enzima koja može spriječiti eliminaciju lijeka, uzrokovati akumulaciju istoga ili omesti konverziju prolijeka u aktivni oblik. Takve potencijalne situacije mogu u konačnici dovesti do gubitka terapijskog učinka ili predoziranja, a obje imaju tendenciju i ugroziti ljudski život (Hodek, 2012).

Citokrom P450 3A4 odgovoran je za oksidativni metabolizam više od 60% ksenobiotika (Cooper, 2008) te su tako interakcije flavonoida s ovim enzimom od iznimne važnosti. Postoje dokumentacije koje govore o već istraženim učincima flavonoida na CYP3A4, a neki su njih su induktivni učinak gospine trave (*Hypericum perforatum*, L.), koja sadrži smjesu flavonolignana i inhibitorni učinak citrusnog flavonoida naringenina koji se može naći u soku grejpa.

Malen je broj studija koje su ispitale ovakav učinak flavonoida te je cilj ovoga rada ispitati utjecaj citokroma P450 3A4 na pojedine flavonoide kako bi se upotpunilo postojeće znanje o metabolizmu flavonoida te tako spriječile medikacijske pogreške koje bi mogle biti posljedica neočekivane flavonoid-lijek interacije.

Za potrebe ovoga rada ispitano je jedanaest različitih flavonoida metodom LC-MS, koji su u prethodnoj inkubaciji s humanim jetrenim enzimima pokazali metabolizam posredovan citokromom P450. Metoda omogućuje da iz dobivenih kromatograma, vremena zadržavanja i

usporedbama molekulskih formula i masa dobivenih metabolita zaključiti koji se od flavonoida podvrgnuo metabolizmu sa spomenutim enzimom te koja se reakcija na molekuli flavonoida dogodila.

Imajući u vidu da flavonoidi nisu samo „panacea“ koju koristi čovječanstvo, nego stvarni ksenobiotik, potrebno je poznavati njihov metabolizam, osobito jer su si zbog svoje široke distribucije u biljkama osigurali epitet najobilnijih polifenola u ljudskoj prehrani (Hodek 2012).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

Napravljeno je probiranje tako što je trideset flavonoida inkubirano s humanim jetrenim mikrosomima. Jedanaest od njih pokazalo je metabolizam posredovan citokromom P450:

- Apigenin
- Kemferol
- Flavon
- 7-hidroksiflavon
- Galangin
- 3,7-dihidroksiflavon
- 6-hidroksiflavon
- Akacetin
- Naringenin
- Sakuranetin
- Tangeretin

Navedenih jedanaest flavonoida uzeto je u analizu kako bi se LC/MS metodom ispitalo posreduje li u njihovom metabolizmu citokrom P450 3A4.

Inkubacije

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

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

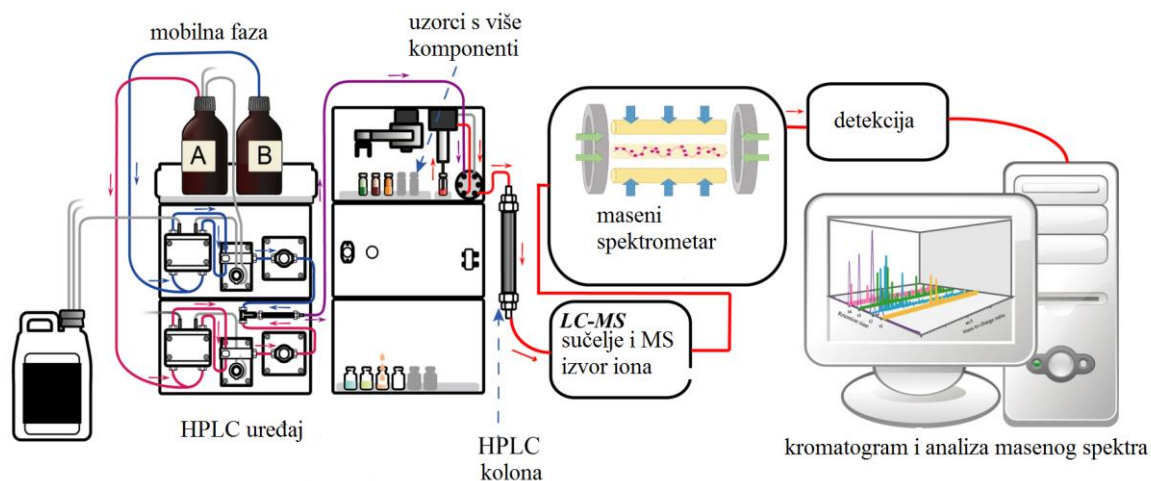
Metoda koja je omogućila potvrdu metabolita pojedinih flavonoida jest tekućinska kromatografija spregnuta sa spektrometrijom masa (LC/MS) i UV-Vis detektorom. To je analitička tehnika koja kombinira moć razdvajanja supstancija tekućinske kromatografije i sposobnost analize točne masa spektrometrijom masa. Ovako spregnuta tehnika je popularna jer se individualne prednosti svake metode pojačavaju sinergistički. Dok tekućinska kromatografija razdvaja smjese s više komponenata, spektrometrija masa osigurava strukturni identitet pojedinačnih komponenti s visokom specifičnošću i osjetljivošću detekcije. Ovako spregnuta tehnika može se koristiti za analizu biokemijskih, organskih i anorganskih spojeva koji se obično nalaze u složenim uzorcima ekološkog i biološkog porijekla (Chaimbault, 2014).

Princip metode

Tekuća kromatografija metoda je fizičkog razdvajanja u kojoj su komponente tekuće smjese raspoređene između dvije faze koje se ne miješaju - nepokretna i pokretna. Pokretna faza najčešće je smjesa vode i organskih otapala, a nepokretna se priprema vezanjem dugolančanih alkilnih skupina sa česticama silicija. Pokretna faza koja sadrži analite prolazi kroz nepokretnu u određenom smjeru. Komponente smjese razdvajaju se ovisno o njihovom kemijskom afinitetu ili drugim interakcijama prema pokretnoj i nepokretnoj fazi. Razdvajanje se javlja nakon ponovljenih stupnjeva sorpcije i desorpcije koji nastaju kada tekućina dolazi u interakciju sa stacionarnom fazom. Najvažnija komponenta LC sustava je kolona koja je dizajnirana da izdrži visoki tlak pod kojim se tekućina injektira (Dass, 2007).

Spektrometrija masa je analitička tehnika koja mjeri omjer masa i naboja (m/z) nabijenih čestica (iona). Električna ili magnetska polja koriste se da manipuliraju kretanjem iona dobivenih od analita te određuju njihov omjer m i z . Osnovne komponente spektrometra masa jesu izvor iona, generator vakuuma, analizator mase, detektor i sustavi za obradu podataka.

Izvor iona označava dio gdje su komponente uzorka uvedene u MS sustavu ionizirane elektronskim snopovima, UV svjetlom ili laserskom zrakom. U slučaju elektrosprej ionizacije, izvor iona pomiče ione koji postoje u tekućoj otopini u plinsku fazu. Izvor iona pretvara i fragmentira molekule neutralnih uzoraka u ione plinske faze koji se šalju u analizator mase. Među mnogobrojnim vrstama masnih analizatora, one koje se primjenjuju u LC/MS sustavima su kvadropolni, TOF analizator, ionska zamka i dr. Dok maseni analizator primjenjuje električna i magnetska polja za razvrstavanje iona prema njihovim masama, detektor mjeri i pojačava struju iona kako bi izračunao udio svakog iona. Kako bi se stvorio spektar masa koji bi transparentno prikazivao analizirane podatke, sustav podataka bilježi, obrađuje, pohranjuje i prikazuje podatke na računalu (Dass, 2007). Slika 7 shematski prikazuje princip rada LC/MS tehnike.



Slika 7. LC/MS shema rada (preuzeto s www.wikipedia.org)

Sljedeći podatci odnose se 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 $^{\circ}\text{C}$
- 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:**

<i>t</i> (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

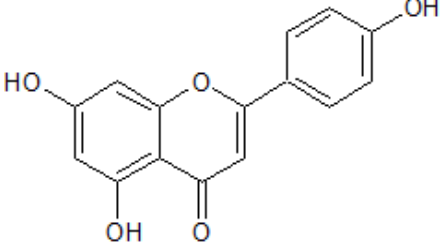
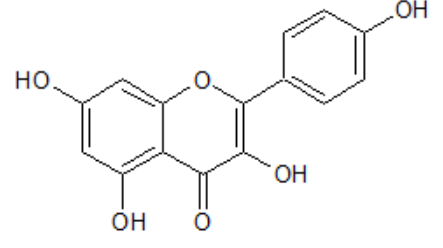
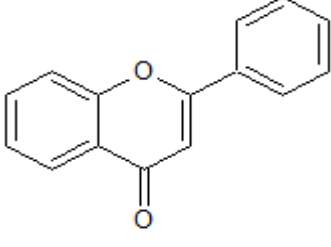
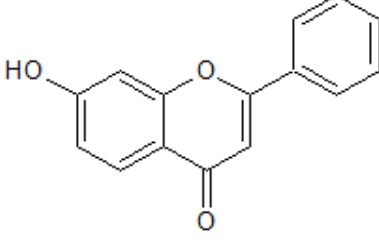
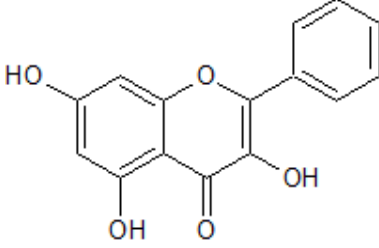
UV kromatogramom inkubacijske smjese za pojedini flavonoid bez dodatka generirajućeg sustava potvrđujemo identitet flavonoida, a uz pomoć kromatograma izdvojenog iona očitavamo molekulsku formulu i masu.

Ukoliko 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 3A4 i zaključiti o kojoj je reakciji biotransformacije riječ.

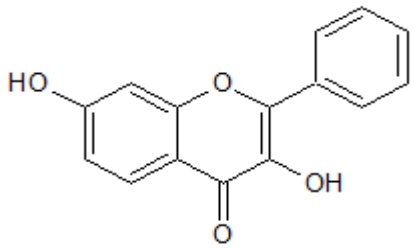
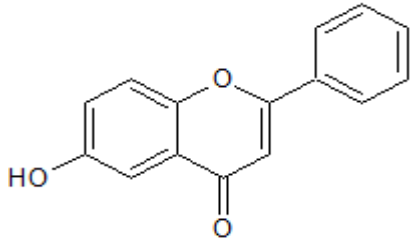
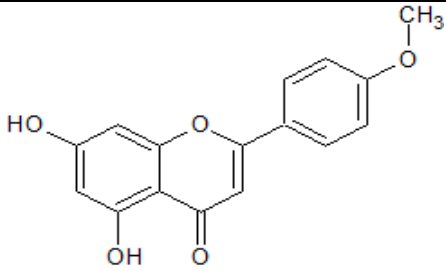
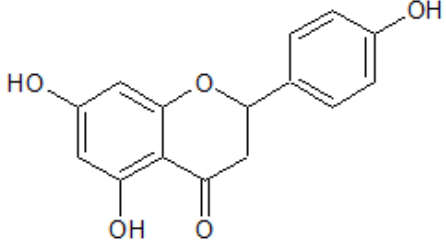
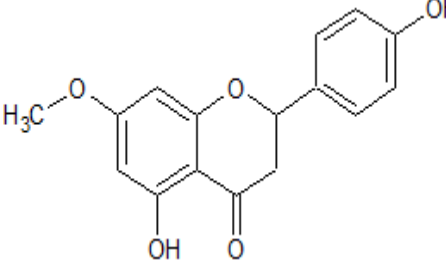
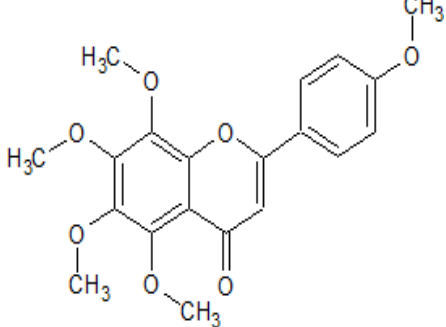
4. REZULTATI I RASPRAVA

Jedanaest je analiziranih flavonoida, a za tri od njih detektirani su metaboliti i time su potvrđene reakcije biotransformacije posredovanje citokromom P450 3A4. Tablica 2 prikazuje dobivene rezultate.

Tablica 2. Analizirani flavonoidi

Flavonoid	Struktura	Metabolit	Reakcija
apigenin		-	-
kemferol		-	-
flavon		-	-
7-hidroksi flavon		4',7-dihidroksi flavon 5,7-dihidroksi flavon	hidroksilacija
galangin		-	-

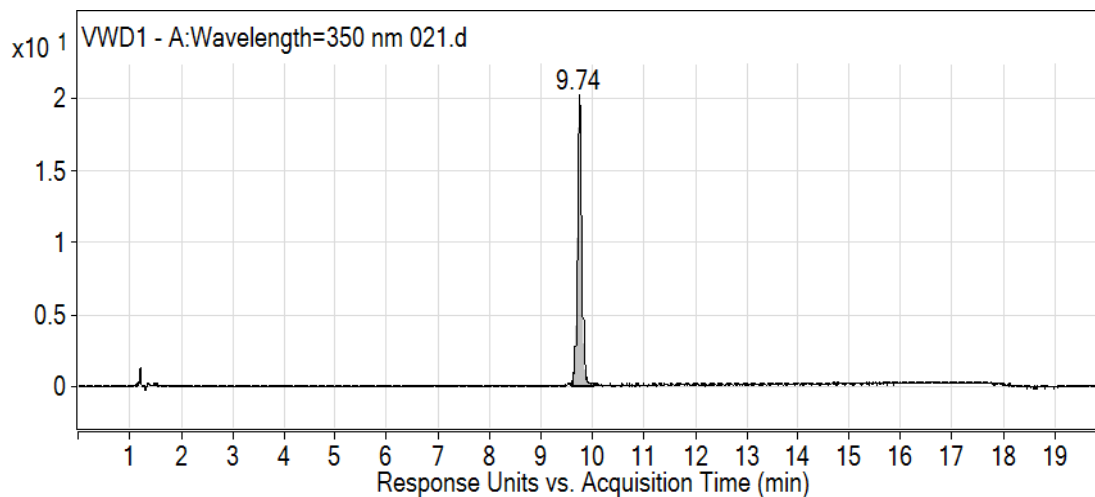
Tablica 2. Analizirani flavonoidi (*nastavak*)

Flavonoid	Struktura	Metabolit	Reakcija
3,7-dihidroksiflavon		-	-
6-hidroksiflavon		-	-
akacetin		-	-
naringenin		-	-
sakuranetin		6'-hidroksi sakuranetin	hidroksilacija
tangeretin		4'-hidroksitangeretin 8-hidroksitangeretin 4',5-dihidroksi- tangeretin 7-hidroksitangeretin	demetilacija

Detaljan prikaz rezultata opisat će se na primjenu sakuranetina.

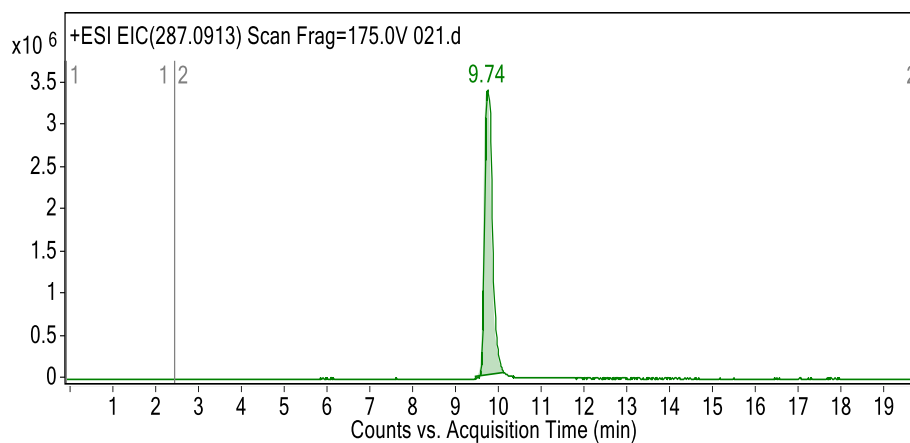
4.1. SAKURANETIN

UV kromatogramom bez dodanog generirajućeg sustava potvrđujemo identitet flavonoida sakuranetina, čije je retencijsko vrijeme 9,74 minuta (Slika 7).



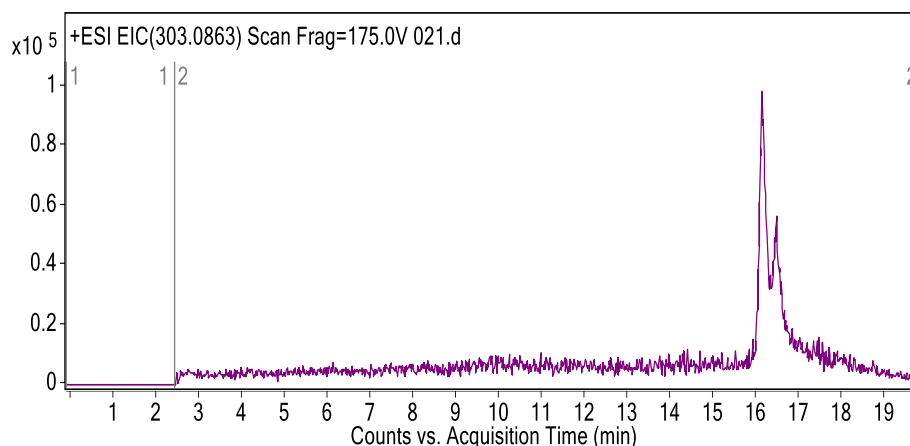
Slika 7. UV kromatogram inkubacijske smjese za sakuranetin bez dodanog generirajućeg sustava

Iz kromatograma izdvojenog iona sakuranetina saznajemo molekulsku masu sakuranetina koja iznosi 287,0913 te vidimo da se u 9,74 minuti pojavljuje pik koji odgovara sakuranetinu (Slika 8).

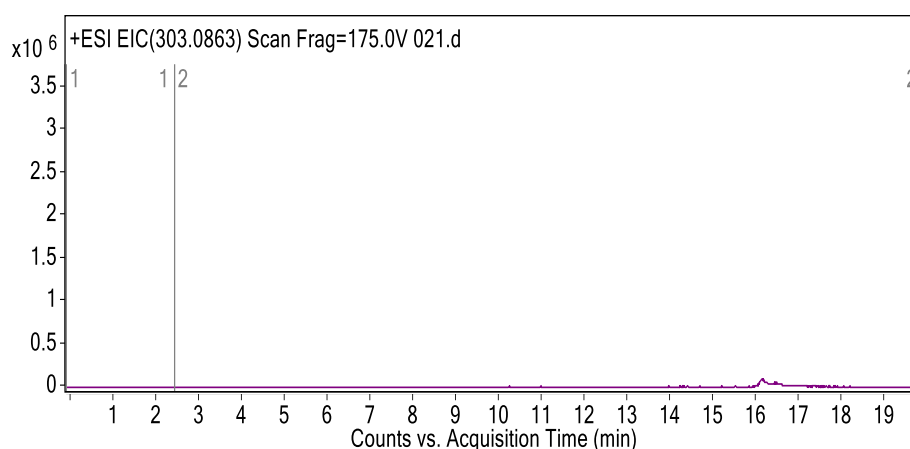


Slika 8. Kromatogram izdvojenog iona (eng. *Extracted Ion Chromatogram*, EIC) sakuranetina ($m/z = 287,0913$) inkubacijske smjese za sakuranetin bez dodanog generirajućeg sustava

Generirajući sustav pokreće reakciju te tako za potencijalni metabolit $C_{16}H_{14}O_6$ ($m/z = 303,0863$) u kromatogramu izdvojenog iona (Slika 9, Slika 10) ne nalazimo određeni pik jer se reakcija katalizirana CYP enzimom nije odvila.

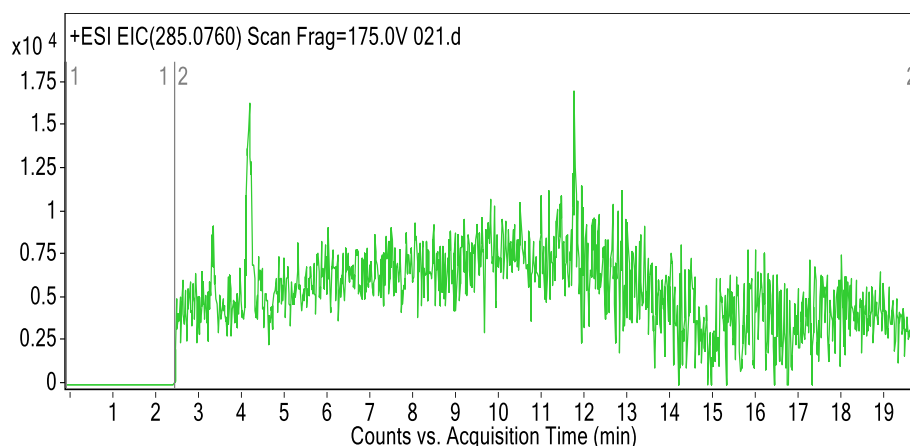


Slika 9. Kromatogram izdvojenog iona (eng. *Extracted Ion Chromatogram*, EIC) spoja formule $C_{16}H_{14}O_6$ ($m/z = 303,0863$) inkubacijske smjese za sakuranetin bez dodanog generirajućeg sustava

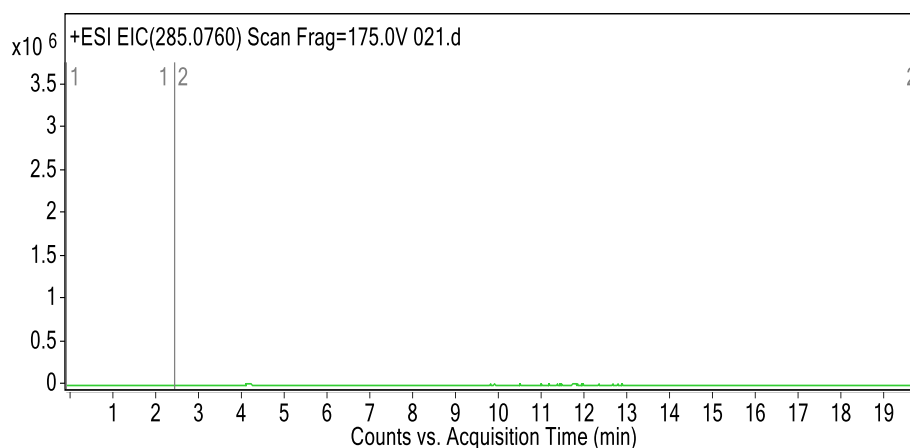


Slika 10. Kromatogram izdvojenog iona (eng. *Extracted Ion Chromatogram*, EIC) spoja formule $C_{16}H_{14}O_6$ ($m/z = 303,0863$) inkubacijske smjese za sakuranetin bez dodanog generirajućeg sustava

Također za potencijalni metabolit formule $C_{16}H_{12}O_5$ ($m/z = 285,0760$) u kromatogramu izdvojenog iona ne pronalazimo odgovarajući pik koji bi potvrdio njegov identitet, a to potvrđuju Slika 11 i Slika 12.

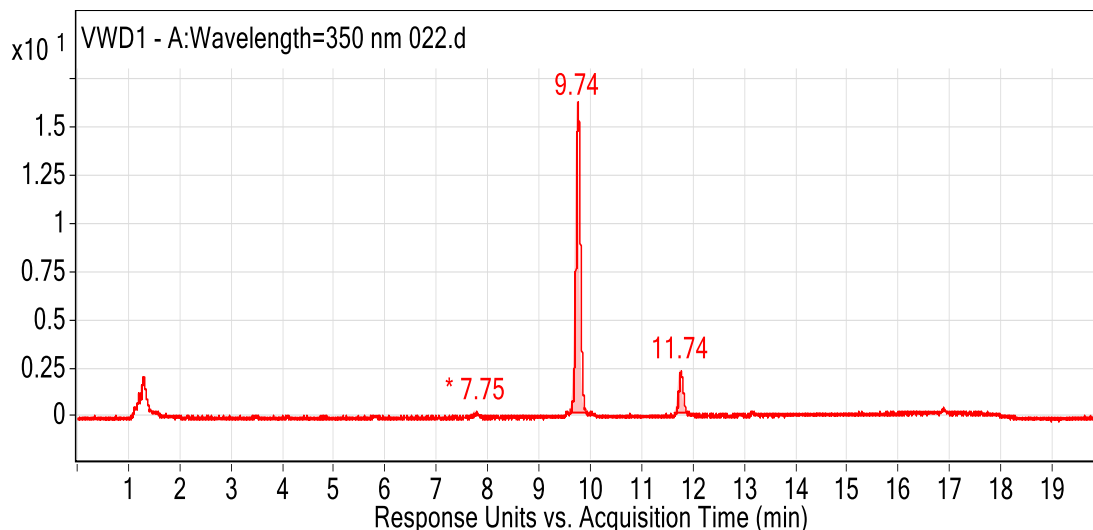


Slika 11. Kromatogram izdvojenog iona (eng. *Extracted Ion Chromatogram, EIC*) spoja formule $C_{16}H_{12}O_5$ ($m/z = 285,0760$) inkubacijske smjese za sakuranetin bez dodanog generirajućeg sustava



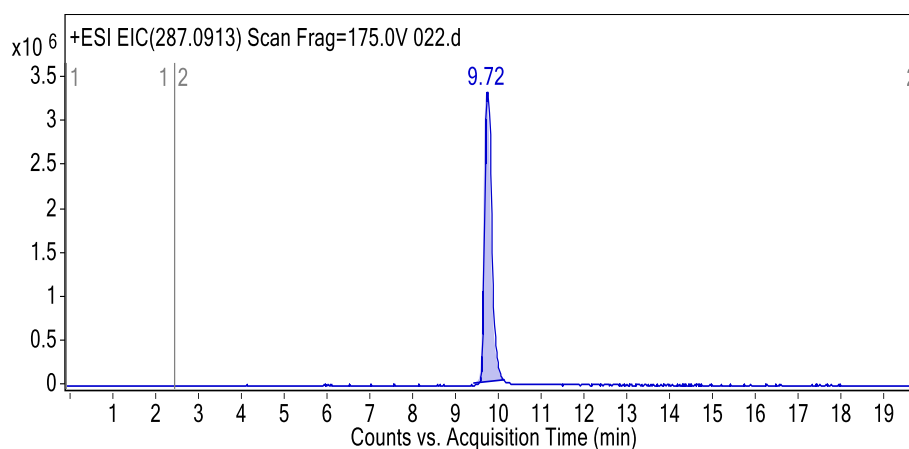
Slika 12. Kromatogram izdvojenog iona (eng. *Extracted Ion Chromatogram, EIC*) spoja formule $C_{16}H_{12}O_5$ ($m/z = 285,0760$) inkubacijske smjese za sakuranetin bez dodanog generirajućeg sustava

Ukoliko u reakcijsku smjesu dodamo generirajući sustav, osigurali smo potrebne koenzime za rad CYP3A4 enzima te možemo detektirati metabolite. Na UV kromatogramu zapažamo tri značajna pika koja imaju retencijska vremena 7,75 min.; 9,74 min. što odgovara sakuranetinu te 11,74 minuta. UV kromatogram prikazan je na Slici 13.



Slika 13. UV kromatogram inkubacijske smjese za sakuranetin s dodanim generirajućim sustavom

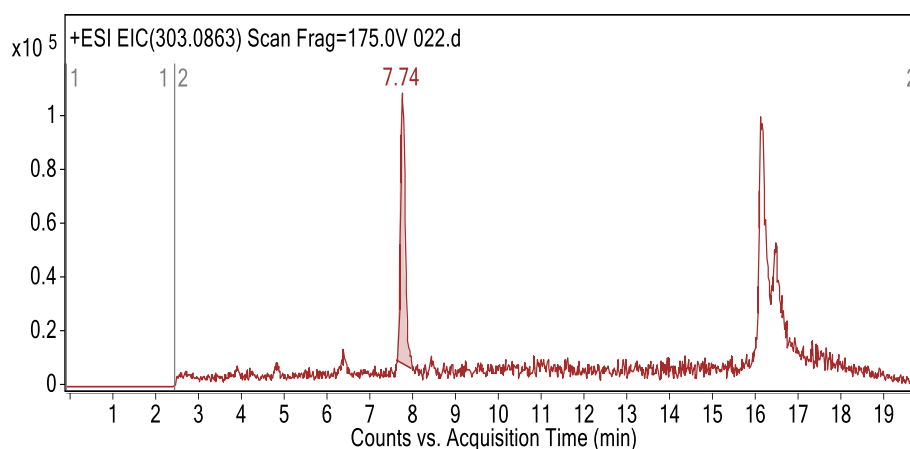
Za flavonoid sakuranetin odredili smo retencijsko vrijeme (9,74 minuta), molekulska masu 287,0913 te pripadajuću molekulska formulu $C_{16}H_{14}O_5$. Nakon dodatka generirajućeg sustava kromatogram se ne razlikuje od onoga prije dodatka generirajućeg sustava (Slika 14).



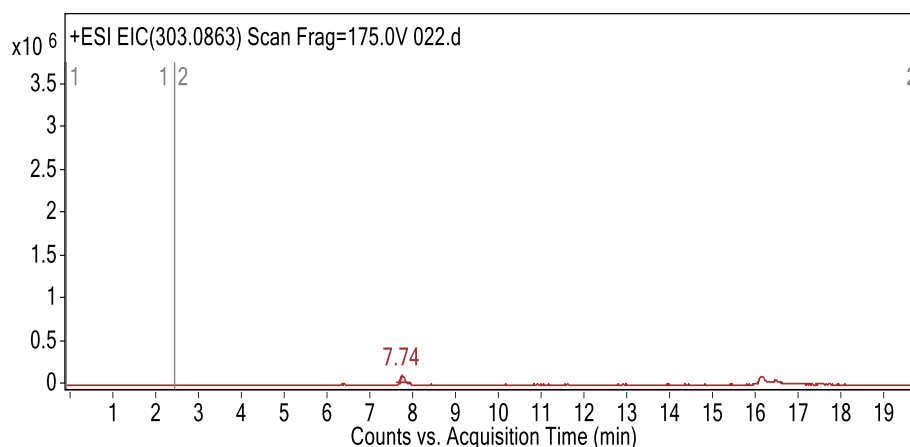
Slika 14. Kromatogram izdvojenog iona (eng. *Extracted Ion Chromatogram*, EIC) sakuranetina ($m/z = 287,0913$) inkubacijske smjese za sakuranetin s dodanim generirajućim sustavom

Nakon dodatka generirajućeg sustava detektirali smo dva novonastala spoja koja mogu biti potencijalni metaboliti sakuranetina. Prvi spoj $C_{16}H_{14}O_6$ ($m/z = 303,0863$) ima retencijsko vrijeme 7,74 minuta te su pripadajući kromatogrami prikazani slikama (Slika 15, Slika 16). Razlika u masama sakuranetina i ovoga metabolita je 15,995 te po molekulska formuli

dolazimo do zaključka da je ovo metabolit sakuranetina nastao u reakciji hidroksilacije katalizirane citokromom P450 3A4.



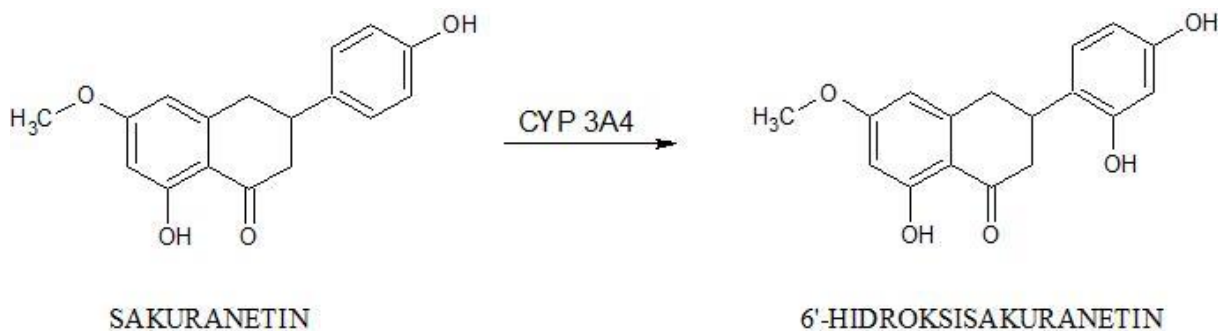
Slika 15. Kromatogram izdvojenog iona (eng. *Extracted Ion Chromatogram*, EIC) spoja formule C₁₆H₁₄O₆ ($m/z = 303,0863$) inkubacijske smjese za sakuranetin s dodanim generirajućim sustavom



Slika 16. Kromatogram izdvojenog iona (eng. *Extracted Ion Chromatogram*, EIC) spoja formule C₁₆H₁₄O₆ ($m/z = 303,0863$) inkubacijske smjese za sakuranetin s dodanim generirajućim sustavom

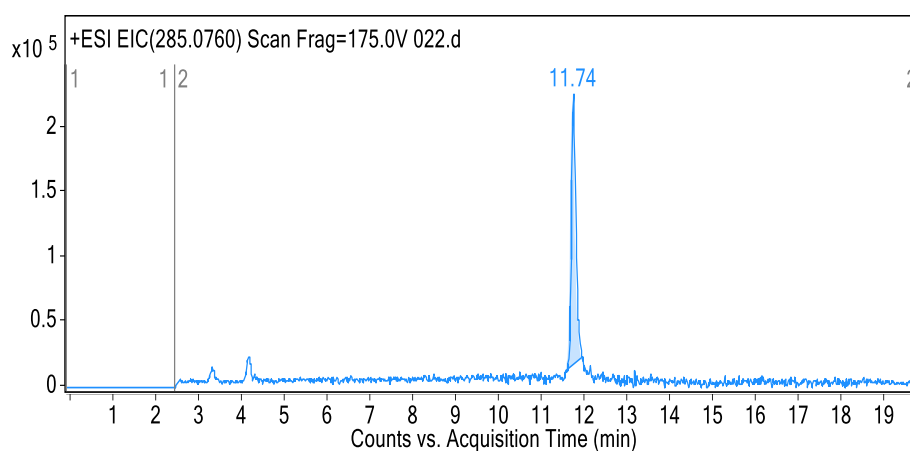
Sakuranetin se može naći u crnom orahu, biljci *Polymnia fruticosa* i riži, gdje djeluje fitoaleksin protiv klijavosti spora *Pyricularia oryzae*. Pokazano je da sakuranetin posjeduje antifungalno djelovanje (Kim, 2006).

Reakcija hidroksilacije sakuranetina prikazana je slikom 17.

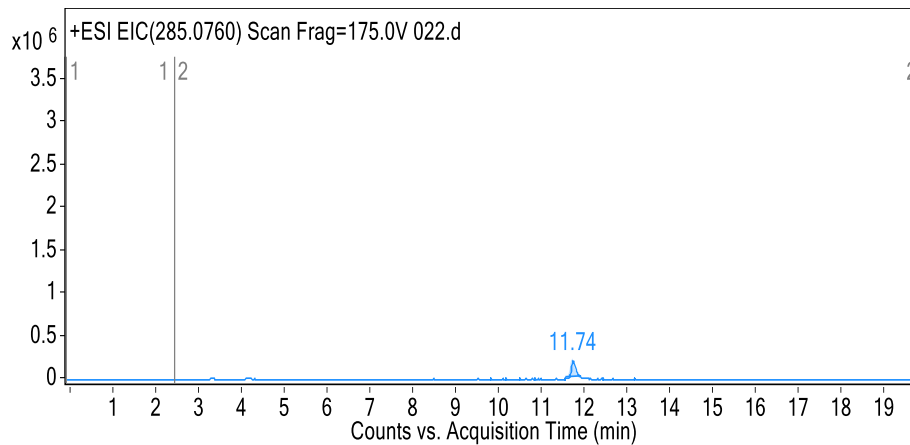


Slika 17. Hidroksilacija sakuranetina

Drugi spoj detektiran nakon dodatka generirajućeg sustava ima formulu $C_{16}H_{12}O_5$, $m/z = 285,0760$ i retencijsko vrijeme 11,74 minute što prikazuju kromatogrami na slikama (Slika 18, Slika 19). Razlika u masama sakuranetina i ovog spoja je 2,0153, a u molekulskim formulama razliku se za tri vodika te zaključujemo da ovaj produkt nije nastao u reakciji koju katalizira citokrom P450 3A4.



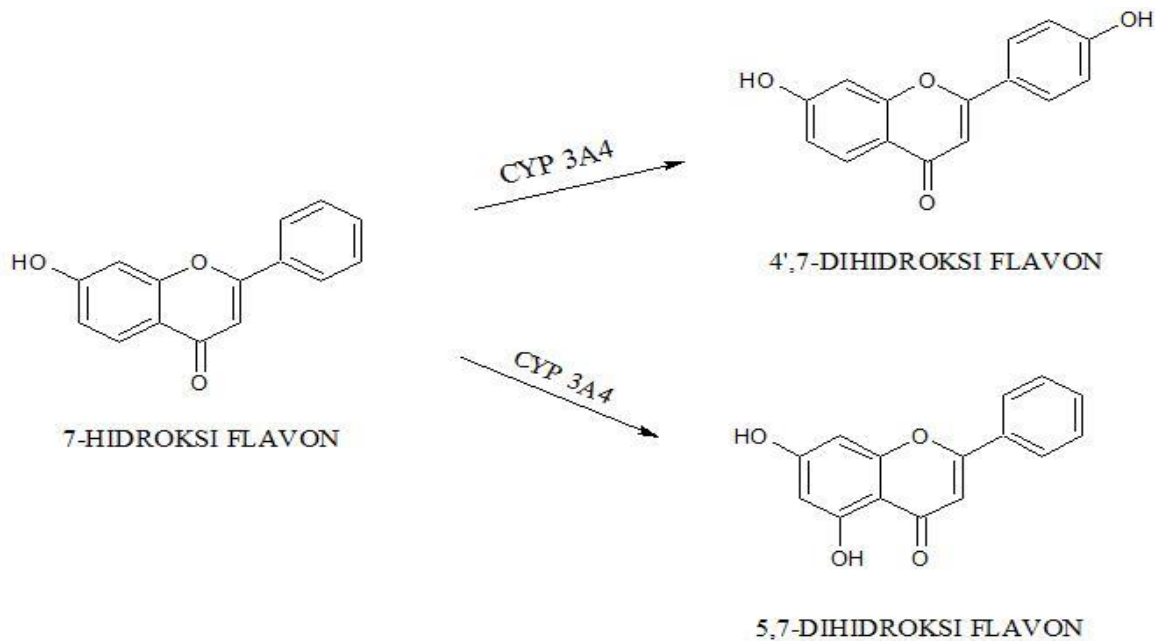
Slika 18. Kromatogram izdvojenog iona (eng. *Extracted Ion Chromatogram*, EIC) spoja formule $C_{16}H_{12}O_5$ ($m/z = 285,0760$) inkubacijske smjese za sakuranetin s dodanim generirajućim sustavom.



Slika 19. Kromatogram izdvojenog iona (eng. *Extracted Ion Chromatogram*, EIC) spoja formule $C_{16}H_{12}O_5$ ($m/z = 285,0760$) inkubacijske smjese za sakuranetin s dodanim generirajućim sustavom

4.2. 7-HIDROKSIFLAVON

Analizom podataka kako je prikazano na primjeru sakuranetina pokazano je da i za ovaj flavonoid citokrom 3A4 u reakcijama hidroksilacije daje dva različita metabolita. Slika 20 prikazuje reakcije koje katalizira CYP3A4, a nastali produkti su hidroksilirani na različitim pozicijama.



Slika 20. 7-hidroksiflavon u reakciji biotransformacije koju posreduje CYP3A4

Podatci dobiveni analizom pokazuju da prvi metabolit ima vrijeme zadržavanja na koloni 5,68 minuta, molekulska masu 254,0579 te molekulska formulu C₁₅H₁₀O₄. Drugi metabolit s kolone se eluira za 7,65 minuta, ima molekulska masu 254,058 i identičnu molekulska formulu kao prvi metabolit.

4.3. TANGERETIN

Za flavonoid tangeretin LC/MS metodom detektirali smo četiri metabolita: tri su nastala u reakciji hidroksilacije, a jedan je na dvije pozicije demetiliran. Tablica 3 prikazuje predložene strukture nastalih metabolita tangeretina.

Tablica 3. Metaboliti tangeretina

Metabolit i podatci	Struktura
4'-hidroksitangeretin RT: 9,4 minute Masa: 358,1049 Formula: C ₁₉ H ₁₈ O ₇	
8-hidroksitangeretin RT: 10,85 Masa: 358.1053 Formula: C ₁₉ H ₁₈ O ₇	
4',5-dihidroksitangeretin RT: 11,24 Masa: 344.0895 Formula: C ₁₈ H ₁₆ O ₇	
7-hidroksitangeretin RT: 14,16 Masa: 358.1049 Formula: C ₁₉ H ₁₈ O ₇	

Za ostalih osam flavonoida (apigenin, kemferol, flavon, galangin, 3,7-dihidroksiflavon, 6-hidroksiflavon, akacetin, naringenin) LC/MS tehnikom nije dokazano da je u njihov metabolizam uključen citokrom P450 3A4.

5. ZAKLJUČAK

Tekućinska kromatografija spregnuta sa spektrometrijom masa (LC-MS) i UV-Vis detektorom omogućuje pouzdano detektiranje metabolita pojedinog flavonoida. Sustav podataka bilježi, obrađuje, pohranjuje i prikazuje podatke na računalu kako bismo na kraju kao rezultat dobili spektar masa koji transparentno prikazuje analizirane podatke. Nakon analize s velikom sigurnošću možemo potvrditi identitet spoja, njegovu molekulsku masu i formulu, a također i vrijeme koje mu je potrebno kako bi se eluirao s kolone.

Dodatkom generirajućeg sustava u reakcijski sustav osigurava se koenzim potreban za reakcije oksigenacije katalizirane citokromom P450. Generirajući sustav čine glukoza-6-fosfat, glukoza-6-fosfat dehidrogenaza i NADP^+ . Kromatogrami koji prikazuju stanje reakcijskog sustava prije dodatka generirajućeg sustava daju informacije o identitetu ispitivanoga flavonoida jer se bez generirajućeg sustava reakcija biotransformacije ne odvija. Kromatogrami koji su snimljeni nakon dodatka generirajućeg sustava u reakcijsku smjesu daju informaciju o potencijalnim metabolitima. Usporedbom molekulskih formula metabolita i flavonoida, proučavajući vremena zadržavanja i analizirajući promjene u molekulskim formulama možemo zaključiti o postojanju reakcije biotransformacije koja se odvija posredstvom citokroma P450 3A4.

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-hidroksiflavon, galangin, 3,7-hidroksiflavon, 6-hidroksiflavon, akacetin, naringenin, sakuranetin i tangeretin. Za tri flavonoida pokazano je da se njihova biotransformacija do hidrofilnijih metabolita odvija posredstvom citokroma P450 3A4. Navedeni enzim u reakciji sa 7-hidroksiflavonom daje dva hidroksilirana metabolita, u reakciji sa sakuranetinom također hidroksilirani metabolit. U reakcijama demetilacije tangeretin daje 4 različita metabolita, od kojih je jedan demetiliran na dvije pozicije.

Citokrom P450 po svom su djelovanju tipične monooksigenaze, a na analiziranim flavonoidima pokazali su reakcije hidroksilacije kod 7-hidroksiflavona i sakuranetina te reakcije demetilacije tangeretina.

Tako je pokazano da se put biotransformacije ova tri flavonoida odvija posredstvom citokroma P450 3A4, što je vrlo važna informacija u farmakologiji jer otvara mogućnost objašnjavanja potencijalnih interakcija flavonoida s lijekovima kojima je CYP3A4 zajednički posrednik u metabolizmu.

6. LITERATURA

Bojić M. Predklinička ispitivanja inhibicijskog i interakcijskog potencijala novih lijekova na razini citokroma P450. *Farm glas*, 2015, 71, 229-242.

Bojić M, Šarić Mustapić D, Debeljak Ž. Inhibicijski učinak akcetina na metaboličku aktivnost citokroma P450 3A4. *Pharmacia*, 2015, 18, 160-161.

Chaimbault P, Jacob C, Kirsch G, Slusarenko A, Winyard PG, Burkholz T. Recent Advances in Redox Active Plant and Microbial Products. Houten, Springer Netherlands, 2014, str. 31-94.

Cooper BW, Cho TM, Thompson PM, Wallace AD. Phthalate Induction of CYP3A4 is Dependent on Glucocorticoid Regulation of PXR Expression. *Toxicol Sci*, 2002, 103, 268-277.

Cytochrome P450 from *Pseudomonas putida*, 2015., <https://chem-is-you.blogspot.hr/2015/05/oxygen-atom-transfer-cytochrome-p450.html>, pristupljeno 22.05.2017.

Dass C. Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry. Hoboken, John Wiley&Sons, 2007, str. 151-194.

Diagram of an LC-MS system, 2017., https://en.wikipedia.org/wiki/File:Liquid_chromatography_tandem_Mass_spectrometry_diagram.png, pristupljeno 22.05.2017.

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

Functional Foods Fact Sheet: Antioxidants, 2009., http://www.foodinsight.org/Functional_Foods_Fact_Sheet_Antioxidants, pristupljeno 22.05.2017.

Glycosides, 2017., <http://www.friedli.com/herbs/phytochem/glycosides.html#intro>, pristupljeno 08.03.2017.

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.

Kim BG, Jung BR, Lee Y, Hur HG, Lim Y, Ahn JH. Regiospecific flavonoid 7-O-methylation with *Streptomyces avermitilis* O-methyltransferase expressed in *Escherichia coli*. *J Agric Food Chem*, 2006, 54, 823-828.

Kumar S, Pandey AK. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *ScientificWorldJournal*, 2013, Article ID 162750.

Lohr LK. Drug Interactions With Newer Oral Chemotherapy Agent., *US Pharmacist*, 2009, 34, S4-8.

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

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

Stedman C, Robertson G, Coulter S, Liddle C. Feed-forward Regulation of Bile Acid Detoxification by CYP3A4. *J Biol Chem*, 2004, 279, 11336-11343.

7. SAŽETAK/ SUMMARY

7.1. SAŽETAK

Flavonoidi su fenolni spojevi koje sintetiziraju biljke te se kao takvi pojavljuju u većini jestivog voća i povrća. Uobičajeni ugljikov skelet C6-C3-C6 čini njihovu temeljnu strukturu, a razlikuju se po vrsti i položaju supstituenta. Generalno su prihvaćeni kao supstancije koje promoviraju zdravlje zbog svojeg antioksidativnog, antikancerogenog, antivirusnog, protuupalnog učinka, ali se zna da ovisno o dozi mogu djelovati i proupalno, prooksidativno i drugo. Kao i drugi ksenobiotici, i flavonoidi u organizmu podliježu apsorpciji, raspodjeli, metabolizmu i eliminaciji. U ovom radu od posebnog je interesa metabolizam aglikona flavonoida posredovan citokromom P450 3A4.

Za potrebe ovoga rada ispitano je jedanaest flavonoida koji su prethodnim probiranjem na humanim jetrenim mikrosomima pokazali metabolizam posredovan citokromima P450. Za identifikaciju metabolita pojedinih flavonoida primijenjena je tekućinska kromatografija spregnuta sa spektrometrijom masa (LC-MS) i UV-Vis detektorom. Proučavajući UV kromatograme, kromatograme izdvojenog iona, vremena zadržavanja spojeva i dobivene molekulske formule, možemo zaključiti o prisutnosti metabolita i tako potvrditi reakcije biotransformacije posredovane citokromom P450 3A4 za pojedini flavonoid. Od ispitanih flavonoida tri su pokazala da je u njihov metabolizam uključen CYP3A4 enzim: 7-hidroksiflavon, za koji su potvrđena dva hidroksilirana metabolita, sakuranetin, za koji je potvrđen jedan hidroksilirani metabolit te tangeretin za koji su potvrđeni hidroksilirani metabolit te jedan koji je metiliran na dvije pozicije.

Za flavonoide čije smo metabolite detektirali postoji potencijal interakcija s lijekovima koji se metaboliziraju posredstvom citokroma P450 3A4.

7.2. SUMMARY

Flavonoids are phenolic compounds synthesized by plants and as such appear in most edible fruits and vegetables. They are characterized by carbon skeleton C6-C3-C6, and differ by the type and position of the substituent. They are generally accepted as substances that promote health due to their antioxidant, anticancer, antiviral, anti-inflammatory effect, but depending of the dose they may be pro-inflammatory, prooxidative, etc. Like other xenobiotics, flavonoids in the body are subject to absorption, distribution, metabolism and elimination. In this study, the metabolism of aglycone of flavonoids mediated by cytochrome P450 3A4 was of particular interest.

For the purpose of this study, eleven flavonoids were tested, those that were metabolised by cytochrome P450 in the previous screening performed on human liver microsomes. Liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC-MS) and UV-Vis detector was used to identify the metabolites of specific flavonoids. By studying UV chromatographs, isolated ion chromatography, time retention and the resulting molecular formula, we can conclude the presence of the metabolite and thus confirm the P450 3A4 mediated biotransformation reactions for each flavonoid. Of the tested flavonoids, three showed that their metabolism included CYP3A4 enzyme: 7-hydroxyflavone, for which two hydroxylated metabolites were confirmed, sakuranetin, for which a hydroxylated metabolite and a tangerine for which a hydroxylated metabolite was confirmed and one dimethylated product.

For these flavonoids there is potential for interaction with drugs metabolised by the same cytochrome P450 3A4.

**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 3A4

Marija Posavčević

SAŽETAK

Flavonoidi su fenolni spojevi koje sintetiziraju biljke te se kao takvi pojavljuju u većini jestivog voća i povrća. Uobičajeni ugljikov skelet C6-C3-C6 čini njihovu temeljnu strukturu, a razlikuju se po vrsti i položaju supstituenta. Generalno su prihvaćeni kao supstancije koje promoviraju zdravlje zbog svojeg antioksidativnog, antikancerogenog, antivirusnog, protuupalnog učinka, ali se zna da ovisno o dozi mogu djelovati i proupalno, prooksidativno i drugo. Kao i drugi ksenobiotici, i flavonoidi u organizmu podliježu apsorpciji, raspodjeli, metabolizmu i eliminaciji. U ovom radu od posebnog je interesa metabolizam aglikona flavonoida posredovan citokromom P450 3A4.

Za potrebe ovoga rada ispitano je jedanaest flavonoida koji su prethodnim probiranjem na humanim jetrenim mikrosomima pokazali metabolizam posredovan citokromima P450. Za identifikaciju metabolita pojedinih flavonoida primijenjena je tekućinska kromatografija spregnuta sa spektrometrijom masa (LC-MS) i UV-Vis detektorom. Proučavajući UV kromatograme, kromatograme izdvojenog iona, vremena zadržavanja spojeva i dobivene molekulske formule, možemo zaključiti o prisutnosti metabolita i tako potvrditi reakcije biotransformacije posredovane citokromom P450 3A4 za pojedini flavonoid. Od ispitanih flavonoida tri su pokazala da je u njihov metabolizam uključen CYP3A4 enzim: 7-hidroksiflavon, za koji su potvrđena dva hidroksilirana metabolita, sakuranetin, za koji je potvrđen jedan hidroksilirani metabolit te tangeretin za koji su potvrđeni hidroksilirani metabolit te jedan koji je metiliran na dvije pozicije.

Za flavonoide čije smo metabolite detektirali postoji potencijal interakcija s lijekovima koji se metaboliziraju posredstvom citokroma P450 3A4.

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

Rad sadrži: 41 stranica, 20 grafičkih prikaza, 3 tablice i 18 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Flavonoidi, metabolizam, CYP3A4

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

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

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

Dr. sc. Maja Tomičić, *znanstvena suradnica, Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu.*

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 3A4

Marija Posavčević

SUMMARY

Flavonoids are phenolic compounds synthesized by plants and as such appear in most edible fruits and vegetables. They are characterized by carbon skeleton C6-C3-C6, and differ by the type and position of the substituent. They are generally accepted as substances that promote health due to their antioxidant, anticancer, antiviral, anti-inflammatory effect, but depending of the dose they may be pro-inflammatory, prooxidative, etc. Like other xenobiotics, flavonoids in the body are subject to absorption, distribution, metabolism and elimination. In this study, the metabolism of aglycone of flavonoids mediated by cytochrome P450 3A4 was of particular interest.

For the purpose of this study, eleven flavonoids were tested, those that were metabolised by cytochrome P450 in the previous screening performed on human liver microsomes. Liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC-MS) and UV-Vis detector was used to identify the metabolites of specific flavonoids. By studying UV chromatographs, isolated ion chromatography, time retention and the resulting molecular formula, we can conclude the presence of the metabolite and thus confirm the P450 3A4 mediated biotransformation reactions for each flavonoid. Of the tested flavonoids, three showed that their metabolism included CYP3A4 enzyme: 7-hydroxyflavone, for which two hydroxylated metabolites were confirmed, sakuranetin, for which a hydroxylated metabolite and a tangerine for which a hydroxylated metabolite was confirmed and one dimethylated product.

For these flavonoids there is potential for interaction with drugs metabolised by the same cytochrome P450 3A4.

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

Thesis includes: 41 pages, 20 figures, 3 tables and 18 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Flavonoids, metabolism, CYP3A4

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

Reviewers: **Mirza Bojić, Ph.D.**, *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Željko Maleš, Ph.D., *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Maja Tomičić, Ph.D., *Research Assistant*, Croatian institute for Transfusion Medicine

The thesis was accepted: May 2017