Metabolizam aglikona odabranih flavonoida posredovan humanim jetrenim citokromima P450

Benković, Goran

Doctoral thesis / Disertacija

2019

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:163:251183

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

Sveučilište u Zagrebu

FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Goran Benković

METABOLIZAM AGLIKONA ODABRANIH FLAVONOIDA POSREDOVAN HUMANIM JETRENIM CITOKROMIMA P450

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2019.

Sveučilište u Zagrebu

FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Goran Benković

METABOLIZAM AGLIKONA ODABRANIH FLAVONOIDA POSREDOVAN HUMANIM JETRENIM CITOKROMIMA P450

DOKTORSKI RAD

Mentor: Izv. prof. dr. sc. Mirza Bojić

Zagreb, 2019.

University of Zagreb

FACULTY OF PHARMACY AND BIOCHEMISTRY

Goran Benković

METABOLISM OF THE SELECTED FLAVONOID AGLYCONES MEDIATED BY HUMAN LIVER CYTOCHROMES P450

DOCTORAL THESIS

Supervisor: Izv. prof. dr. sc. Mirza Bojić

Zagreb, 2019.

Rad je predan na ocjenu Fakultetskom vijeću Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja akademskog stupnja doktora znanosti iz područja biomedicine i zdravstva, polje farmacija, grana farmacija.

Rad je izrađen u Agenciji za lijekove i medicinske proizvode, Zagreb, Hrvatska i na Zavodu za farmaceutsku kemiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, u sklopu doktorskog studija „Farmaceutsko-biokemijske znanosti“ Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te u sklopu projekta “Metabolizam i interakcije biološki aktivnih spojeva i QSAR” Hrvatske zaklade za znanost (UIP-2014-09-5704).

Zahvale:

Zahvaljujem mentoru izv. prof. dr. sc. Mirzi Bojiću na privrženosti, predanosti, odvojenom vremenu, praktičnom radu, entuzijazmu i ljubavi prema farmaceutskoj struci i znanosti koje je podijelio sa mnom tijekom izrade ovog doktorskog rada kao i na korisnim savjetima i sugestijama koje je ugradio u njegovo konačno oblikovanje.

Hvala prof. dr. sc. Marici Medić Šarić i doc. dr. sc. Željku Debeljaku što su me primili u trenutku kad je moj daljnji put na doktorskom studiju došao pod veliki znak pitanja i pomogli mi da se on ipak nastavi te uspješno dovrši.

Zahvaljujem dr. sc. Hrvoju Rimcu na njegovom doprinosu pri utvrđivanju strukturnih obilježja odgovornih za oksidativni metabolizam flavonoida.

Zahvaljujem se svima koji su mi na putu ovog ostvarenja na bilo koji način pomogli, a opraštam onima koji su mi u tome odmogli.

Osobita zahvala ide mojoj supruzi Mariji na svesrdnoj podršci, brojnim poticajima i ohrabrenjima te nadasve ustrajnoj ljubavi kojom mi je davala snagu potrebnu na ovom zahtjevnom putu. Njezina predana zauzetost oko našeg obiteljskog doma i djece stvorila je jedinstveno ozračje u kojem je naša obitelj i u otežanim uvjetima funkcionirala plodonosno u svim bitnim segmentima života, a meni istovremeno omogućila da započeto uspješno dovršim. Zato još jednom ponavljam: hvala ti, jube moja, od sveg srca!

I na kraju hvala Gospodinu Bogu što me poveo i proveo ovim putem te na providonosnoj pomoći u svim kritičnim fazama koju mi je udijelio po zagovoru naše nebeske majke Blažene Djevice Marije.

SAŽETAK

Flavonoidi su velika i heterogena skupina polifenolnih spojeva niske molekulske mase koje ljudi hranom svakodnevno unose, a organizmu predstavljaju ksenobiotike kojih se tijelo nastoji riješiti. Među najvažnijim mehanizmima koje ljudski organizam ima na raspolaganju za eliminaciju ksenobiotika jest oksidativni metabolizam koji je najvećim dijelom posredovan citokromima P450. Iako su rezultati istraživanja bioloških učinaka *in vitro* obećavajući, flavonoidi često ne ostvaruju svoj farmakološki potencijal *in vivo* zbog slabe bioraspoloživosti. Fiziološki mehanizmi djelovanja i metabolička sudbina flavonoida još su uvijek vrlo slabo istraženi.

Stoga je cilj ovoga rada bio karakterizirati oksidativni metabolizam većeg broja odabranih flavonoida posredovan humanim citokromima P450. U tu svrhu ispitano je 30 odabranih aglikona flavonoida u inkubacijama s humanim jetrenim mikrosomima i rekombinantnim citokromima P450. Nastanak metabolita praćen je tekućinskom kromatografijom spregnutom sa spektrometrijom masa visoke razlučivosti.

U 15 od 30 analiziranih flavonoida primijećen je metabolizam posredovan citokromima P450 1A2, 2C19, 2D6, 2E1 i/ili 3A4. Detektirani metaboliti nastali su reakcijama aromatske hidroksilacije ili *O*-demetilacije ili kombinacijom ovih reakcija. Vrijednosti konstante specifičnosti (k_{cat}/K_m) svih primijećenih metaboličkih reakcija kretale su se u širokom rasponu (0,0015-2,9) $\times$ 10^6 M^{-1} min^{-1} što upućuje na visoku selektivnost humanih jetrenih citokroma P450 prema flavonoidima. Enzim koji je daleko najučinkovitije metabolizirao ispitane flavonoide bio je CYP1A2 što sugerira da je zbog mogućih interakcija potreban dodatni oprez kod unosa flavonoida i istovremene primjene lijekova koji se primarno metaboliziraju putem CYP1A2. U određenoj su mjeri opisana i jedinstvena strukturna obilježja odgovorna za metabolizam posredovan citokromima P450 koja omogućuju predviđanje mogućih metaboličkih putova i za flavonoide koji nisu bili predmetom ovog istraživanja.

Dobiveni rezultati omogućuju bolje razumijevanje metabolizma flavonoida što može pomoći u prevladavanju niske bioraspoloživosti flavonoida *in vivo* i usmjeriti napore istraživača prema pronalaženju flavonoida s povoljnim terapeutskim i metaboličkim profilom.

Ključne riječi: flavonoidi, humani jetreni mikrosomi, citokromi P450, metabolizam, LC-MS, enzimska kinetika

SUMMARY

Introduction

Flavonoids are large and heterogeneous group of polyphenolic compounds with low molecular mass that people ingest in everyday diet, but represent xenobiotics which human organism tends to eliminate. Among most important mechanisms that human body has at disposal for elimination of xenobiotics is oxidative metabolism mainly mediated by cytochromes P450. Although results of *in vitro* studies are promising, due to low bioavailability flavonoids often do not demonstrate their pharmacological potential *in vivo*. Physiological mechanisms of act as well as metabolic fate of flavonoids are still poorly understood. Thus, the objective of this work was to characterize oxidative metabolism mediated by human cytochromes P450 of larger number of flavonoid compounds.

Materials and Methods

Human liver microsomes and recombinant cytochrome P450 enzymes were used in experiments on 30 selected flavonoid aglycones. The formation of metabolites following incubations of flavonoids with enzymes was monitored by liquid chromatography coupled with high resolution mass spectrometry. Enzymatic kinetics parameters were determined for observed metabolic reactions.

Results

Out of 30 analyzed flavonoids, 15 was susceptible to oxidative metabolism mediated by cytochromes P450 1A2, 2C19, 2D6, 2E1 and/or 3A4. The detected metabolites were formed by aromatic hydroxylation or *O*-demethylation, or combination of these reactions. The values of catalytic effectiveness (k_{cat}/K_m) of all observed metabolic reactions were obtained in very wide range from 0.0015 to 2.9×10^6 M^{-1} min^{-1} which indicates high selectivity of human liver cytochromes P450 to flavonoids. The dominant enzyme responsible for the observed metabolic reactions was CYP1A2. Specific structural characteristics responsible for metabolism mediated by cytochromes P450 were determined to some extent thus enabling prediction of possible metabolic pathways for flavonoids other than those analyzed in this study. Hydroxylation of flavones is catalyzed by human cytochromes P450 at position 3’ and 4’ of ring B, with position 4’ being favored on unsubstituted ring B. Hydroxylation is also possible at positions 6 and 8 of the ring A. Aromatic hydroxylation of an unsubstituted flavone is preferred at the position 4’ of the ring B, but hydroxylation is also possible at other

positions in the flavone structure. *O*-demethylation of the methoxy group in flavones is favored at position 4' of ring B, although it is also possible on ring A. Similarly to flavones, flavonols undergo aromatic hydroxylation catalyzed by human liver cytochromes P450 at the ring B, positions 3' and 4', whereas position 4' is favored on unsubstituted ring B. However, hydroxylation is also possible on ring A at positions 6 and 8, position 6 being favored in relation to position 8. The presence of two or more hydroxyl groups on the B ring of the flavonols appears to prevent further metabolism mediated by human liver cytochromes P450. Isoflavone ring B hydroxylation is favored at position 3', if a hydroxyl group at position 4' is already present in the structure. It has been shown that *O*-demethylation is possible at position 7 of the ring A and aromatic hydroxylation is possible at position 6 of the ring A in isoflavone skeleton. Flavanones undergo hydroxylation of the ring B that is favored at the position 3', if a hydroxyl group at the position 4' is already present in the structure and *O*-demethylation is possible at the position 4' of the ring B and at the position 7 of the ring A.

Conclusion

The overall conclusion of this study is that flavonoid aglycons undergo two types of oxidative reactions: aromatic hydroxylations and *O*-demethylations catalyzed mainly by cytochrome P450 1A2. Having in mind high expression and involvement of CYP1A2 in metabolism of xenobiotics including drugs, and its intraindividual differences in expression and activity, potential of drug-flavonoid competitive interactions/inhibitions should be considered when consuming dietary supplement and foods rich in flavonoids. Aromatic hydroxylation is favored at the position 4' of B ring, and in 3' if a hydroxyl group at the position 4' is already present in the structure. Moreover, the presence of two or more hydroxyl groups on the B ring of the flavonoid aglycons appears to prevent further metabolism mediated by human liver cytochromes P450. *O*-demethylation of the methoxy group is favored at the position 4' of ring B. These results contribute to better understanding of flavonoid metabolism thus helping to overcome their low bioavailability *in vivo* and steer the efforts of researchers towards detecting flavonoids with desirable therapeutic and metabolic profiles.

Keywords: flavonoids, human liver microsomes, cytochromes P450, metabolism, LC-MS, enzyme kinetics

SADRŽAJ

1. UVOD 1

1.1 Metabolizam ksenobiotika 2

1.2 Citokromi P450 8

1.2.1 Uloga citokroma P450 u metabolizmu lijekova 13

1.2.2 Interakcije, inhibicije, indukcije posredovane citokromima P450 16

1.2.3 Predviđanje metabolizma 19

1.3 Enzimska kinetika 20

1.4 Flavonoidi 22

1.4.1 Oksidativni metabolizam flavona 27

1.4.2 Oksidativni metabolizam flavonola 31

1.4.3 Oksidativni metabolizam izoflavona 32

1.4.4 Oksidativni metabolizam flavanona 34

1.4.5 Sažetak literaturnog pregleda oksidativnog metabolizma flavonoida 36

1.4.6 Završne napomene 39

1.5 Analitička metodologija u istraživanju metabolizma ksenobiotika posredovanog citokromima P450 39

1.5.1 *In vivo* sustavi 40

1.5.2 Tkivni mikrosomalni sustavi 40

1.5.3 Pročišćeni citokromi P450 u rekonstituiranim sustavima 40

1.5.4 Membrane iz heterolognih ekspresijskih sustava 41

1.5.5 Analitičke tehnike korištene za praćenje enzimskih reakcija 42

1.5.6 Tehnike odjeljivanja 42

1.5.7 Tehnike analize 42

1.5.8 Završne napomene 45

2 CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA 46

3 MATERIJALI I METODE 49

3.1 Odabrani flavonoidni aglikoni 50
3.2 Kemikalije 52
3.3 Poredbene otopine flavonoida 52
3.3.1 Primjer pripreme poredbenih otopina 53
3.4 Inkubacijska smjesa za ispitivanje metabolizma flavonoida posredovanog humanim jetrenim mikrosomima 54
3.5 Inkubacijska smjesa za ispitivanje metabolizma flavonoida posredovanog specifičnim rekombinantnim citokromima P450 55
3.6 Inkubacijska smjesa za ispitivanje inhibicije metabolizma specifičnim inhibitorima citokroma P450 56
3.7 Enzimska kinetika 57
3.7.1 Inkubacijske smjese za ispitivanje metabolizma flavonoida posredovanog humanim jetrenim mikrosomima 57
3.7.2 Inkubacijske smjese za ispitivanje metabolizma flavonoida posredovanog specifičnim rekombinantnim citokromima P450 58
3.7.3 Izračun parametara enzimske kinetike 59
3.7.4 Primjer pripreme otopina za eksperimente s enzimskom kinetikom i izračun koncentracija supstrata 59
3.8 HPLC/Q-TOF-MS analiza 61
3.8.1 LC-MS metoda za ispitivanje metabolizma flavonoida 62
3.9 Prediktivni statstički modeli 64
3.9.1 Statistička analiza 64
3.9.2 Sidrenje 64
4 REZULTATI 66
4.1 Razvoj LC/MS metode za identifikaciju i određivanje metabolita aglikona odabranih flavonoida 67
4.2 Izrada baze podataka za identifikaciju odabranih flavonoida i njihovih metabolita . 70
4.3 Probir aglikona flavonoida na temelju metabolizma s humanim jetrenim mikrosomima 73

4.3.1 3,7-Dihidroksiflavon 75
4.3.2 7-Hidroksiflavon 81
4.3.3 Akacetin 87
4.3.4 Apigenin 90
4.3.5 Diosmetin 95
4.3.6 Flavon 100
4.3.7 Galangin 106
4.3.8 Genistein 111
4.3.9 Hesperetin 117
4.3.10 Kemferol 122
4.3.11 Krizin 124
4.3.12 Naringenin 131
4.3.13 Prunetin 137
4.3.14 Sakuranetin 144
4.3.15 Tangeretin 151
4.4 Određivanje specifičnih citokroma P450 odgovornih za metabolizam odabranih aglikona flavonoida 157
4.4.1 3,7-Dihidroksiflavon 157
4.4.2 7-Hidroksiflavon 158
4.4.3 Akacetin 160
4.4.4 Apigenin 161
4.4.5 Flavon 162
4.4.6 Galangin 163
4.4.7 Kemferol 164
4.4.8 Naringenin 165
4.4.9 Sakuranetin 166
4.4.10 Tangeretin 168

4.5 Inhibicije metabolizma specifičnim inhibitorima citokroma P450 170
4.5.1 3,7-Dihidroksiflavon 170
4.5.2 Sakuranetin 173
4.6 Rezultati enzimske kinetike 176
4.6.1 3,7-Dihidroksiflavon 176
4.6.2 7-Hidroksiflavon 178
4.6.3 Akacetin 184
4.6.4 Apigenin 186
4.6.5 Flavon 187
4.6.6 Galangin 189
4.6.7 Kemferol 190
4.6.8 Naringenin 191
4.6.9 Sakuranetin 192
4.6.10 Tangeretin 196
4.7 Sažeti prikaz rezultata metabolizma odabranih flavonoidnih aglikona 201
4.8 Prediktivni statistički modeli 205
4.8.1 Statistička analiza 205
4.8.2 Sidrenje 206
5 RASPRAVA 210
5.1 Oksidativni metabolizam flavona 211
5.1.1 Akacetin 211
5.1.2 Apigenin 212
5.1.3 Diosmetin 213
5.1.4 Flavon 213
5.1.5 7-Hidroksiflavon 214
5.1.6 Krizin 215
5.1.7 Tangeretin 216

5.1.8 Opće karakteristike oksidativnog metabolizma flavona 217
5.2 Oksidativni metabolizam flavonola 218
5.2.1 3,7-Dihidroksiflavon 218
5.2.2 Galangin 220
5.2.3 Kemferol 222
5.2.4 Opće karakteristike oksidativnog metabolizma flavonola 223
5.3 Oksidativni metabolizam izoflavona 223
5.3.1 Genistein 223
5.3.2 Prunetin 224
5.3.3 Opće karakteristike oksidativnog metabolizma izoflavona 225
5.4 Oksidativni metabolizam flavanona 225
5.4.1 Hesperetin 225
5.4.2 Naringenin 226
5.4.3 Sakuranetin 227
5.4.4 Opće karakteristike oksidativnog metabolizma flavanona 228
5.5 Opće karakteristike oksidativnog metabolizma flavonoidnih aglikona 229
5.6 Enzimska kinetika metaboličkih reakcija flavonoidnih aglikona 231
5.6.1 Usporedba s enzimskom kinetikom metaboličkih reakcija flavonoida i lijekova iz literature 235
5.7 Važnost drugih metaboličkih puteva za ukupni metabolizam flavonoida 241
6 ZAKLJUČAK 248
7 POPIS KRATICA I SIMBOLA 252
8 LITERATURA 256
9 PRILOZI 266
10 ŽIVOTOPIS 301
11 TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA 304

1. UVOD

Učinkovitost i sigurnost dva su temeljna elementa koji određuju terapijsku primjenu lijeka za liječenje određene bolesti. U odnosu na interakcije lijeka s molekularnim metama na mjestu djelovanja kao i s onima izvan mjesta djelovanja definirani su njegovi profili učinkovitosti i sigurnosti. Osim toga, na dostupnost lijeka molekularnim metama neizbježno utječe njegova sudbina nakon ulaska u ljudski organizam. Kad se govori o sudbini lijeka u organizmu, podrazumijeva se ukupnost složenih procesa koje nazivamo apsorpcija, distribucija, metabolizam i ekskrecija (engl. *absorption*, *distribution*, *metabolism and excretion*, ADME). Mehanicistički gledano, enzimi i transportni proteini koji sudjeluju u metabolizmu lijeka (engl. *drug-metabolizing enzymes and transporeters*, DMET) molekularne su odrednice ADME-procesa. Stoga su farmakokinetička i toksikokinetička svojstva lijeka, poput bioraspoloživosti, vremena poluživota i izloženosti, određena njegovom interakcijom s DMET-om. Na temelju te interakcije konačno se determinira profil učinkovitosti i sigurnosti lijeka [1].

Budući da je fokus ovoga rada proučavanje metabolizma, u nastavku će biti detaljnije obrađena ova komponenta ADME-procesa kao uvod u područje istraživanja.

1.1 Metabolizam ksenobiotika

Metabolizam se može sažeti kao ukupnost svih kemijskih reakcija unutar stanice koje organizam koristi za održavanje života. I dok se neke od ovih reakcija zbivaju spontano, za većinu je potrebna enzimska aktivacija. Metabolizam se općenito može podijeliti na katabolizam, koji rezultira cijepanjem molekula, te na anabolizam, koji rezultira sintezom molekula. U cjelini, katabolizam molekula hrane osigurava potrebnu energiju i za sve ostale metaboličke reakcije, uključujući uklanjanje razgradnih endogenih produkata i ksenobiotika. Metabolizam može povećati toksičnost nekog spoja i u tom slučaju radi se o reakciji aktivacije ili bioaktivaciji. Ipak, češće metabolizam smanjuje toksičnost tvari i tada govorimo o reakciji detoksikacije. Izraz ksenobiotik (engl. *xenobiotic*) u literaturu je uveden sredinom 1960-tih godina, a označava bilo koju kemikaliju kojoj je neki organizam izložen, a strana je ili neuobičajena za normalni metabolizam tog organizma [2]. Prema tome, tu ubrajamo pesticide, industrijske kemikalije, onečišćenja u okolišu, tj. polutante, industrijski proizvedene i prirodne lijekove, tvari koje izazivaju ovisnost, kemikalije povezane s odlaganjem otpada, strane tvari koje su produkti drugih organizama, produkte pirolize u obrađenoj hrani, itd. [2,3]. Caldwell je postavio okvir u kojem ksenobiotici mogu biti podvrgnuti jednom od slijedeća četiri procesa:

1) Eliminacija u nepromijenjenom obliku
2) Nakupljanje u organizmu u nepromijenjenom obliku
3) Spontana kemijska transformacija
4) Metabolizam posredovan enzimima

Eliminacija u nepromijenjenom obliku u urinu najvjerojatnija je za hidrofilne tvari, a u fecesu za lipofilne tvari. Rijetki se ksenobiotici zadržavaju u organizmu dugo u nepromijenjenom obliku, ali neke anorganske tvari poput olova, kadmija mogu se nakupljati u kostima, a neke organske tvari poput mireksa mogu se nakupljati u masnom tkivu i zadržati se dugo. Spontana kemijska transformacija je relativno rijetka, dok je metabolizam posredovan enzimima dominantan mehanizam obrade za većinu ksenobiotika [2]. Ovaj proces pretvorbe, obično lipofilnih ksenobiotika, u spojeve topljive u vodi, kataliziran enzimima u jetri i drugim organima poznat je pod nazivom biotransformacija (engl. *biotransformation*). Važna posljedica biotransformacije je promjena fizičkih svojstava ksenobiotika od onih koja pogoduju apsorpciji (lipofilnost) prema onima koja pogoduju ekskreciji u urinu ili fecesu (hidrofilnost). Iznimka od ovog općeg pravila je eliminacija hlapljivih tvari izdisanjem. U ovom slučaju biotransformacija u nehlapljive, u vodi topljive spojeve može usporiti brzinu eliminacije. Slično tome, biotransformacija ksenobiotika u mozgu i testisima (dva organa s barijerama za kemijski transport) također može biti smetnja eliminaciji ako nastali metaboliti ne mogu iz tih organa prijeći u krv. Lipofilni ksenobiotici bi se bez biotransformacije uklanjali iz organizma toliko sporo da bi se nakon određenog vremena nakupili u koncentraciji koja bi mu mogla naštetiti. Ovo je načelo dobro ilustrirano usporedbom teoretske i opažene brzine eliminacije barbitala i heksobarbitala. Teoretsko vrijeme poluživota barbitala, koji je topljiv u vodi i koji se eliminira iz organizma uglavnom u nepromijenjenom obliku, dobro odgovara opaženom vremenu poluživota ovog lijeka ($t_{1/2}$ = 55-75 h). Suprotno tome, opaženo vrijeme poluživota heksobarbitala ($t_{1/2}$ = 5-6 h) značajno je kraće od teoretske brzine eliminacije ovog izuzetno lipofilnog lijeka ($t_{1/2}$ = 2-3 mjeseca). Razlika u odnosu na barbital jest u biotransformaciji heksobarbitala u metabolite topljive u vodi koji se lako eliminiraju iz organizma. Promjena u fizičkim svojstvima i farmakokinetičkom ponašanju nije jedina posljedica biotransformacije ksenobiotika, niti je, u određenim slučajevima, najvažniji ishod. Ksenobiotici pokazuju određene učinke u biološkim sustavima. Oni mogu biti korisni, kao u slučaju lijekova, ili štetni, kao u slučaju otrova, ovisno o fizičko-kemijskim svojstvima ksenobiotika. U puno slučajeva, kemijska promjena ksenobiotika mijenja i njegove biološke učinke. Važnost ovog načela u farmakologiji je u tome što neki lijekovi moraju proći

biotransformaciju kako bi pokazali farmakološki učinak, tj. metabolit, a ne sam lijek, pokazuje farmakološki učinak. Slično tome, važnost ovog načela u toksikologiji sastoji se u tome da neki ksenobiotici moraju proći biotransformaciju kako bi imali toksičan ili kancerogen učinak. Ipak, u većini slučajeva biotransformacija dokida farmakološke učinke lijekova i umanjuje toksičnost ksenobiotika. Izrazi „biotransformacija“ i „metabolizam“ često se koriste kao sinonimi, osobito kad se odnose na lijekove. Primjerice, enzimi odgovorni za biotransformaciju ksenobiotika (engl. *xenobiotic biofransforming enzymes*) često se nazivaju enzimima koji sudjeluju u metabolizmu lijeka (engl. *drug-metabolising enzymes*, DME). Prvi je izraz sveobuhvatniji, ali prikriva činjenicu da su primjerice steroidi kao i neki drugi endogeni spojevi supstrati tih enzima. “Metabolizam“ se često koristi i kao izraz koji označava biotransformaciju, što je razumljivo ako se uzme u obzir da se produkti biotransformacije ksenobiotika nazivaju „metabolitima“. Osim toga, pojedinci s genetskim nedostatkom enzima koji rezultira oslabljenom biotransformacijom ksenobiotika opisuju se kao „spori metabolizatori“ (engl. *poor metabolizers*), a ne kao „spori biotransformatori“ (engl. *poor biotranformers*) [3].

Reakcije katalizirane enzimima odgovornima za biotransformaciju ksenobiotika obično su podijeljene u dvije grupe, a nazivamo ih faza I i faza II (tablica 1). Reakcije faze I uključuju oksidacije i redukcije. Posljedica tih reakcija je tzv. funkcionalizacija ksenobiotika, tj. uvođenje ili demaskiranje funkcionalne skupine (–OH, $–NH_2$, –SH ili –COOH), što obično rezultira malim povećanjem hidrofilnosti i molekulske mase te također osigurava pogodna mjesta za naknadne reakcije faze II. Reakcije faze II uključuju sulfataciju, glukuronidaciju, acetilaciju, metilaciju, konjugaciju s glutationom, konjugaciju s aminokiselinama (poput glicina, taurina i glutamatne kiseline) te konjugaciju s vodom (hidrolizu). Koenzimi (o tome će biti više riječi kasnije u ovom poglavlju) tih reakcija reagiraju s funkcionalnim skupinama ksenobiotika koje su ili bile izvorno prisutne ili su dodane/demaskirane tijekom faze I biotransformacije. U većini slučajeva, suprotno od faze I, reakcije faze II obično rezultiraju značajnijim promjenama hidrofilnosti i molekulske mase čime ksenobiotici postaju puno topljiviji u vodi i pogodni za ekskreciju iz organizma. [2-7]. Faza I može, ali i ne mora prethoditi fazi II biotransformacije ksenobiotika. Primjerice, morfin, heroin i kodein metaboliziraju se u morfin-3-glukuronid. U slučaju morfina, ovaj se metabolit formira direktnom konjugacijom s glukuronskom kiselinom. U druga dva slučaja, konjugaciji s glukuronskom kiselinom prethodi faza I biotransformacije: hidroliza (deacetilacija) u slučaju heroina i *O*-demetilacija (posredovana citokromima P450) u slučaju kodeina. Slično tome,

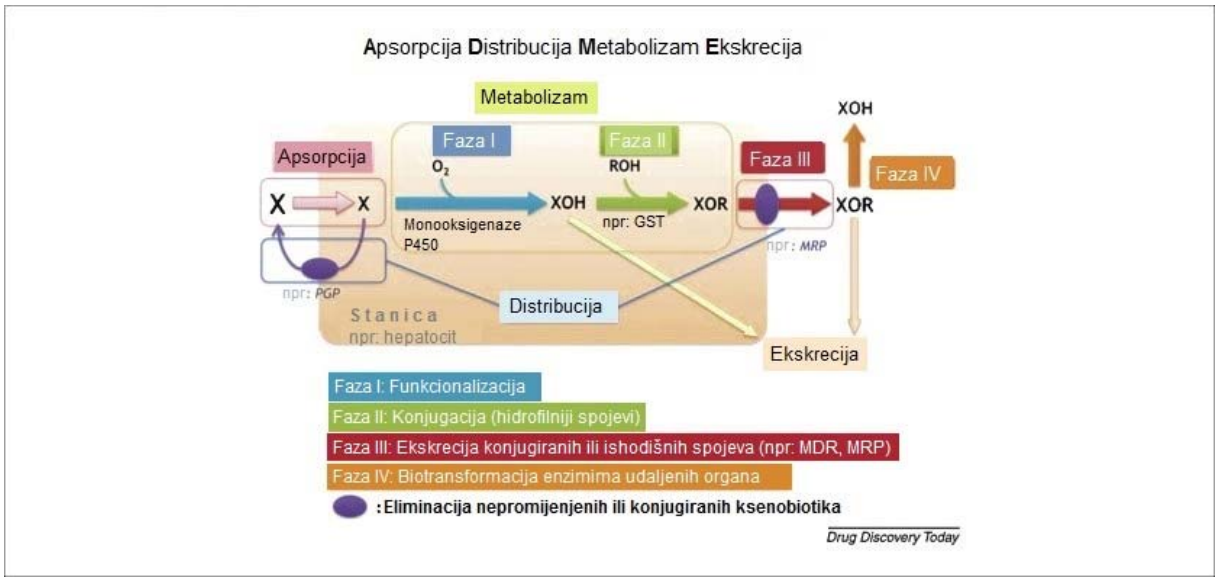
paracetamol može biti glukuronidiran ili sulfatiran direktno, dok fenacetin mora prethodno proći fazu I metabolizma nakon čega je *O*-deetilacijom preveden u paracetamol. Ovi primjeri dobro ilustriraju kako je faza I često potrebna za zbivanje faze II biotransformacije. Općenito, faza II ne prethodi fazi I biotransformacije, iako i tu ima iznimaka od općeg pravila. Primjerice, neki sulfatirani steroidi (uključujući i neke steroide disulfate) hidroksilirani su citokromima P450 [3].

Tablica 1. Opće reakcije i enzimi biotransformacije ksenobiotika i njihove glavne subcelularne lokalizacije

Reakcija	**Enzim**	**Lokalizacija**
	Faza I	
Oksidacija	Alkoholdehidrogenaza	Citosol,
	Aldehiddehidrogenaza	Mitohondriji, citosol
	Aldehidoksidaza	Citosol
	Ksantinoksidaza	Citosol
	Monoaminoksidaza	Mitohondriji
	Diaminoksizada	Citosol
	Prostaglandin-*H*-sintaza	Mikrosomi
	Flavin-monooksigenaze	Mikrosomi
	Citokromi P450	Mikrosomi
Redukcija	Azo- i nitroreduktaza	Mikroflora, mikrosomi, citosol
	Karbonilreduktaza	Citosol, krv lizosomi
	Disulfidreduktaza	Citosol
	Sulfoksidreduktaza	Citosol
	Kinonreduktaza	Citosol, mikrosomi
	Faza II	
Hidroliza	Esteraza	Mikrosomi, citosol, lizosomi, krv
	Peptidaza	Krv, lizosomi
	Epoksidhidrolaza	Mikrosomi, citosol
Sulfatacija	Sulfotransferaze	Citosol
Glukuronidacija	Uridindifosfatglukuronoziltransferaze	Mikrosomi
Konjugacija glutationom	Glutation-*S*-transferaze	Citosol, mikrosomi
Konjugacija aminokiselinom	Više enzima	Mitohondriji, mikrosomi
Acetilacija	*N*-acetiltransferaze	Mitohondriji, citosol
Metilacija	Metiltransferaze	Citosol, mikrosomi, krv

Supstrati enzima faze II metabolizma ksenobiotika obično su lipofilni i ulaze u intracelularni prostor difuzijom. Suprotno tome, konjugati nastali metabolizmom unutar hepatocita obično su dovoljno hidrofilni da pasivnom difuzijom ne mogu prolaziti kroz kanalikularne membrane u žuč ili kroz jetrene bazolateralne membrane u sinusoidalnu krv, nego im je potreban transport posredovan nosačima kako bi prešli difuzijsku barijeru. Posebni transportni proteini, koji učinkovito izbacuju metabolite faze II metabolizma, prisutni su u apikalnoj (kanalikularnoj) i bazolateralnoj (sinusoidalnoj) domeni plazmatske membrane hepatocita [6]. U posljednje vrijeme prepoznata je važna uloga transportnih proteina koji izbacuju lijekove iz stanice u (in)aktivaciji i detoksikaciji lijekova u koordinaciji s enzimima koji sudjeluju u metabolizmu. Izbacivanje metabolita transportnim proteinima danas se često opisuje kao faza III metabolizma ksenobiotika [5,8]. Iako je područje hepatičkog transporta relativno nova disciplina, danas je prepoznat kao kritični proces u hepatobilijarnoj raspodjeli lijeka. I dok se na hepatičkoj sinusoidalnoj i kanalikularnoj membrani nalaze brojni transportni proteini, trenutne spoznaje govore da tek apikalni Mrp2 (Abcc2) (engl. *multidrug resistance-associated protein 2*) i Bcrp (Abcg2) (engl. *breast cancer resistance protein*) te bazolateralni Mrp3 (Abcc3) i Mrp4 (Abcc4) imaju glavnu ulogu u hepatičkoj bilijarnoj i bazolateralnoj ekskreciji metabolita faze II metabolizma ksenobiotika [6].

Sumarni prikaz procesa koji određuju sudbinu ksenobiotika (lijeka) nakon unosa u organizam opisanih u ovom poglavlju prikazan je na slici 1.



Slika 1. Shematski prikaz faza I-IV sudbine ksenobiotika (X) u hepatocitu. ADME-procesi uključeni su u različite faze biotransformacije. Odmah nakon apsorpcije, pumpe za izbacivanje ksenobiotika, poput P-glikoproteina (P-gp) mogu izbacivati X kako bi smanjile njegovu unutarstaničnu koncentraciju. Unutar stanice hepatocita X se može transformirati enzimima faze I biotransformacije ksenobiotika (uglavnom citokromi P450) i nakon toga direktno eliminirati iz organizma ili dalje konjugirati enzimima faze II biotransformacije ksenobiotika, primjerice glutation-*S*-transferazama (GST) i nakon toga eliminirati transportnim proteinima faze III. Ovaj korak uključuje brojne transportne proteine poput Mrp-a (engl. *multidrug resistance-associated protein*) ili P-gp. Faza IV obuhvaća transformaciju u udaljenim organima drugim metaboličkim enzimima i nije raspravljana u ovom poglavlju. Prevedeno i prilagođeno prema: L. Huynh, R. Masereeuw, T. Friedberg, M. Ingelman-Sundberg, P. Manivet. In silico platform for xenobiotics ADME-T pharmacological properties modeling and prediction. Part I: Beyond the reduction of animal model use. Drug Discov Today 14 (2009) 401-405.

Velika raznolikost mogućih metaboličkih transformacija omogućuje organizmu eliminaciju praktički bilo koje strane tvari s kojom se susretne. S druge strane, ova raznolikost biotransformacije znanstvenicima predstavlja jedinstven izazov u identificiranju koji su od različitih mogućih metabolita stvarno formirani *in vitro* ili *in vivo* i koji su od brojnih enzima odgovorni za njihov nastanak [4]. Predviđanje sudbine lijeka na razini pojedinačnog pacijenta i njegovog odgovora na terapiju još je uvijek vizija čije je ostvarenje u rutinskoj kliničkoj praksi prilično daleko. Prepoznavanje izvora i razumijevanje čimbenika koji doprinose velikoj farmakodinamičkoj i farmakokinetičkoj varijabilnosti ljudskog organizma ostaje izazov od osobite važnosti za lijekove uske terapijske širine [9].

1.2 Citokromi P450

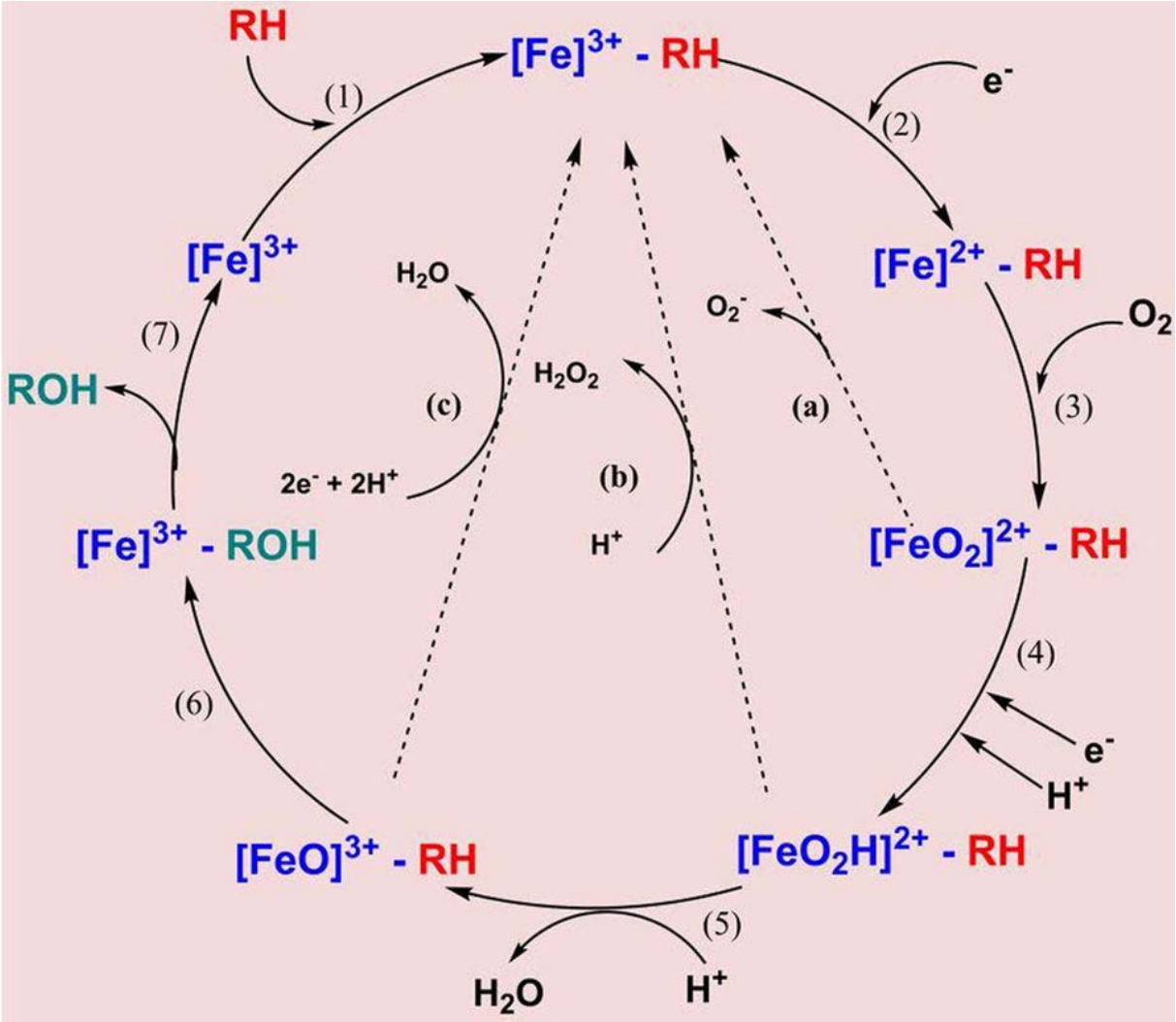
Među enzimima faze I metabolizma, grupa enzima koje nazivamo citokromi P450 na prvom su mjestu prema važnosti u smislu katalitičke raznovrsnosti i velikog broja ksenobiotika koje detoksiciraju ili aktiviraju pretvaranjem u reaktivne metabolite. Iako su prisutni u svim tkivima, najveća koncentracija citokroma P450 koji su uključeni u biotransformaciju ksenobiotika nalazi se u endoplazmatskom retikulumu (mikrosomima) jetre. Jetreni mikrosomalni citokromi P450 imaju vrlo važnu ulogu u određivanju intenziteta i trajanja učinka lijeka, a imaju i ključnu ulogu u detoksikaciji ksenobiotika. Citokromi P450 u jetri i u ostalim tkivima imaju važnu ulogu u aktivaciji ksenobiotika stvaranjem toksičnih i/ili tumorigenih metabolita. Mikrosomalni i mitohondrijski citokromi P450 imaju ključne uloge u biosintezi ili katabolizmu steroidnih hormona, žučnih kiselina, vitamina topljivih u mastima, masnih kiselina i eikozanoida, što samo potvrđuje katalitičku raznovrsnost ove skupine enzima.

Svi citokromi P450 su hemoproteini, tj. sadrže hem kao prostetičku skupinu. Atom željeza u hemu citokroma P450 obično je u oksidiranom stanju (Fe^{3+}). Kad je atom željeza u reduciranom stanju (Fe^{2+}), citkrom P450 može vezati ligande poput kisika (O_2) i ugljikovog monoksida (CO). Kompleks enzima s CO daje apsorpcijski maksimum na 450 nm u diferencijalnom spektru u odnosu na kompleks s vodom, a na temelju ovog svojstva su citokromi P450 dobili i ime. Svi ostali hemoproteini koji vežu CO daju apsorpcijski maksimum na 420 nm. Ovaj neobičan apsorpcijski maksimum citokroma P450 posljedica je neobičnog petog liganda hema (cistein-tiolat). Slijed aminokiselina oko cisteinskog ostatka koji s hemom tvori tiolatnu vezu visoko je konzerviran u svim enzimima P450. Kad je ova tiolatna veza poremećena, citokrom P450 prelazi u katalitički neaktivan oblik kojeg nazivamo citokrom P420. [3].

Temeljna reakcija katalizirana citkromom P450 je monooksigenacija u kojoj je jedan atom kisika inkorporiran u supstrat (označen kao RH), a drugi reduciran do vode pomoću reduktivnih ekvivalenata izvedenih iz NADPH (reduciranog oblika nikotinamidadenindinukleotidfosfata), kako slijedi:

$$RH + O_2 + NADPH + H^+ \rightarrow ROH + H_2O + NADP^+ \text{ [3,10]}$$

Općeprihvaćeni katalitički ciklus citokroma P450 prikazan je na slici 2 [11,12].



Slika 2. Shematski prikaz katalitičkog ciklusa citokroma P450.

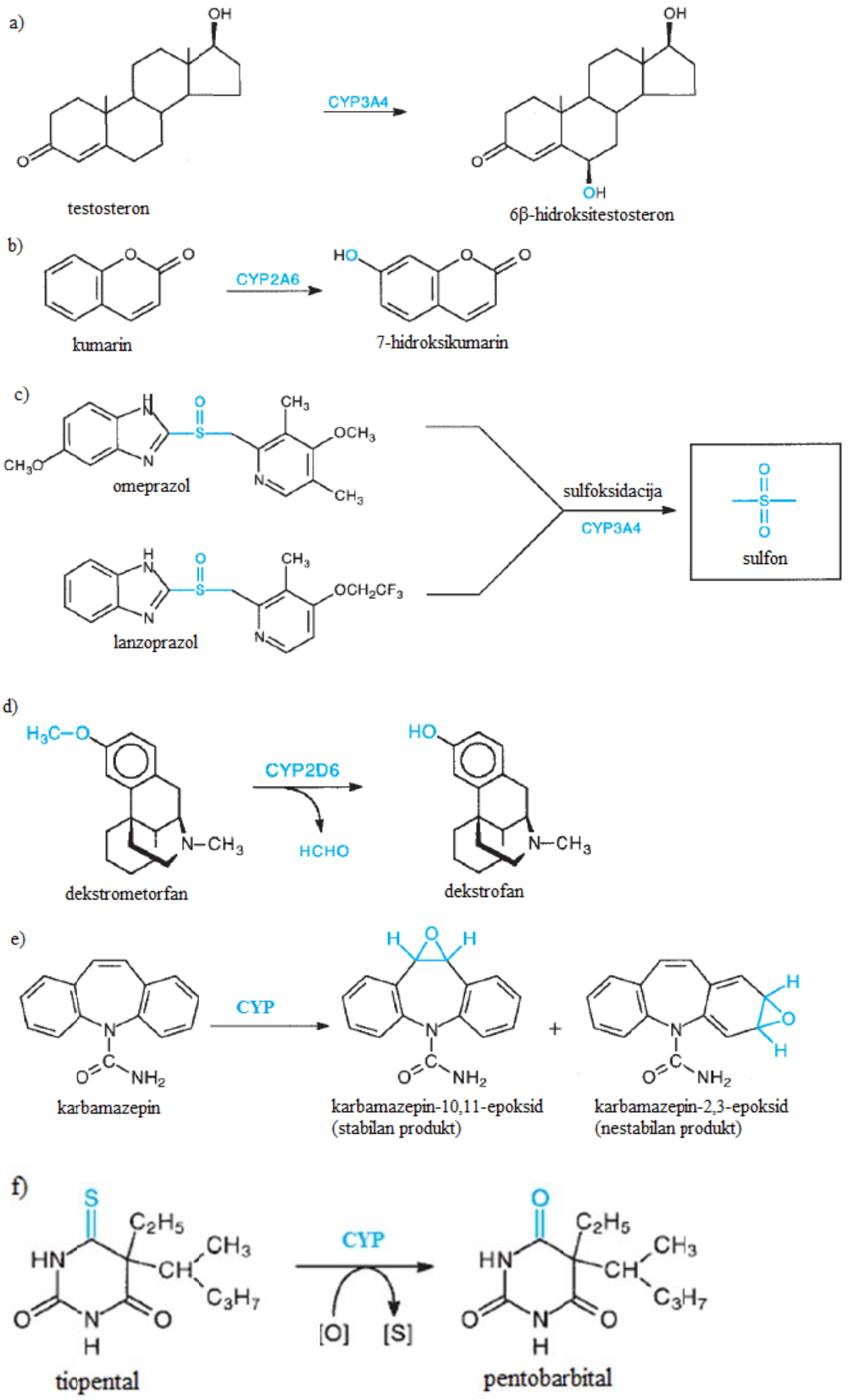
Prvi dio ciklusa uključuje aktivaciju kisika, dok završni dio uključuje oksidaciju supstrata. Ovo za nužnu posljedicu ima izdvajanje (engl. *abstraction*) atoma vodika ili elektrona iz molekule supstrata nakon čega slijedi povrat kisika (engl. *oxygen rebound*), tj. rekombinacija radikala. Nakon vezanja supstrata za enzim citokrom P450, atom željeza u hemu reducira se iz Fe^{3+} u Fe^{2+} stanje dodavanjem jednog elektrona iz NADPH-citokrom P450 reduktaze. Redukcija citkroma P450 olakšana je vezanjem supstrata, a mogući razlog tome je prijelaz atoma željeza iz hema iz stanja niskog spina (engl. *low-spin*) u stanje visokog spina (engl. *high-spin*) uzrokovan vezanjem supstrata u blizini hema. Kisik se veže za citokrom P450 u njegovom reduciranom stanju (Fe^{2+}) i kompleks $[FeO_2]^{2+}$ prelazi u $[FeOOH]^{2+}$ dodatkom protona (H^+) i drugog elektrona koji dolazi od NADPH-citokrom P450 reduktaze ili citokroma b_5. Uvođenje drugog protona oslobađa vodu iz kompleksa $[FeOOH]^{2+}$ te nastaje

kompleks $[FeO]^{3+}$ s kojeg se kisikov atom konačno prenosi na supstrat. Otpuštanje oksidiranog supstrata vraća citokrom P450 u njegovo početno stanje [3]. Ipak treba istaknuti da je ovo pojednostavljen oblik tijeka katalitičkog ciklusa i da je sustav dinamičan te da se koraci unutar ciklusa ne zbivaju nužno linearnim slijedom. Također, većina oksigeniranih intermedijera (ako ne i svi?) imaju potencijal da dizmutiraju stvarajući tako reaktivne kisikove spojeve (engl. *reactive oxygen species*, ROS) [12]. Ako je, primjerice, ovaj katalitički ciklus iz nekog razloga prekinut nakon uvođenja prvog elektrona, kisik se otpušta kao superoksid anion radikal ($O_2\cdot^-$). Ako je ciklus prekinut nakon uvođenja drugog elektrona kisik se otpušta kao vodikov peroksid (H_2O_2). Konačni oblik enzima koji ima oksigenirajući potencijal $[FeO]^{3+}$, može se generirati i direktno prijenosom kisikova atoma iz vodikovog peroksida i nekih drugih hidroperoksida, a proces je poznat pod nazivom peroksidni šant (engl. *peroxide shunt*). Iz ovog razloga određene reakcije katalizirane citokromima P450 mogu biti podržane hidroperoksidima u nedostatku NADPH-citokrom P450 reduktaze i NADPH [3].

Ovim općenitim katalitičkim mehanizmom, koji uključuje izdvajanje elektrona ili vodikovih atoma nakon čega slijedi povrat kisika, moguće je objasniti raznovrsne oksidativne reakcije katalizirane citokromima P450 (slika 3) koje se mogu klasificirati kao:

1. Hidroksilacija ugljika
2. Oksigenacija heteroatoma
3. Otpuštanje s heteroatoma (dealkilacija)
4. Epoksidacija
5. Migracija oksidativne skupine

Ovi osnovni mehanizmi također mogu objasniti i suicidnu inaktivaciju enzima (engl. *mechanism-based/suicide inactivation*) zabilježenu sa supstratima poput olefina, ciklopropilamina i aminobenzotriazola. Citokromi P450 također mogu reducirati neke spojeve poput azo-boja, ugljikovog tetraklorida (CCl_4) i *N*-oksida [13].



Slika 3. Primjeri reakcija kataliziranih citkromima P450: a) hidroksilacija alifatskog ugljika, b) hidroksilacija aromatskog ugljika, c) oksigenacija heteroatoma, d) dealkilacija heteroatoma, e) epoksidacija, f) migracija oksidativne skupine.

Ukupan broj supstrata citokroma P450 doseže nekoliko tisuća. Takav širok spektar supstrata je dijelom posljedica postojanja višestrukih oblika/formi, ali čak i za jedan pročišćeni oblik/formu (npr. humani CYP3A4) pokazano je da oksidira više od tisuću različitih supstrata. Aktivno mjesto mora biti dovoljno veliko da prihvati sve te različite spojeve. Ipak, značajan broj većih molekula poput varfarina, testosterona i debrizokina i nekih drugih lijekova, oksidirani su stereo- i regioselektivno, što ukazuje na to da aktivno mjesto ipak ima neka posebna svojstva. Manji supstrati se očigledno uklapaju u ta aktivna mjesta na enzimu, a mjesta oksidacije na njima vjerojatno su više određena kemijskim nego prostornim (fizičkim) svojstvima, iako treba reći da ova hipoteza treba dodatne provjere. Jedan način gledanja na postojanje enzimskog sustava citokroma P450 je njihova uloga u metabolizmu specifičnih endogenih supstrata poput masnih kiselina, steroidnih hormona i eikozanoida. Drugi pak vjeruju kako je glavna svrha ovih enzima čišćenje organizma od unesenih stranih tvari poput terpena, alkaloida, produkata pirolize i drugih ksenobiotika. Postoji opravdanost za oba gledišta budući da postoje dobri slučajevi za pojedinačne enzime koji opisuju obje funkcije (tablica 2) [13].

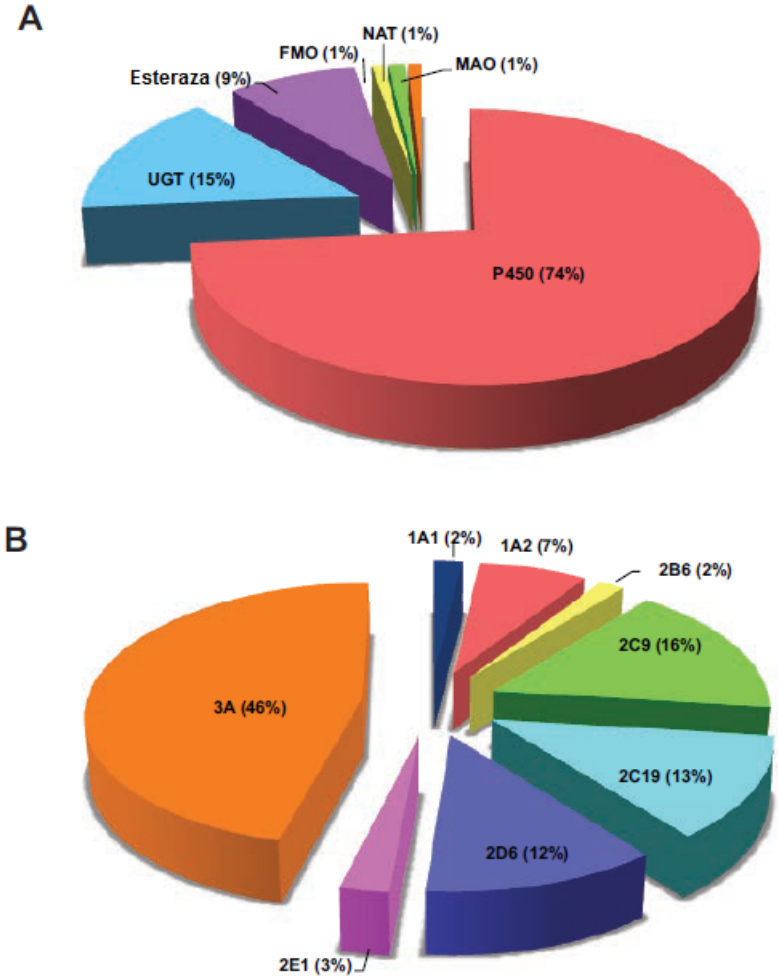
Danas više ne postoje sumnje u vezi postojanja različitih oblika/formi citokroma P450 bilo kod eksperimentalnih životinja bilo kod čovjeka. Do danas je karakterizirano 83 produkata gena kod štakora i 57 kod ljudi (tablica 2). Svi geni za humane citokrome P450 poznati su iz projekta humanog genoma. U nekim je slučajevima nađeno značajno očuvanje strukture citokroma P450 između različitih vrsta. Ipak, male strukturne razlike među ovim proteinima mogu uzrokovati velike razlike u katalitičkoj aktivnosti i specifičnosti prema supstratima. Tako su primjerice Lindberg i Negishi [14] pokazali da promjena tek jedne aminokiseline (209) mišjeg CYP2A5 može dramatično primijeniti njegovu katalitičku aktivnost. Neki su humani citokromi P450 pročišćeni, a mnogo više ih je karakterizirano rekombinantnim metodama [13]. Do danas su određene trodimenzionalne strukture barem 20 humanih citokroma P450 [15].

Tablica 2. Klasifikacija humanih citokroma P450 temeljena na glavnoj klasi supstrata [15]

Steroli	**Ksenobiotici**	**Masne kiseline**	**Eikozanoidi**	**Vitamini**	**Nepoznato**
1B1	1A1	2J2	4F2	2R1	2A7
7A1	1A2	2U1	4F3	24A1	2S1
7B1	2A6	4A11	4F8	26A1	2W1
8B1	2A13	4B1	5A1	26B1	4A22
11A1	2B6	4F11	8A1	26C1	4F22
11B1	2C8	4F12		27B1	4X1
11B2	2C9	4V2		27C1	4Z1
17A1	2C18				20A1
19A1	2C19				
21A2	2D6				
27A1	2E1				
39A1	2F1				
46A1	3A4				
51A1	3A5				
	3A7				
	3A43				

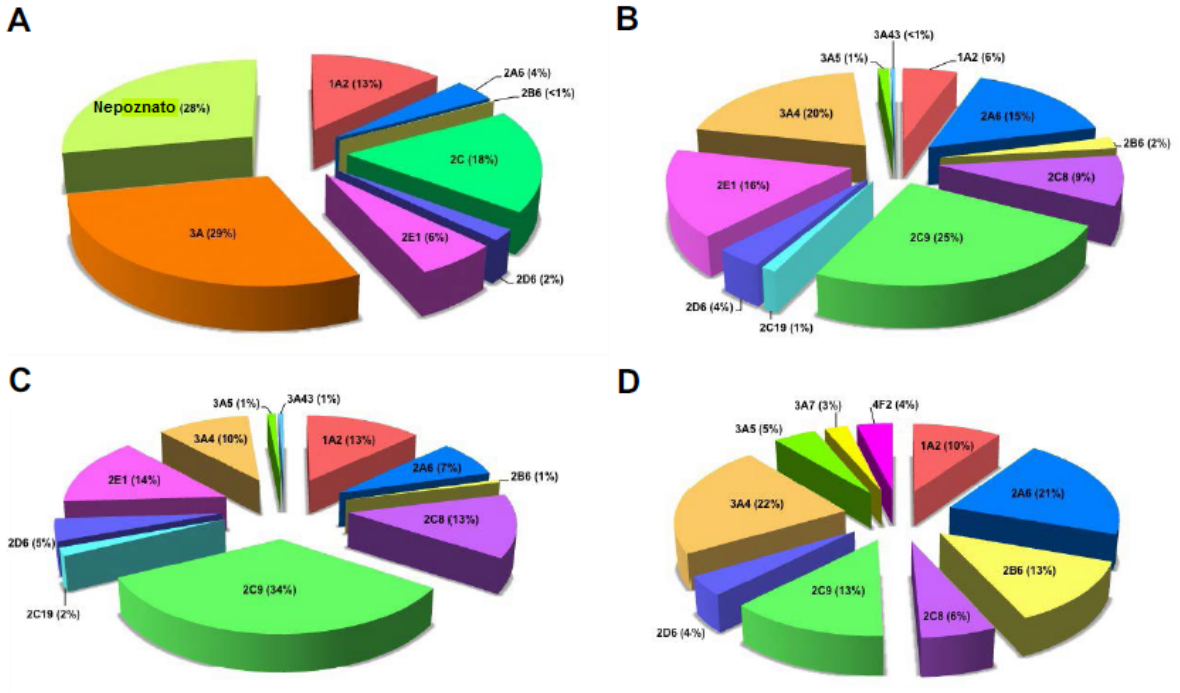
1.2.1 Uloga citokroma P450 u metabolizmu lijekova

Citokromi P450 su glavni enzimi uključeni u metabolizam lijekova. Na slici 4 prikazani su doprinosi različitih enzima metabolizmu lijekova (slika 4a) kao i doprinosi pojedinačnih citokroma P450 u ukupnom metabolizmu posredovanim ovim enzimskim sustavom kod ljudi [15].

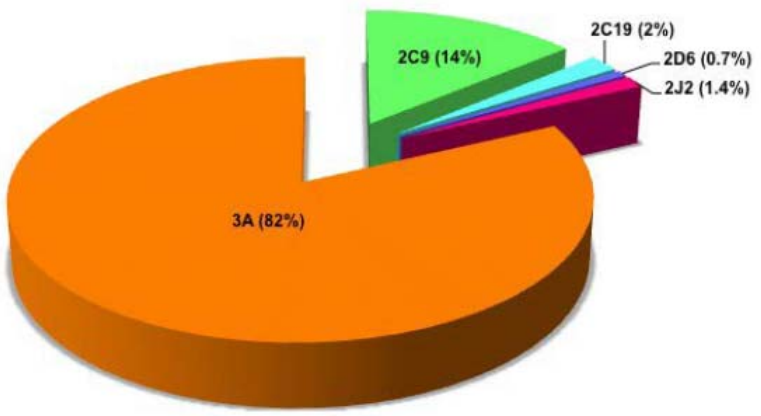


Slika 4. Enzimi uključeni u metabolizam lijekova. A) Doprinos različitih enzima metabolizmu lijekova. B) Doprinos pojedinačnih citokroma P450 metabolizmu posredovanim ovim enzimskim sustavom. UGT = glukuronoziltransferaza; FMO = flavinmonooksigenaza; NAT = *N*-acetiltransferaza; MAO = monoaminoksidaza [15].

Citokromi P450 sudjeluju u metabolizmu gotovo ¾ svih poznatih lijekova (malih molekula). Veliki doprinos pojedinačnih citokroma P450 3A(4) i 2C9 velikim su dijelom posljedica visokog udjela ekspresije ovih enzima u jetri i u tankom crijevu (slike 5 i 6) te njihovim širokim spektrom specifičnosti prema različitim supstratima [15].



Slika 5. Relativne koncentracije pojedinačnih citokroma P450 u humanim jetrenim mikrosomima. A) Citokromi P450 u 60 uzoraka jetre procijenjeni imunokemijskim metodama (elektroforeza/imuno-blot analiza). Pojedinačni citokromi P450 nisu razlučeni zbog ukrižene reaktivnosti. Frakcija „nepoznato“ je razlika sume formi određenih imunokemijskim metodama i ukupne količine određene spektroskopski mjerenjem razlike apsorbancije Fe^{2+}·CO/Fe^{2+} B-D) Procjene napravljene na temelju LC-MS proteomske analize peptida s teškim metalom. B) Rezultati analize pula plazme 50 različitih uzoraka jetre. C) Prosječne vrijednosti analize 10 pojedinačnih humanih uzoraka jetre. D) Analiza pula plazme 23 različitih uzoraka jetre iz drugog laboratorija [15].



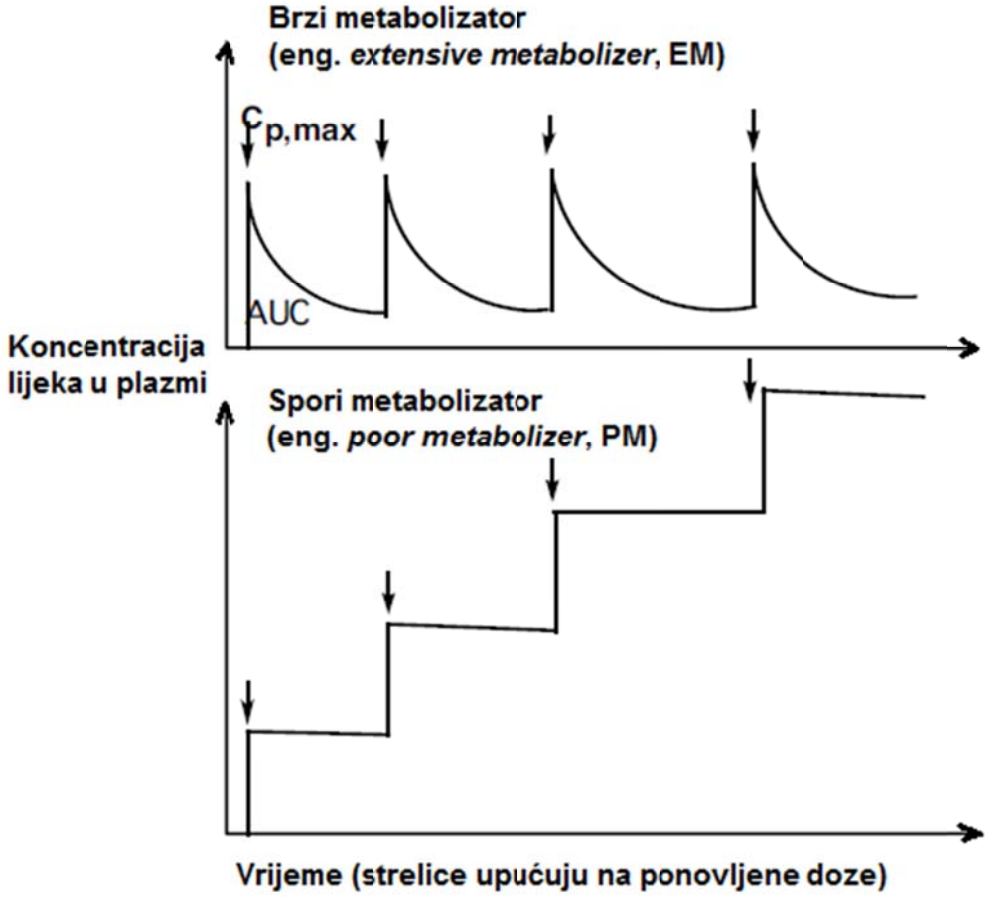
Slika 6. Relativne koncentracije pojedinačnih citokroma P450 u tankom crijevu čovjeka (određene imunokemijski) [15].

Prikazani grafikoni nužno ne odražavaju sliku za novije lijekove i lijekove koji su trenutno u razvoju. Kako bi se postigla ciljana specifičnost i afinitet, tendencija u razvoju današnjih lijekova ide u smjeru većih molekula kao potencijalnih kandidata, a opći aksiom koji vrijedi za takve lijekove je njihova lakša obrada citokromima P450 3A4 i 2C9. U posljednje vrijeme farmaceutske tvrtke pokušavaju izbjeći razvoj kandidata lijekova koji su supstrati (ili inhibitori) visoko-polimorfnih citokroma koji imaju velik broj alelnih varijanti CYP2D6 i CYP2C19. Uzevši sve ovo u obzir, raspodjela citokroma P450 prikazana grafikonom na slici 5b, vjerojatno je dobra procjena udjela pojedinačnih citokroma P450 u metabolizmu lijekova te se neće značajno mijenjati u bliskoj budućnosti. Ipak, ovdje treba naglasiti da metabolizam mnogih lijekova nije funkcija djelovanja samo citokroma P450, nego i drugih enzima, kao i proteinskih nosača koji također utječu na koncentraciju lijekova u stanicama [15].

Gledajući ukupnu količinu (u mg proteina) citokroma P450 u uzorcima jetre različitih zdravih pojedinaca većina ljudi upada u raspon od 3 puta ili, drugačije rečeno, ne razlikuje se kod većine za više od 3 puta. Međutim, promatrajući pojedinačni citokrom P450 koji sudjeluje u metabolizmu lijekova (npr. porodice 1, 2, 3), varijacija je bitno drugačija i značajnija. Razlike od 5 do 10 puta su uobičajene, dok razlike od 40 puta nisu neobične, primjerice za CYP1A2. Za neke enzime varijabilnost istih farmakokinetičkih parametara može biti i 10 000 puta. Istraživanja su pokazala da spol nema velikog utjecaja na razine ekspresije glavnih citokroma P450 koji sudjeluju u metabolizmu ksenobiotika, a zabilježene farmakokinetičke razlike među spolovima vjerojatno su uzrokovane drugim utjecajima na bioraspoloživost. Međurasne razlike postoje zbog alelnih varijacija koje mogu utjecati bilo na razinu ekspresije bilo na prirođenu katalitičku aktivnost određenih enzima (npr. CYP2D6). Ipak, općenito vrijedi da su razlike u aktivnosti različitih citokroma P450 među rasama puno manje u odnosu na razlike unutar rase. Konačno, razine citokroma P450 uključenih u metabolizam steroidnih hormona (npr. prva kolona iz tablice 2) variraju značajno manje u odnosu na razine citokroma P450 uključenih u metabolizam ksenobiotika (porodice 1, 2, 3), vjerojatno zbog dobro definirane njihove uloge u regulaciji fizioloških procesa [15].

1.2.2 Interakcije, inhibicije, indukcije posredovane citokromima P450

Klinički utjecaj razlika u aktivnostima citokroma P450 može se objasniti pomoću sheme prikazane na slici 7.



Slika 7. Značaj sporog metabolizma lijeka pomoću citokroma P450 (ili drugih enzima). Na gornjem dijelu slike (EM) prikazan je „tipični“ obrazac doziranja kod kojeg je razina lijeka u plazmi održavana u određenom rasponu. Neuobičajeno spori metabolizam (donji dio slike, PM) rezultira povišenim nivoom lijeka u plazmi. $C_{p,max}$ = najviša koncentracija lijeka u plazmi. AUC = površina ispod krivulje (engl. *area under curve*).

Doze lijekova općenito su određene pomoću brzih metabolizatora budući da oni čine većinu populacije. Brzi metabolizatori stoga predstavljaju normalan fenotip. Nakon unosa prve doze koncentracija lijeka u plazmi raste do nekog vrhunca ($C_{p,max}$) i potom se smanjuje do davanja druge doze. Unosom novih doza koncentracija lijeka u krvi ostaje unutar istog područja i lijek daje željeni učinak. Sporom metabolizatoru (donji dio slike 7) bi se bez prethodnog znanja o tom problemu za isti lijek davale jednake doze u istom režimu doziranja. Lijek bi se vrlo malo metabolizirao između dvije doze i koncentracija lijeka u plazmi (a vjerojatno i u ciljanom organu) narasla bi neočekivano visoko uz prateći porast površine ispod krivulje (engl. *area under curve*, AUC). Najjednostavnija posljedica bila bi pretjerani (vjerojatno i neželjeni) učinak lijeka. U nekim slučajevima metabolizam može biti i brži od očekivanog za „tipičnog“

pacijenta, npr. zbog amplifikacije gena ili enzimske indukcije. U tom bi slučaju $C_{p,max}$ i AUC bili manji u odnosu na brzog metabolizatora (gornji dio slike 7) te bi učinak lijeka očekivano bio slabiji [15].

Interakcije lijekova ozbiljan su problem i danas se smatra da su glavni uzrok neželjenih reakcija lijekova (nuspojava) [12,15]. Farmakokinetičke interakcije imaju nekoliko molekularnih osnova. Smanjena bioraspoloživost lijeka može biti posljedica indukcije enzima tim istim ili nekim drugim lijekom. Klasični primjer ove interakcije je smanjena bioraspoloživost oralnog kontraceptiva 17α-etinilestradiola nakon terapije rifampicinom, barbituratima ili preparatima koji sadrže gospinu travu, što dovodi do indukcije CYP3A4 i povećane eliminacije 17α-etinilestradiola iz organizma. Drugi aspekt interakcija lijekova uključuje inhibiciju enzima. Inhibicija može biti kompetitivna, tj. dva supstrata se mogu natjecati za ograničen broj citokroma P450 ili može biti *bona fide* inhibitor (nema enzimske transformacije) koji se sa susptratima natječe za enzim. Primjer ove interakcije je antihistaminik terfenadin, čiji je metabolizima inhibiran eritromicinom i ketokonazolom, inhibitorima CYP3A4. Još jedan tip inhibicije citokroma P450 jest tzv. suicidna inaktivacija enzima (engl. *mechanism-based/suicide inactivation*) kod koje oksidacija supstrata dovodi do uništavanja citokroma P450. Primjer takve inhibicije je inaktivacija CYP3A4 bergamotinom i drugim flavonima iz grejpa. U svim ovim navedenim primjerima učinci interakcije razmatrani su samo u okvirima promijenjene bioraspoloživosti. Neki problemi kod interakcija lijekova mogu biti kompleksni, čak i ako je razmatranje ograničeno samo na farmakokinetičke aspekte. Tako, u gore navedenom primjeru, terfenadin se može smatrati pro-lijekom. Kod većine ljudi oksidacija citokromima P450 (nakon koje slijedi i daljnja oksidacija) daje kao metabolički produkt feksofenadin, cirkulirajući i djelatan oblik lijeka. Slaba aktivnost CYP3A4 (zbog inhibicije ili drugih razloga) uzrokuje nakupljanje ishodišnog lijeka (pro-lijeka) terfenadina do toksičnih razina koje mogu izazvati aritmije. Također postoji i mogućnost da blokiranje glavnog metaboličkog puta lijeka pogoduje sporednim putovima koji mogu dati toksične produkte, npr. blokiranjem *O*-deetilacije fenacetina (CYP1A2) može doći do deacetilacije i *N*-oksigenacije što na kraju može uzrokovati methemoglobinemiju. Indukcija citokroma P450 ne rezultira samo smanjenom oralnom bioraspoloživošću već može izazvati i pretjeranu bioaktivaciju kemikalija. To izaziva veliki oprez u slučaju potencijalnih kancerogena i jedan je od razloga zbog kojeg su regulatorne agencije zabrinute u vezi induktora CYP1A [15].

Imajući na umu ove važne značajke metabolizma posredovanog humanim citokromima P450, jasno je da je poznavanje metaboličke sudbine od sve većeg značaja za uspješnu primjenu lijekova. Tijekom razvoja novih lijekova danas, pored detaljnih ispitivanja za svaki pojedinačni slučaj, postoji nekoliko vodećih principa u pristupu prema metabolizmu posredovanim citokromima P450: 1) *in vitro* probiranje u svrhu eliminacije spojeva za koje se može pretpostaviti da će imati nisku bioraspoloživost, tj. brza *in vitro* oksidacija, 2) korištenje *in vitro* probirnih ispitivanja u svrhu izbjegavanja očiglednih problema s toksičnošću, indukcijom ili inhibicijom, 3) potraga za spojevima kandidatima za lijekove čiji je metabolizam rezultat djelovanja nekoliko različitih enzima, a ne ovisan samo o jednom, a posebno ne o visoko varijabilnom citokromu P450 (ili nekom drugom enzimu) i 4) primjena *in vivo* studija na ljudima što je prije moguće kako bi se uspostavila poveznica s predikcijama temeljenima na *in vitro* ispitivanjima [15].

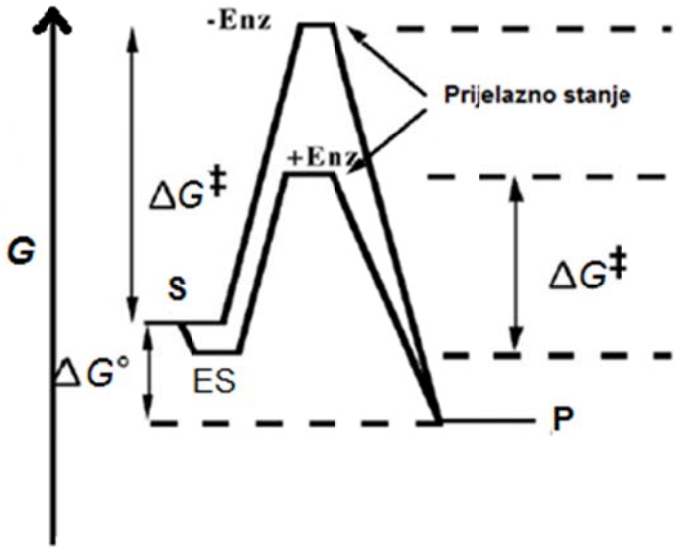
1.2.3 Predviđanje metabolizma

Budući da su citokromi P450 uključeni u gotovo 75% metabolizma svih lijekova (slika 4), mogućnost predviđanja mjesta i brzine oksidacije novih supstrata može uvelike olakšati i ubrzati razvoj novih lijekova, kao i sagledavanje potencijalnih kancerogena i toksičnih tvari. Brojni su doprinosi učinjeni u pogledu postizanja tog cilja. Mogući pristupi u predviđanju metabolizma lijekova mogu uključivati ili usporedbe postojećih baza podataka o biotranformacijama, sidrenje (engl. *docking*) i elektroničke informacije o citokromima P450 ili kombinaciju navedenoga. Jedno od neriješenih pitanja tiče se kristalnih struktura koje su danas dostupne za mnoge citokrome P450. Njihov glavni nedostatak je u nemogućnosti dobivanja svih željenih podataka iz njih. Naime, primijećeno je da citokromi P450 prolaze značajne konformacijske promjene nakon vezanja supstrata, stoga kristalne strukture enzima bez vezanog liganda (supstrata) imaju ograničenja u pitanju rasvjetljavanja funkcija enzima. I dodatno, budući da neki citokromi P450 imaju velika aktivna mjesta, pozicije liganada u kristalnim strukturama još uvijek ostavljaju mnoga otvorena pitanja u vezi interakcija s enzimom. U nedostatku informacija dobivenih na temelju proučavanja kristalnih struktura, energija veze različitih supstrata nije dovoljna za pouzdano predviđanje metabolizma. Bolja predviđanja metabolizma mogu se napraviti unutar grupe strukturno blisko povezanih spojeva, dok su procjene u nepovezanim serijama spojeva još uvijek puno teže i predstavljaju veliki izazov farmaceutskoj industriji. Iako su mnogi računalni alati dostupni, oni općenito nisu još postigli veliki uspjeh u primjeni za metabolizam i sigurnost lijeka, te su

eksperimentalni pristupi još uvijek još uvijek dominantni u ovom području, a nije izgledno ni da će se to promijeniti u bliskoj budućnosti [12].

1.3 Enzimska kinetika

Osnovno načelo enzimske katalize sastoji se u tome da je jedna od glavnih pokretačkih sila enzimskih reakcija smanjenje energije prijelaznog stanja (slika 8). Reakcije imaju jednaku promjenu slobodne energije (ΔG) između reaktanata i produkata neovisno o tome je li katalizator prisutan ili nije. Prema tome, ravnoteža reakcije ostaje nepromijenjena i u prisutnosti enzimskog katalizatora [16].



Slika 8. Klasični dijagram slobodne energije za reakcije pretvaranja S (supstrata) u P (produkt) koji pokazuju prijelazna stanja u odsutnosti (-Enz) i u prisutnosti (+Enz) enzimskog katalizatora (supstrat je u suvišku u odnosu na enzim).

Katalizator određuje kako se brzo reaktanti kreću unutar reakcijskog puta prema produktima i natrag. Naravno, neke su reakcije ireverzibilne.

Postoje dvije vrste ograničenja brzina enzimskih reakcija – fizička i kemijska. Neki su enzimi toliko učinkoviti da su njihove brzine ograničene samo brzinama difuzije reaktanata i produkata. Poznati su neki takvi enzimi (npr. triozafosfatizomeraza) i imaju konstante brzina drugog reda veličine približno 10^9 M^{-1} s^{-1} (k_{cat}/K_m). Većina je enzima ograničena brzinama

kemijskih reakcija koje se zbivaju tijekom transformacija. Zbog toga su, dakako, puno sporiji. Vrlo je teško točno odrediti kojom se brzinom neka reakcija mora zbivati da bi bila značajna. Primjerice, neke reakcije lijekova s citokromima P450 zbivaju se brzinama od tek jednog ciklusa u minuti, ali ipak zbog velike količine citokroma P450 u jetri, ti se lijekovi učinkovito eliminiraju nakon prvog prolaza kroz jetru. Jedno od pravila teorije prijelaznog stanja jest u tome da enzim djeluje zbog komplementarnosti s prijelaznim stanjem. Ovaj je koncept općenito dobro prihvaćen, ali nije posve očigledan. Osnovna predavanja iz biokemije ponekad imaju tendenciju da predstave enzimologiju u okviru modela „ključa i brave“, što može navesti na pogrešno mišljenje. Pored toga, parametri poput K_m ili konstante vezanja supstrata (K_d) često se predstavljaju kao pokazatelj učinkovitosti enzima. Međutim, treba imati na umu da je pokazano da jače vezanje supstrata na enzim u stvari ima učinak podizanja energetske barijere prijelaznog stanja i usporavanja brzine katalize. Komplementarnost katalizatora s prijelaznim stanjem znači da se na enzim najjače veže intermedijer (forma supstrata u prijelaznom stanju), a ne sam supstrat. Raspravu o mehanizmu enzimske katalize ipak treba ostaviti na neki način „otvorenom“ i istaknuti kako je razmatranje dijagrama prijelaznog stanja jedan od načina gledanja na problematiku, poglavito kada se u obzir uzme činjenica da se tijekom katalize događa značajno gibanje proteina i da se stvaraju i kidaju raznovrsni tipovi veza [16].

U svrhu razmatranja enzimske kinetike može se uspostaviti jednostavan model enzimskog sustava poput ovog:

$$\mathrm{E} + \mathrm{S} \underset{k-1}{\overset{k_1}{\rightleftarrows}} \mathrm{ES} \underset{k-2}{\overset{k_2}{\rightleftarrows}} \mathrm{EP} \underset{k-3}{\overset{k_3}{\rightleftarrows}} \mathrm{E} + \mathrm{P}$$

Čak i u ovom jednostavnom sustavu, relativne brzine pojedinačnih koraka reakcije nisu odmah očite, nego je korake koji aproksimiraju k_{cat} (V_{max} podijeljena s koncentracijom enzima) potrebno odrediti eksperimentalno. I dok je prava konstanta vezanja supstrata K_d definirana omjerom k_{-1}/k_1, ona obično nije jednaka K_m. K_m je operativni izraz koji obično uključuje kompleksnu mješavinu pojedinačnih konstanta brzine, a koje od njih su dominantne, mora se saznati kroz eksperiment. Uobičajeni problem u literaturi, osobito u području farmakologije i primijenjenim disciplinama, je taj da se niski K_m često koristi kako bi se neki enzim okarakterizirao kao enzim „visokog afiniteta“ i obrnuto, visoki K_m za enzim „niskog afiniteta“. Očigledno je iz prethodne rasprave da je ovakva praksa zbunjujuća. Nadalje, nije osobito korisno uspoređivati K_m vrijednosti u prilično različitim sustavima kao mjeru sličnosti

mehanizama, budući da priroda koraka koji određuje brzinu reakcije može biti osjetljiva na promjene. Kao primjer zablude u vezi s K_m, dovoljno je razmotriti kinetičke učinke izotopa deuterija u mnogim reakcijama s CYP2E1, u kojima supstitucija deuterijem utječe na K_m, ali ne i na k_{cat}. Jednako tako, kako je istaknuto i ranije, niži K_d može biti povezan s nižim k_{cat} zbog problema s povećanjem energetske barijere prijelaznog stanja. [16].

Omjer k_{cat}/K_m (ili V_{max}/K_m podijeljen koncentracijom enzima) smatra se mjerom učinkovitosti enzima (ponekad se naziva i „konstanta specifičnosti“, engl. *specificity constant*) i ima iste jedinice kao konstanta brzine drugog reda. Mjeren *in vitro*, ovaj omjer može se dovesti u vezu s farmakokinetičkim parametrom „intrinzični klirens“ (engl. *intrinsic clearance*) u stanici ili tkivu i stoga je vrlo značajan. Omjer k_{cat}/K_m također je parametar izbora u razmatranju katalitičke selektivnosti enzima. On bi se trebao navoditi kao „učinkovitost enzima“ ili „konstanta specifičnosti“ enzima, ali ne i kao „*in vitro* klirens“, jer to može dovesti do zabune pri usporedbama. Naime, izraz „klirens“ (engl. *clearance*) ima specifično značenje u *in vivo* farmakokinetici [16].

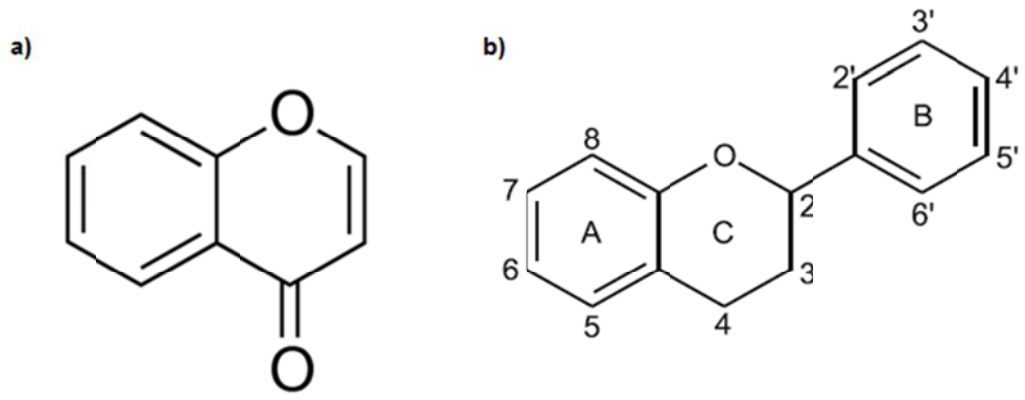
Mnogi enzimi za svoj rad koriste koenzime i prostetičke skupine. Koenzimi su kosupstrati i pojavljuju se u stohiometriji ukupne jednadžbe reakcije. Primjeri koenzima su NAD(P)H, glutation (GSH) i drugi. Prostetičke skupine ne pojavljuju se u stohiometriji ukupne jednadžbe reakcije, nego samo u određenim izoliranim koracima. Hem i flavin su primjeri prostetičkih skupina koje sudjeluju u oksidoredukcijskim procesima. Oni izmjenjuju svoja oksidoredukcijska stanja, ali se vraćaju u isto početno stanje na kraju svakog reakcijskog ciklusa. U skladu s njihovom funkcijom, prostetičke su skupine obično čvrsto vezane na enzim [16].

1.4 Flavonoidi

Profesor Szent-Györgyi je 1936. godine izolirao tvar koja je bila jaki reducirajući agens i koja je djelovala kao koenzim u reakciji između enzima peroksidaze i askorbatne kiseline (vitamin C). Ova je tvar tada imenovana kao vitamin P, a naknadno kategorizirana kao flavonoid rutin. Pionirski rad profesora Szent-Györgyija u ovom području doveo je do identifikacije rutina te njegove izolacije iz limuna i crnog papra [17]. Od tada do danas identificirano je preko 10000 različitih spojeva koje svrstavamo u skupinu flavonoida [18]. Flavonoidi su polifenolni spojevi niske molekulske mase koje karakterizira benzo-γ-pironska (kromonska[1]) struktura

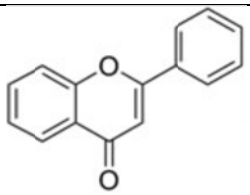
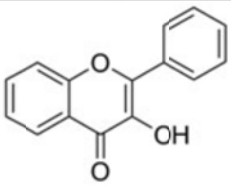
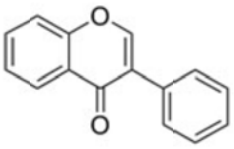
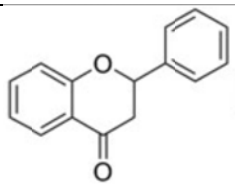
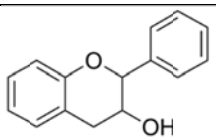
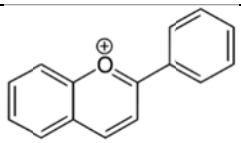
[1] Kromon je sinonim za benzo-γ-piron

(slika 9), a na temelju strukture prstena C i prisutnosti suspstituenata u strukturi podijeljeni su u šest glavnih podskupina (flavoni, flavonoli, izoflavoni, flavanoni, flavanoli i antocijanidini, tablica 3), dok se ostale (uglavnom izo- varijante kod kojih se fenolni prsten B nalazi na poziciji 3 u molekuli flavonoida) u prirodi pojavljuju rjeđe [18-23].



Slika 9. a) Struktura benzo-γ-pirona. b) Osnovna struktura flavonoida.

Tablica 3. Klasifikacija, kemijska struktura flavonoida i glavni izvori u hrani.

Klasa	**Osnovna kemijska struktura**	**Primjer flavonoida**	**Obrazac supstituenata**	**Izvori u hrani**
Flavoni		Akacetin Apigenin Bajkalein Krizin Diosmetin Luteolin Tangeretin	5,7-OH-4'-OCH_3 5,7,4'-OH 5,6,7-OH 5,7-OH 5,7,3'-OH-4'-OCH_3 5,7,3',4'-OH 5,6,7,8,4'-OCH_3	Kore od voća, peršin, celer, crvena paprika, kožica od rajčice, med, propolis...
Flavonoli		Galangin Kemferol Morin Miricetin Kvercetin	3,5,7-OH 3,5,7,4'-OH 3,5,7,2',4'-OH 3,5,7,2',3',4'-OH 3,5,7,3',4'-OH	Poriluk, kelj, brokula, salata, grejp, crni čaj, crveni luk, crno vino, jabuka, bobičasto voće,…
Izoflavoni		Genistein Diadzein Formononetin	5,7,4'-OH 7,4'-OH 7-OH-4'-OCH_3	Grašak, soja i druge leguminoze
Flavanoni		Eriodiktiol Hesperetin Homoeriodiktiol Naringenin	5,7,3',4'-OH 5,7,3'-OH-4'-OCH_3 5,7,4'-OH-3'-OCH_3 5,7,4'-OH	Citrusi (grejp, limun, naranča, …)
Flavanoli		Katehin Epikatehin Proantocijanidini	3,5,7,3',4'-OH 3,5,7,3',4'-OH n/p	Čaj (crni i zeleni), kakao, čokolada, borovnica, crno vino, glog
Antocijanidini		Cijanidini Apigenidin Obojeni pigmenti	3,5,7,3',4'-OH 5,7,4'-OH n/p	Obojeno voće, trešnja, malina, jagoda

Većina blagotvornih učinaka flavonoida na zdravlje ljudi pripisuje se njihovim antioksidativnim i kelirajućim svojstvima. Flavonoidi pokazuju jedinstvene kardioprotektivne učinke zbog sposobnosti inhibicije oksidacije posredovane lipoproteinima niske gustoće (engl. *low density lipoproteins*, LDL). Zaštitna uloga prehrane bogate flavonoidima pokazana je u nekolicini velikih prognostičkih studija. Tako je primjerice pokazano da unos veće

količine flavonoida u organizam previđa manju smrtnost uslijed koronarne bolesti srca te manju incidenciju infarkta miokarda u starijih muškaraca. Kod žena u postmenopauzi rizik od koronarne bolesti srca smanjen je za 38% [22]. Bojić i suradnici su pokazali da flavonoidi mogu utjecati na agregaciju trombocita pri koncentracijama koje se mogu postići u krvi nakon konzumacije hrane bogate polifenolima [24]. Flavonoidi također mogu utjecati i na rezultate dijagnostičkih funkcionalnih ispitivanja (agregacija trombocita inducirana ristocetinom i arahidonskom kiselinom) [25] te pokazuju protutumorski [26], antioksidativni [27,28] i vazodilatatorni učinak [29]. Brojni su i drugi farmakološki učinci flavonoida opisani u literaturi poput pozitivnih učinaka na kapilarnu propusnost te hipolipemične, antihipertenzivne, antimikrobne, antivirusne, antialergijske, antiulkusne, antineoplastične, protuupalne i hepatoprotektivne aktivnosti [17,20].

Međutim, unatoč relativno velikoj količini dostupnih informacija o potencijalnim blagotvornim učincima flavonoida na zdravlje pokazanima u eksperimentalnim uvjetima *in vitro*, vrlo malo se zna o njihovim fiziološkim mehanizmima djelovanja, tj. postoji velika razlika između bioloških učinaka opaženih *in vitro* i *in vivo* [30]. Da bi se ova pojava bolje razumjela, potrebno je razmotriti neke od najvažnijih spoznaja na području bioraspoloživosti flavonoida. Važno je razumjeti da flavonoidi koji su najčešći i najzastupljeniji u hrani, nisu nužno najaktivniji u organizmu. To može biti zbog niske intrinzične aktivnosti ili zbog slabe apsorpcije nakon unosa ili zbog ekstenzivnog metabolizma ili pak brze eliminacije. Dodatno, metaboliti koji su nađeni u krvi i ciljanim organima nastali kao produkti probave ili jetrene aktivnosti mogu imati različit biološki učinak u odnosu na ishodišne flavonoide [19]. Stoga je za razumijevanje bioloških učinaka flavonoida *in vivo*, tj. učinaka na zdravlje ljudi, od iznimne važnosti opsežno poznavanje njihove bioraspoloživosti i metabolizma [19,30].

Sudbina flavonoida u organizmu u pravilu slijedi zajednički put [31,32]. Aglikoni mogu biti apsorbirani iz tankog crijeva. Međutim, većina se flavonoida u hrani nalazi u obliku estera, glikozida ili polimera i ne mogu biti apsorbirani u svojim nativnim oblicima. Da bi mogli biti apsorbirani, ovi se flavonoidi moraju hidrolizirati probavnim enzimima ili crijevnom mikroflorom. Ako je u proces hidrolize uključena crijevna mikroflora, učinkovitost apsorpcije često je smanjena zbog istodobne razgradnje nastalih aglikona u različite jednostavne aromatske kiseline. Flavonoidi se tijekom apsorpcije konjugiraju u stanicama tankog crijeva, a kasnije i dodatno u jetri. Proces konjugacije flavonoida najčešće uključuje metilaciju, sulfataciju i glukuronidaciju. Ovo je uobičajeni metabolički proces detoksifikacije ksenobiotika koji za cilj ima suzbiti njihovo potencijalno toksično djelovanje te istovremeno

povećanjem hidrofilnosti olakšati njihovu eliminaciju putem žuči i/ili urina. Procesi konjugacije flavonoida toliko su učinkoviti da su aglikoni općenito nakon unosa prehrambene doze prisutni u krvi u vrlo niskim koncentracijama. U krvi su većinom prisutni njihovi konjugirani derivati (metaboliti) i to u visokim postotcima vezani na albumin. Flavonoidi mogu prodrijeti i u tkiva, osobito u ona u kojima su najviše metabolizirani, a mogućnosti njihovog nakupljanja u nekom određenom ciljanom tkivu tek trebaju biti istražene. Flavonoidi i njihovi metaboliti u najvećoj su mjeri eliminirani putem urina i žuči. Putem žučnih vodova flavonoidi se izlučuju u dvanaesnik gdje su opet pod utjecajem probavnih enzima i crijevne mikroflore, osobito u udaljenim dijelovima tankog crijeva gdje se razgrađuju pod utjecajem bakterijskih β-glukuronidaza do ishodišnih aglikona koji se opet mogu apsorbirati. Ovo eneterohepatičko cirkuliranje za posljedicu ima dulje zadržavanje flavonoida u organizmu [19].

Manach et al. su u opsežnom pregledu studija bioraspoloživosti polifenola zaključili da bioraspoloživost varira u širokom rasponu među različitim skupinama, a za neke od njih i u ovisnosti o nativnom obliku u kojem se nalaze u određenim izvorima u hrani. Nakon unosa doze od 50 mg ekvivalenta aglikona polifenola, bilo u hrani bilo čistih polifenola, koncentracije u krvi nađene su u rasponu od 0 do 4 μM. Ukupna količina polifenola u krvi određena je zbrojem aglikona (mali udio) i metabolita (najveći udio) nađenih u krvi nakon unosa doze. Od svih ispitanih polifenola najbolje se apsorbiraju izoflavoni i galatna kiselina, a nakon njih redom katehini, flavanoni te glukozidi kvercetina uz različite farmakokinetike. Najslabije se apsorbiraju proantocijanidini, derivati katehina s galatnom kiselinom iz čajeva te antocijanidini. Različita je i famakokinetika među različitim skupinama polifenola, pa je primjerice C_{max} određen u rasponu od približno 1,5 h do približno 5,5 h, ovisno o mjestu apsorpcije u tankom crijevu [32].

Ovdje ipak valja naglasiti da su gore navedene trenutno poznate činjenice o sudbini flavonoida u organizmu generalno uopćenje temeljeno na relativno malom broju studija koje su provedene u eksperimentalnim uvjetima *in vitro* i još manjem broju onih koje su provedene *in vivo*. Pitanje bioraspoloživosti uključuje niz varijabli poput apsorpcije u tankom crijevu, ekskrecije glukuronidiranih metabolita natrag u lumen tankog crijeva, metabolizma posredovanog crijevnom mikroflorom, metabolizma u tankom crijevu i u jetri, farmakokinetike, identifikacije metabolita prisutnih u krvi, vezanja na albumin, nakupljanja u stanicama, unutarstaničnog metabolizma, nakupljanja u tkivima te eliminacije putem žuči i urina. Svaki od ovih segmenata je u određenoj, većoj ili manjoj, mjeri istražen u različitim

eksperimentalnim uvjetima. No, glavni izazov leži u integriranju svih informacija te povezivanju pojedinih varijabli s biološkim učincima na nivou organa. Ovaj je zadatak dodatno otežan i činjenicom da relativan doprinos svake od varijabla može ovisiti o promatranom flavonoidu. Naime, neki flavonoidi mogu biti u manjoj mjeri apsorbirani, a postizati jednake koncentracije u krvi kao i neki drugi kod kojih je, primjerice, manja ekskrecija glukuronidiranih metabolita natrag u tanko crijevo, ili manji obim metabolizma ili sporija eliminacija [19]. Nadalje, metaboliti prisutni u tkivima mogu se razlikovati u odnosu na one prisutne u krvi. Youdim i suradnici [33] pokazali su da je nakupljanje glukuronida flavanona u uzgojenim stanicama moždanog endotela štakora i miševa znatno niže u odnosu na njihove aglikone. Također je na štakorima koji su podvrgnuti prehrani bogatoj genisteinom, pokazano da je aglikonska frakcija genisteina značajna za nekoliko različitih vrsta tkiva zbog nađene veće koncentracije u odnosu na izmjerenu u krvi. Tako je frakcija aglikona nađena u udjelu većem od 50% od ukupnih metabolita genisteina u tkivu dojke [34], maternice i jajnika, a 100% u mozgu [35] i prostati [36], dok je udio (aglikona) u plazmi iznosio svega 8% ukupnih metabolita genisteina. Inicijalne studije na ljudskim tkivima također pokazuju da se koncentracije u plazmi ne mogu direktno povezati s koncentracijama u ciljanim tkivima te da distribucija između krvi i tkiva varira za različite flavonoide. Ovdje se postavlja pitanje je li koncentracija flavonoida u plazmi točan biološki pokazatelj stvarne izloženosti [19].

I dok se ne rasvijetle brojna otvorena pitanja u vezi bioraspoloživosti flavonoida i povezanosti s njihovim biološkim učincima, proučavanje flavonoida u različitim eksperimentalnim uvjetima *in vitro* i dalje su vrijedan i neizostavan izvor informacija koje mogu doprinijeti odgonetavanju kompleksne zagonetke zvane metabolizam flavonoida popunjavajući brojne praznine u ovom relativno slabo istraženom području.

Obzirom na temu ovog rada, u daljnjem fokusu razmatranja biti će oksidativni metabolizam posredovan citokromima P450. Pregled dosadašnjih spoznaja o ovom segmentu metabolizma flavonoida ograničen je samo na flavonoide koji su bili predmet istraživanja u ovom radu (vidi poglavlje 3.1), a prikaz je organiziran prema podjeli flavonoida u glavne skupine (vidi tablicu 3).

1.4.1 Oksidativni metabolizam flavona

Istaknute strukturne karakteristike flavona jesu dvostruka veza između atoma ugljika na položajima 2 i 3 te keto skupina na položaju 4 prstena C. Većina flavona prisutna u povrću i

voću ima hidroksilnu skupinu na položaju 5 prstena A, dok hidroksilacije na ostalim položajima (uglavnom na položaju 7 prstena A, te 3' i 4' prstena B) mogu varirati prema taksonomskoj klasifikaciji određenog povrća ili voća [23]. Od flavonoida koji su iz skupine flavona korišteni u ovom radu, metabolizam posredovan citokromima P450 u literaturi je opisan za akacetin, apigenin, diosmetin, krizin i tangeretin.

Androutsopolus i suradnici [37] utvrdili su da se akacetin slabo metabolizira u *in vitro* eksperimentu s rekombinantnim CYP1A1, a još slabije s rekombinantnim CYP1B1. Akacetin se najprije demetilira na položaju 4' prstena B pri čemu nastaje glavni produkt apigenin, a potom se nastali apigenin dalje hidroksilira na položaju 3' prstena B tvoreći luteolin te na položaju 6 prstena A tvoreći skutelarein. Dodatno je opaženo formiranje još jednog produkta metabolizma u istim eksperimentalnim uvjetima s vremenom elucije većem od ostalih metabolita, a manjem od akacetina. Ovaj metabolit nije identificiran niti daljnje karakteriziran i zastupljen u znatno manjoj količini u odnosu na glavni metabolit apigenin.

Nielsen i suradnici [38] prvi su 1998. godine utvrdili metabolizam apigenina u hidroksilirani produkt luteolin u *in vitro* eksperimentu s jetrenim mikrosomima štakora u prisutnosti NADPH, koenzima citokroma P450. Breinholt i suradnici [39] potvrdili su ove rezultate na eksperimentalnom modelu s mišjim i humanim jetrenim mikrosomima *in vitro*, te su dodatno utvrdili da je CYP1A2 u najvećoj mjeri odgovoran za ovu reakciju, a u znatno manjoj mjeri i CYP3A4. Gradolatto i suradnici [40] su u eksperimentalnom modelu s jetrenim mikrosomima štakora *in vitro*, osim glavnog metabolita luteolina, identificirali dodatna dva hidroksilirana metabolita zastupljena u malim količinama, skutelarein i izoskutelarein. Ova dva dodatna metabolita nastala su samo u eksperimentu s induciranim mikrosomima, dok je s neinduciranima jedini produkt metabolizma bio luteolin.

Metabolizam diosmetina istraživali su Androutsopolus i suradnici u inkubacijama *in vitro* s rekombinantnim citokromima P450 i staničnim linijama adenokarcinoma dojke MCF-7 [41] te u drugom eksperimentu *in vitro* u inkubacijama sa staničnim linijama adenokarcinoma dojke MDA-MB 468 i normalnim stanicama tkiva dojke MCF-10A [42]. Nije zabilježen metabolizam diosmetina u inkubacijama s rekombinantnim humanim CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 i CYP3A5, citkoromima P450 za koje je poznato da su eksprimirani u jetri. U inkubacijama s CYP3A4 metabolizam diosmetina primijećen je u malom, ali statistički značajnom ($P < 0,05$) obimu. Najveći obim metabolizma diosmetina zabilježen je u inkubacijama s rekombinantnim humanim CYP1A1, CYP1A2 i

CYP1B1 te je detektiran nastanak tri različita metabolita. Glavni je metabolit identificiran kao luteolin, što ukazuje na to da je demetilacija na položaju 4' prstena B glavni metabolički put kataliziran ovim enzimima. Preostala dva metabolita koji nastaju u manjem obimu nisu identificirana niti dalje karakterizirana. U drugom eksperimentu pretvorba diosmetina u luteolin potvrđena je i na staničnim linijama adenokarcinoma dojke MDA-MB 468, dok u normalnim stanicama tkiva dojke MCF-10A ova reakcija nije primijećena.

Metabolizam krizina prvi put je opisan 1998. godine kad su Neilsen i suradnici [38] u *in vitro* eksperimentu s jetrenim mikrosomima štakora u prisutnosti NADPH, koenzima citokroma P450, utvrdili nastanak četiri produkta oksidativnog metabolizma. Dva količinski najzastupljenija metabolita nisu identificirana niti dalje karakterizirana, dok su dva metabolita nađena u manjoj količini identificirana kao apigenin i luteolin. Kasnije su Androutsopolus i suradnici [43] detaljnije istražili oksidativni metabolizam krizina u *in vitro* eksperimentalnom modelu s humanim rekombinantnim citokromima P450. Distributivan nastanak apigenina i luteolina nije potvrđen ovim eksperimentom, već je utvrđena pretvorba krizina u bajkalein katalizirana sljedećim enzimima citokroma P450: 1A1, 1A2 i 1B1. Bajkalein je bio jedini produkt metabolizma u uvjetima eksperimenta.

Metabolizam pentametoksiliranog flavona tangeretina istražen je u nekoliko različitih *in vitro* eksperimenata koji ukazuju na veću kompleksnost metaboličkih putova posredovanih citokromima P450 višesupstituiranih metiliranih flavonoida u odnosu na hidroksilirane analoge. Neilsen i suradnici [38] prvi su istraživali metabolizam tangeretina u *in vitro* eksperimentu s jetrenim mikrosomima štakora u prisutnosti NADPH, koenzima citokroma P450. U ovom je eksperimentu detektirano više produkata oksidativnog metabolizma, a identificirana su tri glavna metabolita: 4'-hidroksi-5,6,7,8-tetrametoksiflavon (4'-demetilirani derivat tangeretina), 3',4'-dihidroksi-5,6,7,8-tetrametoksiflavon (4'-demetilirani i 3'-hidroksilirani derivat tangeretina) i 5,4'-dihidroksi-6,7,8-trimetoksiflavon (5,4'-didemetilirani derivat tangeretina). Ostali detektirani metaboliti nisu identificirani niti dalje karakterizirani. Ista grupa autora [44] u drugom je eksperimentu istražila *in vivo* biotransformaciju tangeretina u štakorima kojima je enteralnom tubom kroz više dana davan čisti tangeretin. Metaboliti su detektirani u urinu i fecesu, a prije analize su hidrolizirani kako bi se uklonili glukuronski i sulfatni ostaci, konjugirani produkti faze II metabolizma. Ideja je bila utvrditi metaboličke putove koji su prethodili konjugaciji, a koji su najvjerojatnije posljedica metabolizma posredovanog citokromima P450. Detektirano je 10 različitih metabolita, a sedam ih je identificirano i to su, navedeni prema redoslijedu elucije u obrnuto-faznoj tekućinskoj

kromatografiji: 6,7,4'-trihidroksi-5,8-dimetoksiflavon, 7,4'-dihidroksi-5,6,8-trimetoksiflavon, 6,4'-dihidroksi-5,7,8-trimetoksiflavon, 3',4'-dihidroksi-5,6,7,8-tetrametoksiflavon, 4'-hidroksi-5,6,7,8-tetrametoksiflavon, 6-hidroksi-5,7,8,4'-tetrametoksiflavon i 5,6-dihidroksi-7,8,4'-trimetoksiflavon. Glavni metabolit s najvećim količinskim udjelom i u urinu i u fecesu bio je, jednako kao i u gore navedenom eksperimentu *in vitro*, 4'-hidroksi-5,6,7,8-tetrametoksiflavon (4'-demetilirani derivat tangeretina). Nakon toga su Breinholt i suradnici [45] istražili metabolizam tangeretina u *in vitro* eksperimentima s mišjim jetrenim mikrosomima, humanim jetrenim mikrosomima (HLM) i rekombinantnim citokromima P450 (1A2, 3A4, 2C9 i 2D6). Gotovo identičan metabolički profil utvrđen je inkubacijama u istim uvjetima za oksidativni metabolizam posredovan mišjim i humanim jetrenim mikrosomima, što upućuje na zaključak da su mišji jetreni mikrosomi (ovdje inducirani Aroklorom 1254) pouzdan surogat model za istraživanje oksidativnog metabolizma flavonoida. Identificirano je pet metabolita i to su, navedeni prema redoslijedu elucije u obrnuto-faznoj tekućinskoj kromatografiji: 7,4'-dihidroksi-5,6,8-trimetoksiflavon, 6,4'-dihidroksi-5,7,8-trimetoksiflavon, 3',4'-dihidroksi-5,6,7,8-tetrametoksiflavon, 4'-hidroksi-5,6,7,8-tetrametoksiflavon i 5,6-dihidroksi-7,8,4'-trimetoksiflavon. Glavni metabolit s najvećim količinskim udjelom i u ovom je slučaju bio 4'-hidroksi-5,6,7,8-tetrametoksiflavon. Eksperimenti s rekombinantnim citokomima P450 pokazali su da su enzimi CYP1A2, CYP3A4 i CYP2D6 uključeni u oksidativni metabolizam tangeretina, no nije precizno utvrđeno koji enzim je odgovoran za svaku pojedinačnu metaboličku reakciju. Pokazano je da je CYP1A2 glavni enzim odgovoran za demetilaciju na položaju 4' prstena B, kao i za naknadnu hidroksilaciju na položaju 3' prstena B ovog glavnog demetiliranog produkta. Ista pretvorba je primijećena i uz CYP3A4, ali u manjem obimu. Zaključeno je da su potrebna dodatna istraživanja kako bi se za svaki metabolit precizno utvrdio njegov put nastanka te koji je citokrom P450 odgovoran za svaku od reakcija.

Važno je istaknuti jednu važnu karakteristiku metabolizma flavona koju je komentirao Walle u preglednom članku [46]. Zaključeno je da metilacija slobodnih hidroksilnih skupina na fenolnim prstenima flavonoida daje derivate manje podložne glukuronidaciji i sulfataciji, što rezultira povećanom metaboličkom stabilnošću *in vivo*, budući da su reakcije konjugacije dominantne u metabolizmu flavonoida *in vivo*. Izostanak ili smanjenje udjela reakcija konjugacije u ukupnom metabolizmu, dodatno daje na važnosti oksidativnom metabolizmu posredovanom citokromima P450 koji može postati dominantan metabolički put kod nekih potpuno metiliranih flavonoida (bez slobodnih hidroksilnih skupina). Pokazano je također da metilacija utječe na značajno poboljšanje transporta flavona kroz biološke membrane,

primjerice u procesu apsorpcije iz crijeva te tako izrazito povećava njihovu oralnu bioraspoloživost.

Rezultati provedenih i gore opisanih istraživanja oksidativnog metabolizma flavona posredovanog citokromima P450 upućuju na neke općenite zaključke. Hidroksilacija flavona katalizirana je na položajima 4', 3' na prstenu B, te na položajima 6 i 8 na prstenu A, ako se u strukturi nalazi jedna ili nijedna hidroksilna skupina na prstenu B flavonske jezgre. Demetilacija metoksilne skupine kod flavona preferirana je na položajima 4' prstena B i na položajima 6 i 7 prstena A. Demetilacija je također moguća na položaju 5 prstena A ako se u strukturi flavona nalazi hidroksilna skupina na položaju 4' prstena B ili na položaju 6 prstena A. Naposlijetku, metilacija flavona kojom nastaju derivati bez slobodnih hidroksilnih skupina u strukturi štiti ove spojeve od brze biotransformacije u jetri [18]. Dominantan enzim odgovoran za oksidativni metabolizam flavona je CYP1A2, dok su i neki drugi citokromi P450 uključeni u metabolizam flavona, ali u manjoj mjeri.

1.4.2 Oksidativni metabolizam flavonola

Tipična strukturna karakteristika flavonola je hidroksilna skupina na položaju 3 prstena C, što ih razlikuje od flavona. Ova hidroksilna skupina može biti glikozilirana. Flavonoli su, poput flavona, vrlo raznolika skupina kad je u pitanju raspored i broj kombinacija hidroksilnih i metoksilnih skupina. Kad se tome pridodaju i različiti stupnjevi i obrasci glikozilacije, ne čudi njihova široka rasprostranjenost i činjenica da je ova grupa flavonoida najveća i najzastupljenija u voću i povrću. Kvercetin je tipični predstavnik ove skupine flavonoida i nalazi se u raznim vrstama hrane biljnog porijekla [23]. Od flavonoida koji su iz skupine flavonola korišteni u ovom radu, metabolizam posredovan citokromima P450 u literaturi je opisan za galangin, kemferol i tamariksetin.

Metabolizam galangina posredovan citokromima P450 prvi je put opisan u radu Neilsena i suradnika [38] koji su postavili *in vitro* eksperimentalni model s jetrenim mikrosomima štakora u prisutnosti NADPH, koenzima citokroma P450. Galangin je u tim uvjetima pokazao metaboličku pretvorbu u kemferol hidroksilacijom na položaju 4' prstena B. I dok je u eksperimentu s neinduciranim mikrosomima ovo bio jedini produkt, dodatna hidroksilacija na položaju 3' prstena B primijećena je s induciranim mikrosomima kao i nastanak sekundarnog metabolita kvercetina. Otake i Walle [47] potvrdili su metabolizam galangina u kemferol na *in vitro* eksperimentalnom modelu s humanim jetrenim mikrosomima i rekombinantnim citokromima P450 (1A1, 1A2, 2C9 i 3A4). Daljnja hidroksilacija u kvercetin nije zabilježena

u ovim eksperimentima, a od ispitanih čistih enzima utvrđeno je da su CYP1A1, CYP1A2 i CYP2C9 uključeni u metabolizam galangina u kemferol, s tim da je dominantnu ulogu imao CYP1A2, dok CYP3A4 nije katalizirao ovu reakciju.

Neilsen i suradnici [38] u istim eksperimentalnim uvjetima opisanima za galangin, opisali su i oksidativni metabolizam kemferola posredovan štakorskim citokromima P450. Utvrđeno je da kemferol metabolizira u kvercetin hidroksilacijom na položaju 3' prstena B. Breinholt i suradnici [39] potvrdili su metaboličku pretvorbu kemferola u kvercetin u *in vitro* eksperimentu s mišjim jetrenim mikrosomima, humanim jetrenim mikrosomima i rekombinantnim citokromima P450 (1A2, 2C9, 2D6 i 3A4). Utvrđeno je da je od ispitanih enzima jedino CYP1A2 odgovoran za kataliziranje primijećene metaboličke reakcije.

Metabolizam tamariksetina prvi su istraživali Neilsen i suradnici [38] u istim eksperimentalnim uvjetima opisanima kod galangina i kemferola. Oksidativni metabolizam tamarikestina i njegova metabolička pretvorba u kvercetin demetilacijom na položaju 4' posredovana je štakorskim citokromima P450. Ova metabolička reakcija potvrđena je kasnije u eksperimentu kojeg su Breinholt i suradnici [39] proveli u *in vitro* uvjetima inkubacijama tamariksetina s mišjim jetrenim mikrosomima, humanim jetrenim mikrosomima i rekombinantnim citokromima P450 (1A2, 2C9, 2D6 i 3A4). U inkubacijama s neinduciranim mišjim jetrenim mikrosomima nije primijećen metabolizam tamariksetina, dok je demetilacija i pretvorba u kvercetin primijećena s induciranim mišjim jetrenim mikrosomima te također s humanim jetrenim mikrosomima. Inkubacije s rekombinantnim citokromima P450 pokazale su da je CYP1A2 dominantan enzim odgovoran za metabolizam tamariksetina u kvercetin, dok su reakciju također katalizirali, ali u znatno manjoj mjeri, CYP2C9 i CYP3A4.

Na temelju ograničenih literaturnih podataka dostupnih za flavonole njihov oksidativni metabolizam posredovan citokromima P450 može se sažeti u dva opažanja: hidroksilacija flavonola događa se na položaju 3' i 4' prstena B i spojevi sa supstituiranom metoksilnom skupinom na položaju 4' prstena B lako se *O*-demetiliraju tvoreći odgovarajuće hidroksilne analoge [18]. CYP1A2 dominantan je enzim odgovoran za metabolizam flavonola, dok su u manjoj mjeri uključeni i neki drugi citokromi P450.

1.4.3 Oksidativni metabolizam izoflavona

Izoflavoni su velika i karakteristična/osobita skupina flavonoida. Vrlo su usko rasprostranjeni unutar biljnog carstva, a pretežno se nalaze u soji i ostalim mahunarkama. U odnosu na flavone, fenolni prsten C je u strukturi izoflavona supstituiran na položaju 3, umjesto na

položaju 2 [23]. Od flavonoida koji su iz skupine izoflavona korišteni u ovom radu, metabolizam posredovan citokromima P450 u literaturi je opisan za genistein i prunetin.

Metabolizam izoflavona genisteina višestruko je istražen i dokumentiran u literaturi. *In vitro* eksperimenti s jetrenim mikrosomoma štakora i humanim jetrenim mikrosomima koje su proveli Kulling i suradnici [48-50] pokazali su metaboličku pretvorbu genisteina u tri glavna hidroksilirana produkta (5,6,7,4'-tetrahidroksiizoflavon, 5,7,8,4'-tetrahidroksiizoflavon i 5,7,3',4'-tetrahidroksiizoflavon, poznat pod nazivom orobol) i tri metabolita u malim količinama (2,5,7,4'-tetrahidroksiizoflavon, 5,7,8,3'4'-pentahidroksiizoflavon i 5,6,7,3'4'-pentahidroksiizoflavon). Ova posljednja tri metabolita nađena su u inkubacijama s induciranim jetrenim mikrosomima muških štakora dok su u inkubacijama s humanim jetrenim mikrosomima pripremljenima od jednog donora ovi metaboliti nađeni tek u tragovima. Breinholt i suradnici [45] su oksidativni metabolizam genisteina posredovan citokromima P450 istraživali na eksperimentalnom *in vitro* modelu s mišjim jetrenim mikrosomima, humanim jetrenim mikrosomima i rekombinantnim citokromima P450. Inkubacije s mišjim i humanim jetrenim mikrosomima pokazale su gotovo identičan metabolički profil genisteina pri čemu je opisan nastanak pet metabolita. Identificiran je jedino 3'-hidroksilirani derivat genisteina (orobol), dok su druga dva metabolita dalje karakterizirana kao hidroksilirani produkti, ali bez identifikacije strukuture za svakoga od njih. Preostala dva detektirana metabolita nađena su u premalim količinama za bilo kakvu daljnju karakterizaciju te također nisu identificirana. Inkubacije s čistim enzimima pokazale su pretvorbu genisteina u orobol uz CYP1A2 u značajnom obimu, dok je uz CYP2D6 primijećen nastanak jednog od ona dva neidentificirana hidroksilirana produkta u maloj količini. CYP2C9 i CYP3A4 nisu katalizirali oksidativne reakcije genisteina u istim uvjetima eksperimenta. Hu i suradnici [51] istražili su oksidativni metabolizam genisteina posredovan citokromima P450 u *in vitro* eksperimentu s humanim jetrenim mikrosomima i eksprimiranim citokromima P450. Inkubacije s HLM-om pokazale su metaboličku pretvorbu genisteina u dva produkta s manjim vremenom zadržavanja u obrnuto-faznom sustavu tekućinske kromatografije. Glavni metabolit identificiran je kao 3'-hidroksilirani derivat genisteina (orobol), dok drugi metabolit nije identificiran niti dalje karakteriziran. Nastanak orobola u značajnoj količini utvrđen je i u inkubacijama s eksprimiranim izoformama citokroma P450 1A1, 1A2, 1B1, 2E1, a u manjoj količini u inkubacijama s CYP2C8, CYP2C19 i CYP2D6. Na temelju kinetičkih obilježja primijećene reakcije i na temelju inkubacija sa specifičnim inhibitorima pojedinih izoformi citokroma P450, zaključeno je da CYP1A2 ima dominantnu

ulogu u metabolizmu genisteina i njegovoj pretvorbi u orobol, a u manjoj mjeri i CYP2E1. CYP2A6, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C18, CYP3A4, CYP3A5 i CYP4A11 nisu katalizirali ovu metaboličku reakciju u istim uvjetima eksperimenta. U istraživanju koje su proveli Bursztyka i suradnici [52] genistein je u *in vitro* biotransformacijama s jetrenim mikrosomima štakora i humanim jetrenim mikrosomima dao tri glavna metabolita hidrokislirana na položajima 8 i 6 prstena A, te na položaju 3' prstena B (navedeno prema redosljedu elucije u obrnuto-faznom sustavu tekućinske kromatografije), a isti metaboliti utvrđeni su i u *in vitro* eksperimentu kojeg su proveli Atherton i suradnici [53] s humanim jetrenim mikrosomima. U inkubacijama s čistim rekombinantnim enzimima citokromima P450 u istim uvjetima nije detektiran 5,7,8,4'-tetrahidroksiizoflavon, dok su gore opisane reakcije hidroksilacije na položaju 6 prstena A i 3' prstena B primijećene uz CYP1A2 i u manjoj mjeri uz CYP3A4. U istim uvjetima eksperimenta CYP2B6, CYP2D6 i CYP2E1 nisu katalizirali metabolizam genisteina.

Metabolizam prunetina u literaturi opisan je jedino u radu kojeg su proveli Hu i suradnici [51] koji su istraživali oksidativni metabolizam metiliranih izoflavona i njihovu posljedičnu aktivaciju (*O*-demetilaciju u genistein ili daidzein). U inkubacijama s humanim jetrenim mikrosomima i eksprimiranim CYP1A2 primijećena je brza metabolička pretvorba prunetina u genistein *O*-demetilacijom na položaju 7 prstena A.

Rezultati provedenih i gore opisanih istraživanja oksidativnog metabolizma izoflavona posredovanog citokromima P450 upućuju na neke općenite zaključke. Hidroksilacija izoflavona katalizirana je na položaju 3' na prstenu B, te na položajima 6 i 8 na prstenu A, ako se u strukturi nalazi jedna ili nijedna hidroksilna skupina na prstenu B izoflavonske jezgre. Demetilacija metoksilne skupine kod izoflavona događa se na položaju 6 prstena A i na položaju 4' prstena B, ako se u strukturi nalazi metoksilna skupina supstituirana na položaju 4' prstena B ili na položaju 6 prstena A [18]. Glavna izoforma enzima citokroma P450 uključena u metabolizam izoflavona je CYP1A2, dok su i neke druge izoforme uključene u manjoj mjeri.

1.4.4 Oksidativni metabolizam flavanona

Flavanoni, često nazivani i dihidroflavonima, imaju zasićen prsten C. Dakle, za razliku od flavona, dvostruka je veza između ugljikovih atoma na položajima 2 i 3 na prstenu C zasićena i to je jedina strukturna razlika između ove dvije skupine flavonoida. Tijekom posljednjih 15 godina broj poznatih flavanona značajno je porastao, a pretežno su prisutni u svom voću koje

pripada *Citrus* vrstama poput naranče, limuna i grejpa [23]. Od flavonoida koji su iz skupine flavanona korišteni u ovom radu, metabolizam posredovan citokromima P450 u literaturi je opisan za hesperetin i naringenin.

Metabolizam hesperetina i naringenina posredovan citokromima P450 prvi su istražili Nielsen i suradnici [38] na *in vitro* eksperimentalnom modelu s jetrenim mikrosomima štakora. U inkubacijama s dodanim NADPH, koenzimom enzima citokroma P450, utvrđena je metabolička pretvorba hesperetina i naringenina u eriodiktiol. Hesperetin je djelovanjem citokroma P450 demetiliran na položaju 4' prstena B, dok je naringenin hidroksiliran na položaju 3' prstena B. Osim glavnog metabolita, eriodiktiola, inkubacije s naringeninom pokazale su prisutnost dodatnog metabolita s vremenom elucije kraćem u odnosu na naringenin i glavni metabolit eriodiktiol u obrnuto-faznom sustavu tekućinske kromatografije. Ovaj metabolit nađen je u manjim količinama u odnosu na glavni metabolit eriodiktiol te nije identificiran niti dalje karakteriziran. Breinholt i suradnici [39] potvrdili su metaboličku pretvorbu hesperetina i naringenina u eriodiktiol u *in vitro* eksperimentu s mišjim jetrenim mikrosomima, humanim jetrenim mikrosomima i rekombinantnim citokromima P450 (1A2, 2C9, 2D6 i 3A4). Utvrđeno je da je od ispitanih enzima jedino CYP1A2 odgovoran za kataliziranje demetilacije hesperetina na položaju 4' prstena B. Inkubacije naringenina s rekombinantnim citokromima P450 pokazale su da je CYP1A2 dominantno odgovoran za hidroksilaciju na položaju 3' prstena B, dok je reakciju također katalizirao, ali u znatno manjoj mjeri, CYP3A4. U istraživanju kojeg su proveli Doostdar i suradnici [54] metabolizam hesperetina i naringenina nije primijećen u *in vitro* inkubacijama s HLM-om niti s rekombinantnim CYP1A2 ili CYP3A4, što je u suprotnosti s rezultatima gore opisanih drugih dvaju istraživanja. Metabolizam hesperetina i pretvorba u eriodiktiol primijećena je samo u inkubacijama s CYP1A1 i CYP1B1. Treba istaknuti da su u ovom istraživanju autori radili s puno manjim koncetracijama supstrata (hesperetina i naringenina) u odnosu na druga dva gore opisana istraživanja i da bi to mogao biti jedan od glavnih razloga razlike u rezultatima.

Na temelju dostupnih literaturnih podataka i gore opisanih rezultata istraživanja o oksidativnom metabolizmu flavanona posredovanom citokromima P450 može se zaključiti sljedeće. Glavni metabolički putovi kod flavanona jesu 4'-*O*-demetilacija i 3'-hidroksilacija. Strukturni zahtjevi za hidroksilaciju flavanona jesu jedna ili nijedna hidroksilna skupina na prstenu B flavanske jezgre. Prisutnost dvije ili više hidroksilne skupine na prstenu B čini se da sprečava daljnju hidroksilaciju. Dodatno, demetilacija na prstenu B je katalizirana samo ako se metoksilna skupina nalazi na položaju 4', a reakcija izostaje ako se nalazi na položaju 3'.

Glavni enzimi koji kataliziraju reakciju aromatske hidroksilacije flavanona pripadaju CYP1A porodici, dok su drugi citokromi P450 uključeni u reakcije demetilacije [18].

1.4.5 Sažetak literaturnog pregleda oksidativnog metabolizma flavonoida

Sažetak literaturnog pregleda oksidativnog metabolizma flavonoida korištenih u radu posredovanog citokromima P450 sumarno je prikazan u tablici 4.

Tablica 4. Literaturni pregled oksidativnog metabolizma flavonoida korištenih u radu posredovanog citokromima P450.

Flavonoid	Enzim	Produkti metabolizma	Reakcija	Referenca
Flavoni				
akacetin	**CYP1A1***; CYP1B1	**apigenin;** luteolin; skutelarein	**4'-demetilacija;** 3'-hidroksilacija; 6-hidroksilacija	[37]
apigenin	RLM; MLM; HLM;	**luteolin**	**3'-hidroksilacija**	[38], [39]
	CYP1A2; CYP3A4 RLM induc.	**luteolin**; skutelarein; izoskutelarein	**3'-hidroksilacija**; 6-hidroksilacija 8-hidroksilacija	[40]
diosmetin	**CYP1A1**; **CYP1A2**; **CYP1B1**; CYP3A4	**luteolin**	**4'-demetilacija**	[41]
krizin	RLM	**M1**; M2;** apigenin; luteolin	4'-hidroksilacija; 3'-hidroksilacija	[38]
	CYP1A1; **CYP1A2**; **CYP1B1**	**bajkalein**	**6-hidroksilacija**	[43]
tangeretin	RLM induc.	**4'-hidroksi-5,6,7,8-tetrametoksiflavon;** 3',4'-dihidroksi-5,6,7,8-tetrametoksiflavon; 5,4'-dihidroksi-6,7,8-trimetoksiflavon; ostali neidentificirani	**4'-demetilacija;** 4'-demetilacija i 3'-hidroksilacija; 5,4'-didemetilacija	[38]
	štakori (*in vivo*)	6,7,4'-trihidroksi-5,8-dimetoksiflavon, 7,4'-dihidroksi-5,6,8-trimetoksiflavon, 6,4'-dihidroksi-5,7,8-trimetoksiflavon, 3',4'-dihidroksi-5,6,7,8-tetrametoksiflavon, **4'-hidroksi-5,6,7,8-tetrametoksiflavon**, 6-hidroksi-5,7,8,4'-tetrametoksiflavon i 5,6-dihidroksi-7,8,4'-trimetoksiflavon; M8; M9; M10	6,7,4'-tridemetilacija; 7,4'-didemetilacija; 6,4'-didemetilacija; 4'-demetilacija i 3'-hidroksilacija; **4'-demetilacija**; 6-demetilacija; 5,6-didemetilacija	[44]
	HLM; **CYP1A2**; CYP3A4; CYP2D6	7,4'-dihidroksi-5,6,8-trimetoksiflavon, 6,4'-dihidroksi-5,7,8-trimetoksiflavon, 3',4'-dihidroksi-5,6,7,8-tetrametoksiflavon, **4'-hidroksi-5,6,7,8-tetrametoksiflavon** i 5,6-dihidroksi-7,8,4'-trimetoksiflavon	7,4'-didemetilacija; 6,4'-didemetilacija; 4'-demetilacija i 3'-hidroksilacija; **4'-demetilacija**; 5,6-didemetilacija	[45]

* Podebljanim stilom otisnuti su enzimi koji imaju glavnu ulogu u opisanoj reakciji i metaboliti koji nastaju u najvećim količinama (dominantni metaboliti).

** Metaboliti označeni slovima M1, M2, … nisu identificirani u citiranom istraživanju.

*** Metabolit nije nastao u inkubacijama s čistim rekombinantnim enzimima citokroma P450.

RLM = štakorski jetreni mikrosomi (engl. *rat liver microsomes*), RLM induc. = inducirani štakorski jetreni mikrosomi, MLM = mišji jetreni mikrosomi (engl. *mouse liver microsomes*), MLM induc. = inducirani mišji jetreni mikrosomi, HLM = humani jetreni mikrosomi (engl. *human liver microsomes*).

Tablica 4. Literaturni pregled oksidativnog metabolizma flavonoida korištenih u radu posredovanog citokromima P450 (nastavak).

Flavonoid	Enzim	Produkti metabolizma	Reakcija	Referenca
Flavonoli				
galangin	RLM induc.	**kemferol;** kvercetin	**4'-hidroksilacija;** 3'-hidroksilacija	[38]
	HLM; CYP1A1; **CYP1A2**; CYP2C9	**kemferol**	**4'-hidroksilacija**	[47]
kemferol	RLM	**kvercetin**	**3'-hidroksilacija**	[38]
	MLM; HLM; **CYP1A2**	**kvercetin**	**3'-hidroksilacija**	[39]
tamariksetin	RLM	**kvercetin**	**4'-demetilacija**	[38]
	MLM induc.; HLM; **CYP1A2;** CYP2C9; CYP3A4	**kvercetin**	**4'-demetilacija**	[39]
Izoflavoni				
genistein	RLM induc.; HLM	**5,6,7,4'-tetrahidroksiizoflavon; 5,7,8,4'-tetrahidroksiizoflavon; 5,7,3',4'-tetrahidroksiizoflavon (orobol)**; 2,5,7,4'-tetrahidroksiizoflavon; 5,7,8,3'4'-pentahidroksiizoflavon; 5,6,7,3'4'-pentahidroksiizoflavon	**6-hidroksilacija; 8-hidroksilacija; 3'-hidroksilacija;** 2-hidroksilacija; 8,3'-dihidroksilacija; 6,3'-dihidroksilacija	[48-50]
	MLM; HLM; **CYP1A2**; CYP2D6	**5,7,3',4'-tetrahidroksiizoflavon (orobol);** X-hidroksigenistein; Y-hidroksigenistein; M4; M5	**3'-hidroksilacija**	[45]
	HLM; CYP1A1, **CYP1A2**, CYP1B1, **CYP2E1**; CYP2C8, CYP2C19; CYP2D6	**5,7,3',4'-tetrahidroksiizoflavon (orobol);** M2	**3'-hidroksilacija**	[51]
	RLM; HLM; **CYP1A2**; CYP3A4	**5,7,8,4'-tetrahidroksiizoflavon***; 5,6,7,4'-tetrahidroksiizoflavon; 5,7,3',4'-tetrahidroksiizoflavon (orobol)**	**8-hidroksilacija; 6-hidroksilacija; 3'-hidroksilacija**	[52], [53]
prunetin	HLM; **CYP1A2**	**genistein**	**4'-demetilacija**	[49]
Flavanoni				
hesperetin	RLM	**eriodiktiol**	**4'-demetilacija**	[38]
	MLM; HLM; **CYP1A2**	**eriodiktiol**	**4'-demetilacija**	[39]
	CYP1A1; CYP1B1	**eriodiktiol**	**4'-demetilacija**	[54]
naringenin	RLM	**eriodiktiol;** M2	**3'-hidroksilacija**	[38]
	MLM; HLM; **CYP1A2**; CYP3A4	**eriodiktiol**	**3'-hidroksilacija**	[39]

* Podebljanim stilom otisnuti su enzimi koji imaju glavnu ulogu u opisanoj reakciji i metaboliti koji nastaju u najvećim količinama (dominantni metaboliti).

** Metaboliti označeni slovima M1, M2, … nisu identificirani u citiranom istraživanju.

*** Metabolit nije nastao u inkubacijama s čistim rekombinantnim enzimima citokroma P450.

RLM = štakorski jetreni mikrosomi (engl. *rat liver microsomes*), RLM induc. = inducirani štakorski jetreni mikrosomi, MLM = mišji jetreni mikrosomi (engl. *mouse liver microsomes*), MLM induc. = inducirani mišji jetreni mikrosomi, HLM = humani jetreni mikrosomi (engl. *human liver microsomes*).

1.4.6 Završne napomene

I na kraju valja istaknuti da je, za razliku od većeg broja eksperimenata u *in vitro* uvjetima, identifikacija cirkulirajućih metabolita u *in vivo* uvjetima provedena tek za nekoliko polifenola. Identifikacija podrazumjeva ne samo karakterizaciju vrste i/ili broja konjugirajućih skupina, već i njihove točne pozicije u strukturi polifenola. To je posebice bitno iz razloga što položaj na kojem se dogodi konjugacija može utjecati na biološke učinke konjugata (metabolita) [19]. Za točnu identifikaciju metabolita potrebna je kompleksna analitička oprema. Ilustracije radi, tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti u spregnutom sustavu s tandemskom spektrometrijom masa nije dovoljna u slučajevima kada nije dostupna poredbena tvar istaživanog metabolita, što najčešće i jest slučaj. Tada je ovim podacima potrebno pridružiti i rezultate magnetske rezonancije jezgre kako bi se obrazac metaboliziranih supstituenata u strukturi mogao točno utvrditi. Zbog ovih navedenih zahtjevnosti analitičke opreme, kao i zbog ranije opisane velike kompleksnosti biološke sudbine flavonoida koja ovisi o velikom broju procesa koji se zbivaju nakon unosa u organizam, vrlo je malo dostupnih podataka o konkretnim metabolitima nađenima u plazmi te njihovim točnim omjerima i udjelima u odnosu ishodišne aglikone. Ono što je iz dostupnih podataka poznato, jest da su glukuronidi općenito glavni produkti metabolizma flavonoida nađeni u plazmi, a slijede ih sulfati. Ostale primijećene metaboličke reakcije nakon apsorpcije flavonoida, poput *O*-metilacije, oksidacije i redukcije općenito su zastupljene u manjem udjelu [19,30,55].

1.5 Analitička metodologija u istraživanju metabolizma ksenobiotika posredovanog citokromima P450

Značajan dio današnjeg znanja o strukturnim karakteristikama citokroma P450 i njihove funkcije proizašlo je iz računalnih studija. Ključni podaci korišteni za bilo koje od tih teoretskih istraživanja dolaze iz provedenih eksperimenata, što ukazuje na neizostavnu ulogu koju eksperimenti zauzimaju u istraživanju ovog područja. U ovom poglavlju biti će obrađene ključne eksperimentalne metode koje se koriste u istraživanju metabolizma.

Biološki sustav koji može generirati produkte i u kojem se mogu uspoređivati brzine reakcija jedna je od osnovnih potreba kod istraživanja metaboličkih reakcija kataliziranih citkromima P450. U nastavku će u kratkim crtama biti predstavljene različite opcije koje su istraživačima danas na raspolaganju.

1.5.1 *In vivo* sustavi

Ovo je najpraktičniji izvor informacija zbog toga što se, ovisno o modelu, odnosi na cijelu životinju ili čovjeka. Ipak, produkti nastali u takvim sustavima mogu biti kompleksni zbog višestrukih ciklusa metabolizma koji se mogu zbivati. I brzine nastajanja određenih metaboličkih produkata teško je procijeniti u takvim sustavima. Stanični sustavi (koji u strogom smislu pripadaju u sustave *in vitro*) također imaju navedeni nedostatak kompleksnosti [56].

1.5.2 Tkivni mikrosomalni sustavi

Sustavi koji sadrže mikrosome dobivene iz endoplazmatskog retikuluma stanica vrlo su korisni u istraživanju metabolizma posredovanog citokromima P450. Jetra je uobičajeni izvor iz kojega se dobivaju mikrosomi. Ispitivanja na jetrenim mikrosomima daju relevantne rezultate metaboličke aktivnosti citokroma P450 jer su svi enzimi, osim šest izoformi primarno prisutnih u mitohondrijima (CYP11A1, CYP11B1, CYP11B2, CYP27A1, CYP27B1 i CYP27C1), prisutni u tkivu jetre. Humani jetreni mikrosomi osobito su relevantni za ispitivanja metabolizma lijekova, a jedna od prednosti tog sustava je prisutnost svih citokroma P450 od interesa. Ovo je ujedno i nedostatak zbog nemogućnosti direktne procjene pojedinačnog enzima dominantno uključenog u neku reakciju. Umjesto toga, procjena aktivnosti pojedinačnih enzima u nekoj reakciji provodi se korištenjem specifičnih inhibitora i/ili inhibirajućih protutijela [56].

1.5.3 Pročišćeni citokromi P450 u rekonstituiranim sustavima

Većina citokroma P450 danas se lako dobiva kao heterologno eksprimirane (rekombinantne) proteine, često s manjim modifikacijama na krajevima, na N-kraju poradi ekspresije, a na C-kraju zbog pročišćavanja (npr. His_n oznaka). Ipak, nekoliko citokroma P450 ne mogu se dobiti na ovaj način. Općenito, citokromi P450 mogu se rekonstituirati u relativno jednostavnim fosfolipidnim vezikularnim sustavima s rekombinantnom NADPH-citokrom P450 reduktazom i ponekad s citokromom b_5. CYP3A4 (i ostali enzimi iz subporodice 3A) zahtijevaju složenije sustave koji se sastoje od kombinacije fosfolipida i detergenata. Prednost korištenja pročišćenih sustava je očito u promatranju reakcija kataliziranih samo citokromom P450 od interesa. Tada se mogu definirati i brzine reakcija. Nedostatak je taj što se mora dobiti pročišćeni enzim, a kako je već spomenuto gore, neke rekonstitucije (CYP3A4) mogu biti problematične [56].

1.5.4 Membrane iz heterolognih ekspresijskih sustava

Heterologni ekspresijski sustavi komercijalno su dostupni ili se mogu pripremiti bez većih poteškoća. Oni imaju prednost što se odnose na pojedinačni citokrom P450, a zaobilaze potrebu za rekonstitucijom. Postoji nekoliko osnovnih tipova takvih sustava.

a) Stanice sisavaca

Primjeri uključuju COS-7, V79 i druge stanice. Te stanice općenito koriste endogenu NADPH-citokrom P450 reduktazu (i citokromom b_5). Prednost tih sustava sastoji se u tome da se neke stanične linije s citokromima P450 mogu koristiti u ispitivanju toksičnosti, ali glavni nedostatak su niske razine ekspresije. Dodatno, razine citokroma P450 preniske su da bi se mogao kvantificirati spektralno, što otežava kalibraciju određivanja brzina reakcije. Također, ti sustavi nisu praktični za povećanje količine nastalih produkata (engl. *scale up*) zbog potreba identifikacije [56].

b) Stanični sustavi kukaca (infekcija bakulovirusom zbog ekspresije)

Ti su sustavi komercijalno dostupni u obliku mikrosoma. U nekim je slučajevima prekomjerno eksprimirana NADPH-citokrom P450 reduktaza (i citokrom b_5) pa su brzine katalitičke aktivnosti vrlo visoke. Visoke brzine oksidacije koje postižu ovakvi sustavi ujedno su i glavna njihova prednost, a nedostatak im je visoka cijena [56].

c) Mikrobni membranski sustavi

Slično kao u slučaju sustava temeljenih na bakulovirusima, ekspresija citokroma P450 zajedno s NADPH-citokrom P450 reduktazom (i citokromom b_5) može se zbivati u bakterijama, uglavnom u *Escherichia coli*. Membrane izolirane iz bakterija mogu se koristiti kao jetreni mikrosomi, samo uz dodatak supstrata i NADPH-generirajućeg sustava. Takozvani bicistronički sustav, u kojem su citokrom P450 i NADPH-citokrom P450 reduktaza proizvedeni jednim ekspresijskim vektorom iz jedne RNA, pokazao se vrlo korisnim. Iako takvi sustavi nemaju tako visoke brzine katalize u usporedbi sa sustavima temeljenima na bakulovirusima, ekonomičniji su i mogu se koristiti za povećanje količine nastalih produkata zbog potreba identifikacije. Mikrosomi i stanice kvasaca također se mogu koristiti na sličan način [56].

1.5.5 Analitičke tehnike korištene za praćenje enzimskih reakcija

Općeniti pristup identifikaciji produkata reakcije katalizirane citokromom P450 uključuje inkubaciju supstrata ili s 1) pojedinačnim citokromom P450 (koji je uglavnom proizvod tehnologije rekombinantne DNA) ili s 2) smjesom citokroma P450 (npr. jetreni mikrosomi). Inkubacija se provodi na određenim definiranim uvjetima temperature i vremena u prisutnosti koenzima NADPH i kisika. Nakon dovršetka inkubacije, smjesa se analizira u svrhu identifikacije i određivanja nastalih produkata. Nastali produkti obično se prvo ekstrahiraju iz reakcijske smjese dodavanjem organskog otapala i korištenjem tekućinsko-tekućinske ekstrakcije ili ekstrakcije na čvrstoj fazi [56].

1.5.6 Tehnike odjeljivanja

1.5.6.1 Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

Daleko najkorištenija tehnika odjeljivanja za analizu produkata reakcija posredovanih citokromima P450 je tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) i to uglavnom u obrnuto-faznoj izvedbi. Područja koncentracija mogu biti vrlo različita, od visokih koncentracija u polupreparativnoj izvedbi na kolonama većih dimenzija (npr. 250×10 mm) do mikroanaliza malih količina na kolonama malih dimenzija (npr. 50×2.1 mm) u izvedbi ultra-visoke djelotvornosti (engl. *ultra-performance liquid chromatography*, UPLC) [56].

1.5.6.2 Ostale tehnike odjeljivanja

Svega nekoliko ostalih tehnika može se općenito mjeriti s velikom moći odjeljivanja HPLC tehnike. Tako, plinska kromatografija (engl. *gas chromatography*, GC) i kapilarna gel-elektroforeza (engl. *capillary gel electrophoresis*, CGE) u nekim slučajevima mogu dati izvrsne rezultate, te se mogu koristiti za kvantitativnu analizu ili za kvalitativnu analizu u slučaju povezivanja s detektorom spektrometrije masa (engl. *mass spectrometry*, MS). Tankoslojna kromatografija (engl. *thin-layer chromatography*, TLC) može također biti od koristi u odjeljivanju produkata za kvalitativnu analizu, dajući brzo odjeljivanje u relativno velikim količinama [56].

1.5.7 Tehnike analize

1.5.7.1 HPLC-UV-Vis

Najraširenija i općenito korištena metoda detekcije u HPLC analizi je spektrometrija apsorpcije ultraljubičastog i vidljivog zračenja (UV-Vis). Primararno se koristi za kvantitativnu analizu. UV spektri korisni su u za otkrivanje strukure nepoznatih produkata, ali

ne u tolikoj mjeri kao neke druge tehnike koje se u tu svrhu puno više koriste, poput spektrometrije magnetske rezonancije jezgre (engl. *nuclear magnetic resonance spectrometry*, NMR) i MS-a. Apsorpcijski spektri u ultraljubičastom dijelu elektromagnetskog zračenja definirani su dvostrukim vezama u strukturi molekule (uključujući i aromatske sustave) i njihovim konjugacijama [56].

1.5.7.2 Tekućinska kromatografija spregnuta sa spektrometrijom masa

To je općenito korišten i vrlo moćan pristup otkrivanju strukture nepoznatih metabolita. Razvoj metode ionizacije elektroraspršivanjem (engl. *electrospray*) proteklih dvadesetak godina omogućio je brza određivanja ovom tehnikom, kako kvalitativna, tako i kvantitativna. Vrijednost *m*/*z* nekog spoja (male molekule) povezan je s molekulskom masom, najčešće *M*+1 u načinu rada s pozitivnim ionima (engl. *positive ion mode*) i *M*–1 u načinu rada s negativnim ionima (engl. *negative ion mode*). Danas su dostupni spektrometri masa koji imaju mogućnost izdvajanja i fragmentiranja detektiranih iona stvarajući tzv. „obrazac fragmentacije“ (engl. *fragmentation pattern*). Ti obrasci fragmentacije osobito su korisni u identificiranju veza u molekuli koje se mogu lako pokidati i posljedično pomažu u identifikaciji nepoznatih spojeva [56]. U nekim je slučajevima moguće s visokom vjerojatnošću odrediti strukturu nepoznatog spoja samo na temelju molekulske mase i obrasca fragmentacije. Ipak, u većini slučajeva utvrđivanje strukture samo pomoću tehnika UV-Vis-a i MS-a bez analiza sa stabilnim izotopima nije konačan proces. Osobito se to odnosi na kompleksne molekule. [13]. Dosadašnja razmatranja primjene tehnike MS-a u analizi nepoznatih metabolita odnose se na detektore niske rezolucije (engl. *low-resolution*), koji tipično postižu odjeljivanje na razini jedne atomske jedinice mase (1 amu ili jedan atomski broj). Iako su spektrometri masa visoke rezolucije (engl. *high-resolution mass spoctrometry*, HRMS) dostupni već dugo vremena u uporabi, tek su se posljednjih godina počeli više koristiti u ovom području i to iz nekoliko razloga. Točnost određivanja mase ovih instrumenata tipično je ispod 5 ppm, što znači da je za male molekule vrijednosti *m*/*z* moguće izraziti na tri ili četiri decimale (atomske jedinice mase) koje su još uvijek točne. Ova točnost određivanja masa omogućuje uspostavljanje empirijske formule analiziranog nepoznatog spoja, a to je velik korak u procesu definiranja molekule, tj. određivanja strukture. Kao nužna posljedica navedene točnosti određivanja masa, HRMS se može koristiti u načinu rada koji se odnosi na očekivanu promjenu mase (engl. *mass defect mode*). U takvom načinu rada moguće je postaviti spektrometar masa tako da prepoznaje samo određene promjene mase između

ishodišnog spoja (supstrata) i metabolita (produkta), npr. dodatak atoma kisika u molekuli [56].

1.5.7.3 NMR spektroskopija

NMR spektroskopija često se, nakon UV-Vis-a i MS-a, koristi kao sljedeći izvor informacija o strukturi istraživane molekule [56]. Ta tehnika omogućava određivanje kemijske strukture tvari. Dvije su osnovne vrste informacija koje se dobivaju NMR analizom: povezivanje kroz vezu (engl. *through-bond coupling*) i prostorno povezivanje (engl. *through-space coupling*). Prva vrsta informacije daje odgovor na pitanje koji atomi su međusobno povezani, a druga vrsta informacije daje odgovor na pitanje o stereokemiji. Najjednostavniji način rada NMR-a je jednodimenzionalni ^{1}H NMR. Kompleksniji načini rada i dvodimenzionalne metode zahtijevaju veću količinu uzorka ili dulje vrijeme snimanja [13]. Danas je moguće snimiti jednodimenzionalni ^{1}H spektar s količinama ispitivanog spoja manjima od 1 µg. Većoj osjetljivosti NMR instrumenata doprinose primjena jačeg magnetskog polja i krioprobe. Osjetljivost se povećava kao kvadratna funkcija jačine magnetskog polja i kao korijenska funkcija temperature uzorka u Kelvinima. U mnogim je slučajevima, informacija dobivena iz jednodimenzionalnog ^{1}H spektra dovoljna za utvrđivanje strukture metabolita. Kako kompleksnost molekule raste, može biti potrebno više NMR spektara. Dvodimenzionalni ^{1}H spektar, primjerice, COSY (engl. *correlation NMR spectroscopy*), HMBC (engl. *heteronuclear multiple bond correlation*) i HSQC (engl. *heteronuclear multiple bond correlation*) može se dobiti s manje od 10 µg tvari za male molekule. Za potrebe snimanja ^{13}C spektara potrebno je oko 100 µg uzorka [56].

1.5.7.4 Ostale spektroskopske tehnike

I druge skeptroskopske tehnike mogu biti korisne u identifikaciji metabolita. Cirkularni dikroizam (engl. *circular dichroism*, CD) koristan je u određivanju stereokemijskih obilježja metabolita. Spektrometrija apsorpcije infracrvenog zračenja (engl. *infrared absorption spectrometry*, IR) može biti korisna, posebno u slučajevima kad se u molekuli metabolita predviđa prisutnost neke određene dijagnostičke funkcionalne skupine. Difrakcija rengenskog zračenja (engl. *X-ray diffraction*) može biti od velike koristi, ali je njezina primjena općenito nije realno moguća obzirom na vrlo male količine metabolita koji nastaju u reakcijama [13, 56].

1.5.8 Završne napomene

Razmatranje mogućnosti i trenutnog napretka na području analitičke metodologije u istraživanju metabolizma posredovanog citokromima P450 upućuje činjenicu da su danas za provođenje eksperimenata istraživačima na raspolaganju moćni analitički alati koji otvaraju velike mogućnosti za napredak. Posebno su NMR i MS tehnike napredovale u povećanju osjetljivosti. Mogućnost dobivanja velikih količina citokroma P450 heterolognom ekspresijom kao i napredak kristalografije rengenskog zračenja (engl. *X-ray crystallography*) također su uvelike olakšali istraživanje ovih enzima i reakcija koje kataliziraju. Ovome se može pridodati i napredak na području organske sinteze koji omogućuje proizvodnju potencijalnih metabolita i njihovo praćenje u raznim eksperimentalnim uvjetima [57]. Svim ovim alatima mogu se pridružiti i mogućnosti analize povezanosti strukture i djelovanja (engl. *structure-activity relationship*, SAR) raznim računalnim modelima. Iako trenutno postoji dobro razumijevanje kemijskih osnova oksidacija kataliziranih citokromima P450, još uvijek nije moguće raditi kvalitativne i kvantitativne predikcije metabolizma izvan malih skupina strukturno usko povezanih molekula.

2 CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA

U uvodnom su dijelu opisana strukturna obilježja flavonoida i navedeni njihovi farmakološki učinci te razlozi njihovog proučavanja. Iako su flavonoidi istraživani oko 50 godina, stanični mehanizmi njihovih brojnih bioloških učinaka i dalje su uvelike nepoznati [58]. U literaturi su opisana brojna istraživanja metabolizma flavonoida koja uključuju interakcije s enzimima iz skupine citokroma P450, ali samo do razine utvrđivanja induktivnog ili inhibitornog učinka na neki od enzima [58,59]. S druge strane, podaci o metabolizmu koji uključuju informacije o metabolitima i farmakokinetici dostupni su samo za mali broj flavonoida (vidi poglavlje 1.4). U uvodu je istaknuta važnost enzimskog sustava citokroma P450 za razne metaboličke procese u ljudskom organizmu. Te enzime smatramo najvažnijima za metabolizam ksenobiotika.

Stoga je hipoteza ovog istraživanja postavljena ovako: jedinstvene kemijske karakteristike flavonoida odgovorne su za metabolizam flavonoida posredovan jetrenim citokromima P450.

U svrhu provjere ove hipoteze, postavljeni su sljedeći ciljevi istraživanja:

1) *In vitro* postupcima utvrditi humane jetrene citokrome P450 odgovorne za biotransformaciju 30 odabranih flavonoida.

2) Za najznačajnije citokrome P450 odrediti kinetičke parametre.

3) Na temelju dobivenih rezultata iz ciljeva 1) i 2), postaviti prediktivni matematički model za predviđanje metabolizma posredovanog jetrenim citokromima P450 te opisati strukturna obilježja flavonoida koja ih čine podložnima reakcijama biotransformacije.

U prvoj fazi istraživanja korišteni su humani jetreni enzimi komercijalno dostupni kao humani jetreni mikrosomi. Korišteni su HLM enzimi dobiveni iz pula različitih uzoraka jetre kako bi se smanjio učinak biološke varijabilnosti. Kako bi se utvrdilo metaboliziraju li HLM enzimi neki od odabranih flavonoida, supstrat i produkti nastali metabolizmom nakon inkubacije praćeni su pomoću HPLC-UV-Vis-MS tehnike.

Ako je utvrđeno da se neki flavonoid metabolizira u sustavu s HLM enzimima, rezultat je u drugoj fazi istraživanja potvrđen korištenjem pojedinačnih rekombinantnih enzima P450 istom metodologijom primijenjenom i na HLM sustavu u prvoj fazi istraživanja. Razlika u postupku bila je jedino što su se umjesto HLM enzima koristili bakulosomi s hiperekspримiranim pojedinačnim citokromima P450 (CYP1A2, CYP2A6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 i CYP3A4) i NADPH-reduktazom u kombinaciji s

citokromom b_5. U ovoj drugoj fazi istraživanja utvrđeno je koji su specifični humani jetreni enzimi odgovorni za metabolizam odabranih flavonoida.

U trećoj fazi istraživanja za citokrome P450 koji su se pokazali najznačajnijima u metabolizmu odabranih flavonoida određeni su kinetički parametri. Određene su Michaelis-Menteničina konstanta (K_m) i konstanta brzine katalize (k_{cat}).

Četvrta, završna, faza istraživanja odnosi se na određivanje jedinstvenih strukturnih obilježja flavonoida odgovornih za interakciju i podložnost biotransformaciji pomoću pojedinačnih humanih jetrenih citokroma P450. Postavljanje prediktivnog matematičkog modela za predviđanje metabolizma posredovanog jetrenim citokromima P450 temeljeno je na podacima o biološkoj aktivnosti dobivenima ispunjavanjem ciljeva 1 i 2. Strukture flavonoida opisane su molekulskim deskriptorima iz programa HypeChem i chemicalize (HOMO, LUMO, parcijalni naboji, duljina, red veze i dr.). Za kvantitativno povezivanje biološke aktivnosti i strukture, odnosno matematičko modeliranje, primijenjena je metoda slučajnih šuma.

3 MATERIJALI I METODE

3.1 Odabrani flavonoidni aglikoni

U ovom radu u ispitivanju metabolizma posredovanog citokromima P450 korišteni su sljedeći flavonoidi: 3,6-dihidroksiflavon, 3,7-dihidroksiflavon, 6-hidroksiflavon, 7-hidroksiflavon, akacetin, apigenin, diosmetin, flavanon, flavon, galangin, genistein, hesperetin, izoramnetin, katehin, kemferol, krizin, krizindimetileter, kvercetin, luteolin, miricetin, morin, naringenin, pinocembrin, pinocembrin-7-metileter, prunetin, ramnetin, sakuranetin, tamariksetin, tangeretin i tektokrizin. Odabrano je po nekoliko aglikona flavonoida iz svake od glavnih skupina (vidi poglavlje 1.4 i tablicu 5) kako bi se pokrio širok spektar malih strukturnih razlika koje pokazuju brojni predstavnici ove skupine spojeva. Istraživanje je ograničeno na aglikone kako bi se dobio što homogeniji set spojeva prikladan za utvrđivanje specifičnosti u metabolizmu posredovanom citokromima P450, tj. jedinstvenih strukturnih obilježja flavonoida odgovornih za metabolizam flavonoida posredovan jetrenim citokromima P450.

Tablica 5. Strukturne karakteristike flavonoidnih aglikona odabranih za istraživanje metabolizma posredovanog humanim citokromima P450.

	C5	C6	C7	C8	C2'	C3'	C4'	C5'
Flavoni (C2–Ph, C2=C3, C4=O)								
akacetin	–OH		–OH				$–OCH_3$	
apigenin	–OH		–OH				–OH	
diosmetin	–OH		–OH			–OH	$–OCH_3$	
flavon								
6-hidroksiflavon		–OH						
7-hidroksiflavon			–OH					
krizin	–OH		–OH					
krizindimetileter	$–OCH_3$		$–OCH_3$					
luteolin	–OH		–OH			–OH	–OH	
tangeretin	$–OCH_3$	$–OCH_3$	$–OCH_3$	$–OCH_3$			$–OCH_3$	
tektokrizin	–OH		$–OCH_3$					
Flavonoli (C2–Ph, C2=C3, C3–OH, C4=O)								
3,6-dihidroksiflavon		–OH						
3,7-dihidroksiflavon			–OH					
galangin	–OH		–OH					
izoramnetin	–OH		–OH			$–OCH_3$	–OH	
kemferol	–OH		–OH				–OH	
kvercetin	–OH		–OH			–OH	–OH	
miricetin	–OH		–OH			–OH	–OH	–OH
morin	–OH		–OH		–OH		–OH	
ramnetin	–OH		$–OCH_3$			–OH	–OH	
tamariksetin	–OH		–OH			–OH	$–OCH_3$	
Izoflavoni (C2=C3, C3–Ph, C4=O)								
genistein	–OH		–OH				–OH	
prunetin	–OH		$–OCH_3$				–OH	
Flavanoni (C2-Ph, C2–C3, C4=O)								
flavanon								
hesperetin	–OH		–OH			–OH	$–OCH_3$	
naringenin	–OH		–OH				–OH	
pinocembrin	–OH		–OH					
pinocembrin-7-metileter	–OH		$–OCH_3$					
sakuranetin	–OH		$–OCH_3$				–OH	
Flavanoli (C2–Ph, C2–C3, C3–OH, C4=O)								
katehin	–OH		–OH			–OH	–OH	

3.2 Kemikalije

Metanol stupnja čistoće prikladnog za LC-MS (engl. *LC-MS grade*) i mravlja kiselina kupljeni su od Honeywell Specialty Chemicals Seelze GmbH, Sleeze, Njemačka i od Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka. Ultra-čista voda proizvedena je u arium® comfort I kombiniranom sustavu za proizvodnju vode nabavljenom od Sartorius AG, Goettingen, Njemačka. Flavon, flavanon, 6-hidroksiflavon, 7-hidroksiflavon, krizin, 3,6-dihidroksiflavon, 3,7-dihidroksiflavon, pinocembrin, tektokrizin, apigenin, galangin, genistein, pinocembrin-7-metileter, naringenin, krizindimetileter, akacetin, luteolin, kemferol, sakuranetin, katehin, diosmetin, morin, kvercetin, hesperetin, izorhamnetin, tamariksetin, ramnetin, miricetin, tangeretin i norvogonin kupljeni su od Extrasynthese, Genay Cedex, Francuska. 3,7,4'-trihidroksiflavon, 6,7-dihidroksiflavon, 7,8-dihidroksiflavon, 4'-hidroksiflavon, 2'-hidroksiflavon, 5,3',4'-trihidroksi-7-metoksiflvananon, 7,4' dihidroksiflavon, orobol i 2'-hidroksiprunetin nabavljeni su od TransMIT GmbH, Project Devision for Plant Metabolites and Chemicals (PMC), Gießen, Njemačka, santal je kupljen od Carbosynth Limited, Compton, Berkshire, Ujedinjeno Kraljevstvo i eriodiktiol od Biovit d.o.o, Varaždin, Hrvatska. Humani jetreni mikrosomi i rekombinirani citokromi P450 eksprimirani u bakulosomima dobiveni su iz Life Sciences Thermo Fisher Scientific, Sjedinjene Američke Države. Glukoza-6-fosfat (G6P), glukoza-6-fosfat dehidrogenaza (G6PD) i $NADP^+$ nabavljeni su od Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Njemačka. Kalijev fosfat (p.a.) i koncentrirana klorovodična kiselina (p.a.) kupljeni su od Kemike d.d., Zagreb, Hrvatska. Acetonitril za kromatografiju kupljen je od Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka.

3.3 Poredbene otopine flavonoida

Za svaki je flavonoid pojedinačno otapanjem u metanolu pripremljena početna otopina koncentracije 0,2 mg/ml ili 200 ppm. Početna otopina dalje je razijeđena smjesom mobilne faze A i mobilne faze B (vidi poglavlje 3.8.1) u omjeru 50:50 (*V/V*) kako bi se dobila konačna poredbena otopina flavonoidnog aglikona koncentracije 0,004 mg/ml ili 4 ppm. Ovo je koncentracija koja odgovara približno 10% teoretske koncentracije supstrata flavonoidnog aglikona u inkubacijskoj smjesi za ispitivanje metabolizma nakon zaustavljanja reakcije (200 μM = približno[2] 37,5 μg/ml = 37,5 ppm). Poredbene otopine flavonoidnih aglikona korištene su kao vanjski standardi u svrhu identifikacije metodom HPLC/Q-TOF-MS te u svrhu

[2] U pretvaranju molarnih i masenih koncentracija za prosječnu molarnu masu flavonoida uzeta je vrijednost 300 g/mol.

izgradnje baze podataka u programskom paketu Agilent MassHunter Workstation koji upravlja korištenim analitičkim LC/MS sustavom.

3.3.1 Primjer pripreme poredbenih otopina

POČETNA OTOPINA metabolita pojedinačni (200 ppm)

1 mg metabolita/5 ml MeOH (ili DMSO)

Postupak: u tikvicu od 5 ml vagnuti propisanu količinu metabolita na analitičkoj mikrovagi (preciznost na šest decimala grama), dodati otapala do 2/3 volumena i rukom mućkati, a ako je potrebno staviti i na ultrazvučnu kupelj, dok se ne otopi i zatim nadopuniti do oznake istim otapalom. (γ = 0,2 mg/ml = 200 ppm)

ili (u slučaju da nije moguće vaganje)

5 mg metabolita (već odvagano u dostavljenoj bočici)/25 ml MeOH (ili DMSO)

Postupak: u bočicu s unaprijed odvaganim metabolitom (5 mg) dodati otapala do 2/3 volumena i rukom mućkati dok se ne otopi. Pasteurovom pipetom otopinu kvantitativno prenijeti u tikvicu od 25 ml, ako je potrebno, još mućkati i/ili staviti na ultrazvučnu kupelj dok se ne otopi i nadopuniti do oznake istim otapalom. (γ = 0,2 mg/ml = 200 ppm)

METABOLIT 10 ppm

50 µl *POČETNA OTOPINA metabolita pojedinačni (200 ppm)*/1 ml otapalo (mobilna faza A:mobilna faza B = 50:50 *V/V*). (γ = 0,01 mg/ml = 10 ppm)

Koncentracija metabolita u pripremljenoj otopini odgovara 26% maksimalne koncentracije flavonoida u inkubacijskoj smjesi nakon zaustavljanja reakcije (200 µM = 37,5 µg/ml = 37,5 ppm).

METABOLIT 4 ppm

20 µl *POČETNA OTOPINA metabolita pojedinačni (200 ppm)*/1 ml otapalo (mobilna faza A:mobilna faza B = 50:50 *V/V*). (γ = 0,004 mg/ml = 4 ppm)

Koncentracija metabolita u pripremljenoj otopini odgovara 10% maksimalne koncentracije flavonoida u inkubacijskoj smjesi nakon zaustavljanja reakcije (200 µM = 37,5 µg/ml = 37,5 ppm).

METABOLITI MIX 4 ppm

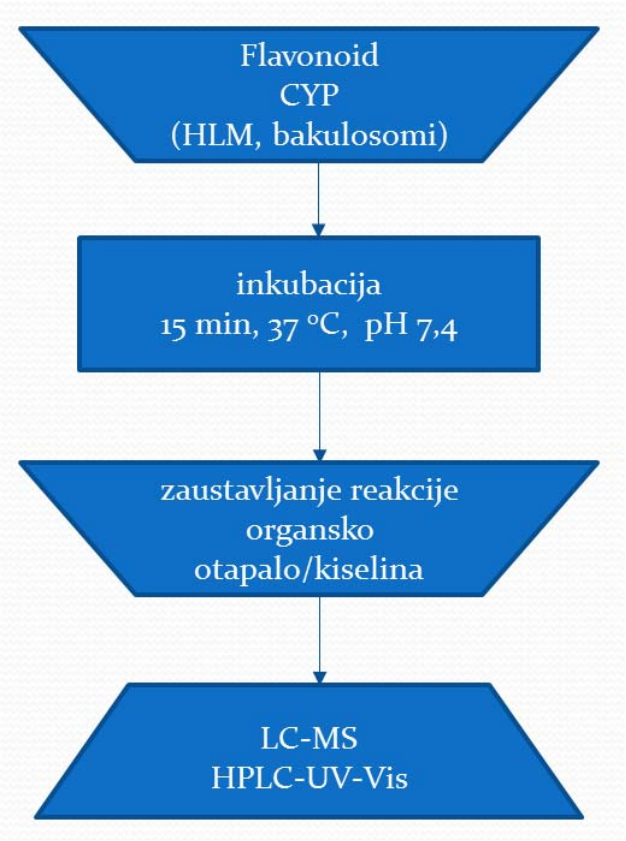
20 µl *POČETNA OTOPINA metabolita pojedinačni (200 ppm)* za svaki pojedinačni metabolit/1 ml otapalo (mobilna faza A:mobilna faza B = 50:50 *V/V*). (γ = 0,004 mg/ml = 4 ppm)

Koncentracija svakog metabolita u pripremljenoj otopini odgovara 10% maksimalne koncentracije flavonoida u inkubacijskoj smjesi nakon zaustavljanja reakcije (200 µM = 37,5 µg/ml = 37,5 ppm).

3.4 Inkubacijska smjesa za ispitivanje metabolizma flavonoida posredovanog humanim jetrenim mikrosomima

Za svaki je flavonoid pojedinačno pripremljena 20 mM metanolna otopina. 100 µl ove otopine preneseno je u staklenu epruvetu i upareno do suha na vodenoj kupelji s mehaničkim miješanjem. Nakon uparavanja flavonoida, u istoj epruveti pripremljena je inkubacijska smjesa ukupnog volumena 100 µl dodavanjem 12,5 µl 8 µM otopine HLM-a (količina koja odgovara 100 pmol enzima citokroma P450), 5 µl 50 mM otopine kalijevog fosfatnog pufera pH 7,4 pripremljenog prema protokolu Sohla i suradnika [60] i 67,5 µl ultra-čiste vode. Predinkubacijski korak u kojem se inkubacijska smjesa i NADPH-generirajući sustav (GS) sastavljen od vodenih otopina 0,1 M glukoza-6-fosfata (G6P), 10 mg/ml $NADP^+$ te 1 mg/ml glukoza-6-fosfat dehidrogenaze (G6PD) u tris-acetatnom puferu na pH 7,4 pripremljenom prema protokolu Sohla i suradnika [60] u omjeru 100:50:2 (*V/V/V*) odvojeno zagrijavaju na 37 °C na vodenoj kupelji s mehaničkim miješanjem provede se tijekom 3 minute. Nakon predinkubacijskog koraka, reakcija je pokrenuta dodavanjem 15 µl GS-a čime je ujedno i volumen smjese dopunjen do konačnih 100 µl. U negativnoj kontroli (slijepa proba) u ovom je koraku umjesto GS-a dodano 15 µl ultra-čiste vode. Nakon 15 minuta na 37 °C na vodenoj kupelji s mehaničkim miješanjem reakcija je zaustavljena dodatkom 60 µl smjese otapala sastavljene od acetonitrila i 25%-tne otopine klorovodične kiseline u omjeru 5:1 (*V/V*). Konačni volumen inkubacijske smjese nakon zaustavljanja reakcije bio je 160 µl, a koncentracija flavonoida 125 µM. Nakon zaustavljanja reakcije, inkubacijska smjesa centrifugirana je na 10 000 rpm[3] tijekom 10 minuta u centrifugi MiniSpin nabavljenoj od Eppendorf AG, Hamburg, Njemačka. Čisti supernatant prenesen je u HPLC vialu i analiziran na LC/MS-u. Cijeli proces shematski je sažeto prikazan na slici 10.

[3] Okretaja u minuti (engl. *rotations per minute*, rpm)



Slika 10. Shematski sažeti prikaz metodologije korištene za praćenje metabolizma flavonoida posredovanog humanim jetrenim citokromima P450.

3.5 Inkubacijska smjesa za ispitivanje metabolizma flavonoida posredovanog specifičnim rekombinantnim citokromima P450

Za svaki je flavonoid pojedinačno pripremljena 20 mM metanolna otopina. 100 µl ove otopine preneseno je u staklenu epruvetu i upareno do suha na vodenoj kupelji s mehaničkim miješanjem. Nakon uparavanja flavonoida, u istoj epruveti pripremljena je inkubacijska smjesa ukupnog volumena 100 µl dodavanjem 3 µl 1 µM otopine rekombinantnog citokroma P450 hiperekspimiranog u bakulosomima (količina koja odgovara 3 pmol enzima citokroma P450) (CYP1A2, CYP2A6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 ili CYP3A4), 5 µl 50 mM kalijevog fosfatnog pufera pH 7,4 pripremljenog prema protokolu Sohla i suradnika [60] i 77 µl ultra-čiste vode. Predinkubacijski korak u kojem se inkubacijska smjesa i NADPH-generirajući sustav (GS) (sastav GS-a opisan u poglavlju 3.4) odvojeno zagrijavaju na 37 °C na vodenoj kupelji s mehaničkim miješanjem provede se tijekom 3 minute. Nakon

predinkubacijskog koraka, reakcija je pokrenuta dodavanjem 15 µl GS-a čime je ujedno i volumen smjese dopunjen do konačnih 100 µl. U negativnoj kontroli (slijepa proba) u ovom je koraku umjesto GS-a dodano 15 µl ultra-čiste vode. Nakon 15 minuta na 37 °C na vodenoj kupelji s mehaničkim miješanjem reakcija je zaustavljena dodatkom 60 µl smjese otapala sastavljene od acetonitrila i 25%-tne otopine klorovodične kiseline u omjeru 5:1 (*V/V*). Konačni volumen inkubacijske smjese nakon zaustavljanja reakcije bio je 160 µl, a koncentracija flavonoida 125 µM. Nakon zaustavljanja reakcije, inkubacijska smjesa centrifugirana je na 10 000 rpm tijekom 10 minuta u centrifugi MiniSpin nabavljenoj od Eppendorf AG, Hamburg, Njemačka. Čisti supernatant prenesen je u HPLC vialu i analiziran na LC/MS-u. Cijeli proces shematski je sažeto prikazan na slici 10.

3.6 Inkubacijska smjesa za ispitivanje inhibicije metabolizma specifičnim inhibitorima citokroma P450

Metaboličke reakcije primijećene u inkubacijama s HLM-om koje na temelju eksperimenta s pojedinačnim rekombinantnim citokromima P450 nisu mogle biti pripisane nijednoj od ispitanih citokrom P450 enzima, karakterizirane su u inkubacijama odgovarajućih flavonoidnih aglikona s HLM-om u koje je dodan specifični inhibitor citokroma P450. Eksperiment je za svaki inhibitor proveden u triplikatu, a rezultati su statistički obrađeni kako bi se utvrdila značajnost primijećene razlike u količini nastalih metabolita između uzroka i slijepe probe. Pojedinačni rezultati ostatne aktivnosti statistički su obrađeni primjenom Studentovog *t*-testa s jednim krakom za dva uzorka jednakih varijanci korištenjem statističke funkcije T.TEST u programu Microsoft Excel 2010. Cilj je ovog eksperimenta posredno utvrditi koja je od ispitanih enzima citokroma P450 odgovorna za određenu metaboličku reakciju. Smanjen udio nastalih metabolita u inkubacijskoj smjesi s dodanim inhibitorom ili potpuno izostajanje reakcije u odnosu na slijepu probu u kojoj nije dodan inhibitor ukazuje na uključenost specifičnog citokroma P450 u kataliziranju te reakcije. Kako bi se mogla utvrditi koji je citokrom P450 odgovoran za određenu reakciju, za inhibiciju su odabrani takvi spojevi za koje je poznato da specifično inhibiraju samo jedan citokrom P450 pri korištenim koncentracijama. U ovom eksperimentu ispitani su flavonoidi 3,7-dihidroksiflavon i sakuranetin, a korišteni su sljedeći specifični inhibitori citokroma P450: 1 µM naftoflavon (CYP1A2), 50 µM kvercetin (CYP2C8), 5 µM sulfafenazol (CYP2C9), 20 µM omeprazol (CYP2C19), 2 µM kinidin (CYP2D6), 100 µM 4-metilpirazol (CYP2E1) i 2 µM ketokonazol (CYP3A4/5).

100 µl otopine flavonoida preneseno je u staklenu epruvetu s/bez inhibotora u količini potrebnoj da se postigne željena koncentracija i upareno do suha na vodenoj kupelji s mehaničkim miješanjem. Nakon uparavanja flavonoida, u istoj epruveti pripremljena je inkubacijska smjesa ukupnog volumena 100 µl dodavanjem 12,5 µl 8 µM otopine HLM-a (količina koja odgovara 100 pmol enzima citokroma P450), 5 µl 50 mM otopine kalijevog fosfatnog pufera pH 7,4 pripremljenog prema protokolu Sohla i suradnika [60] i 67,5 µl ultra-čiste vode. Predinkubacijski korak u kojem se inkubacijska smjesa i NADPH-generirajući sustav (GS) (sastav GS-a opisan u poglavlju 3.4) odvojeno zagrijavaju na 37 °C na vodenoj kupelji s mehaničkim miješanjem provede se tijekom 3 minute. Nakon predinkubacijskog koraka, reakcija je pokrenuta dodavanjem 15 µl GS-a čime je ujedno i volumen smjese dopunjen do konačnih 100 µl. Nakon 15 minuta na 37 °C na vodenoj kupelji s mehaničkim miješanjem reakcija je zaustavljena dodatkom 60 µl smjese otapala sastavljene od acetonitrila i 25%-tne otopine klorovodične kiseline u omjeru 5:1 (*V/V*). Konačni volumen inkubacijske smjese nakon zaustavljanja reakcije bio je 160 µl, a koncentracija flavonoida 125 µM. Nakon zaustavljanja reakcije, inkubacijska smjesa centrifugirana je na 10 000 rpm tijekom 10 minuta u centrifugi MiniSpin nabavljenoj od Eppendorf AG, Hamburg, Njemačka. Čisti supernatant prenesen je u HPLC vialu i analiziran na LC/MS-u. Cijeli proces shematski je sažeto prikazan na slici 10. Za svaki inhibitor pripremljene su po tri inkubacijske smjese s/bez inhibitora.

3.7 Enzimska kinetika

3.7.1 Inkubacijske smjese za ispitivanje metabolizma flavonoida posredovanog humanim jetrenim mikrosomima

Za procjenu kinetičkih parametara primijećenih metaboličkih reakcija posredovanih HLM-om pripremljen je niz otopina flavonoidnih aglikona različitih koncentracija razrijeđenjem 20 mM početne metanolne otopine. Pokriven je raspon koncentracija 2-200 µM (2-800 µM u eksperimentu s 3,7-dihidroksiflavonom i 7-hidroksiflavonom). Odgovarajući alikvoti preneseni su u staklene epruvete i upareni do suha na vodenoj kupelji s mehaničkim miješanjem. Nakon uparavanja flavonoida, u svakoj od epruveta pripremljena je inkubacijska smjesa ukupnog volumena 100 µl dodavanjem 12,5 µl 8 µM otopine HLM-a (količina koja odgovara 100 pmol enzima citokroma P450), 5 µl 50 mM otopine kalijevog fosfatnog pufera pH 7,4 pripremljenog prema protokolu Sohla i suradnika [60] i 67,5 µl ultra-čiste vode. Predinkubacijski korak u kojem se inkubacijska smjesa i generirajući sustav (GS) (sastav GS-a opisan u poglavlju 3.4) odvojeno zagrijavaju na 37 °C na vodenoj kupelji s mehaničkim

miješanjem trajao je 3 minute uz 50 rpm. Nakon predinkubacijskog koraka, reakcija je pokrenuta dodavanjem 15 µl GS-a čime je ujedno i volumen smjese dopunjen do konačnih 100 µl. Nakon 15 minuta na 37 °C na vodenoj kupelji s mehaničkim miješanjem reakcija je zaustavljena dodatkom 60 µl smjese otapala sastavljene od acetonitrila i 25%-tne otopine klorovodične kiseline u omjeru 5:1 (*V/V*). Konačni volumen inkubacijske smjese nakon zaustavljanja reakcije bio je 160 µl te je dobiven raspon koncentracija flavonoida 1,25-125 µM (1,25-500 µM u eksperimentu s 3,7-dihidroksiflavonom i 7-hidroksiflavonom). Nakon zaustavljanja reakcije, svaka je inkubacijska smjesa centrifugirana na 10 000 rpm tijekom 10 minuta u centrifugi MiniSpin nabavljenoj od Eppendorf AG, Hamburg, Njemačka. Čisti supernatant prenesen je u HPLC vialu i analiziran na LC/MS-u.

3.7.2 Inkubacijske smjese za ispitivanje metabolizma flavonoida posredovanog specifičnim rekombinantnim citokromima P450

Za procjenu kinetičkih parametara primijećenih metaboličkih reakcija posredovanih specifičnim rekombinantnim citokromima P450 pripremljen je niz otopina flavonoidnih aglikona različitih koncentracija razrijeđenjem 20 mM početne metanolne otopine. Pokriven je raspon koncentracija 2-200 µM. Odgovarajući alikvoti preneseni su u staklene epruvete i upareni do suha na vodenoj kupelji s mehaničkim miješanjem. Nakon uparavanja flavonoida, u svakoj od epruveta pripremljena je inkubacijska smjesa ukupnog volumena 100 µl dodavanjem 3 µl (10 µl u eksperimentu sa 7-hidroksiflavonom u kombinaciji s CYP3A4 i CYP2D6 te u eksperimentu s galanginom u kombinaciji s CYP2C19) 1 µM otopine rekombinantnog citokroma P450 hiperekspimiranog u bakulosomima (količina koja odgovara 3 pmol (10 pmol) enzima citokroma P450), 5 µl 50 mM otopine kalijevog fosfatnog pufera pH 7,4 pripremljenog prema protokolu Sohla i suradnika [60] i 77 µl ultra-čiste vode. Predinkubacijski korak u kojem se inkubacijska smjesa i generirajući sustav (GS) (sastav GS-a opisan u poglavlju 3.4) odvojeno zagrijavaju na 37 °C na vodenoj kupelji s mehaničkim miješanjem trajao je 3 minute uz 50 rpm. Nakon predinkubacijskog koraka, reakcija je pokrenuta dodavanjem 15 µl GS-a čime je ujedno i volumen smjese dopunjen do konačnih 100 µl. Nakon 15 minuta na 37 °C na vodenoj kupelji s mehaničkim miješanjem reakcija je zaustavljena dodatkom 60 µl smjese otapala sastavljene od acetonitrila i 25%-tne otopine klorovodične kiseline u omjeru 5:1 (*V/V*). Konačni volumen inkubacijske smjese nakon zaustavljanja reakcije bio je 160 µl te je dobiven raspon koncentracija flavonoida 1,25-125 µM. Nakon zaustavljanja reakcije, svaka je inkubacijska smjesa centrifugirana na 10 000 rpm

tijekom 10 minuta u centrifugi MiniSpin nabavljenoj od Eppendorf AG, Hamburg, Njemačka. Čisti supernatant prenesen je u HPLC vialu i analiziran na LC/MS-u.

3.7.3 Izračun parametara enzimske kinetike

Za izračun glavnih parametara enzimske kinetike, K_m and V_{max} vrijednosti prema nelinearnoj regresiji iz Michaelis-Menteničine jednadžbe (1), korištene su brzine reakcija (količina nastalog produkta u jedinici vremena) i koncentracije supstrata (ispitivani flavonoidni aglikon). Eksperimentalni podaci slijedili su Michaelis-Menteničinu kinetiku čiji su parametri određeni pomoću statističkog programa R 3.4.1 i ne-linearne metode najmanjih kvadrata [61].

$$V = \frac{V_{\mathrm{max}} * S}{K_{\mathrm{m}} + S} \qquad (1)$$

gdje je V eksperimentalno dobivena brzina metabolizma flavonoida [pM min^{-1}], S koncentracija flavonoida [μM], V_{max} najveća brzina metabolizma flavonoida, a K_m koncentracija pri kojoj je postignuta ½ V_{max}. Dodatno je izračunat i parametar k_{cat}/K_m i njegova stadradna pogreška koristeći se tzv. „propagate“ knjižnicom u programu R 3.4.12 [62]. Izračunata vrijednost V_{max} podijeljena je koncentracijom enzima citokroma P450 korištenom u eksperimentu i dobivena je konstanta brzine katalize (k_{cat}) [pM min^{-1} pM^{-1} CYP-a ili pmol/min/pmol CYP-a ili min^{-1}]. U ovom su radu pri izražavanju konstante brzine katalize (k_{cat}) korištene jedinice pM min^{-1} pM^{-1} CYP-a. Na kraju je za svaku reakciju izračunata i konstanta specifičnosti definirana omjerom k_{cat}/K_m (ili V_{max}/K_m podijeljen koncentracijom enzima) [10^6 M^{-1} min^{-1}].

3.7.4 Primjer pripreme otopina za eksperimente s enzimskom kinetikom i izračun koncentracija supstrata

POČETNA OTOPINA flavonoida pojedinačni (20 mM = 20000 μM)

Izvaže se odgovarajuća količina flavonoida i otopi u odgovarajućem volumenu otapala tako da konačna koncentracija otopine bude 20 mM.

Otapalo: Metanol (ili DMSO)

c = 20 mM = 20000 μM u metanolu

γ = 0,02 mol/l × 300 g/mol → 6 g/l (/1000 (mg) ×1000 (ml)) [4]

γ = 6 mg/ml u metanolu

POČETNA OTOPINA flavonoida pojedinačni (0,2 mM = 200 μM)

10 μl *POČETNE OTOPINE (20 mM)* + 990 μl *metanola* (1000 μl = 1 ml)

POČETNA OTOPINA flavonoida pojedinačni (0,02 mM = 20 μM)

10 μl *POČETNE OTOPINE (200 μM)* + 90 μl *metanola* (100 μl = 0,1 ml)

INKUBACIJSKA SMJESA HLM (100 μl)

Maksimalna koncentracija c (flavonoid) = 200 μM:

100 μl *POČETNE OTOPINE (200 μM)* u praznu epruvetu → upari se do suha na vodenoj kupelji → Pripremi se inkubacijska smjesa od **100 μl** u epruveti u kojoj je prethodno uparen flavonoid dodavanjem:

+ 12,5 μl 8 μM HLM (100 pmol enzima)

+ 5 μl 50 mM kalijev fosfat pufer pH 7,4

+ 67,5 μl H_2O

+ 15 μl GS (15%; GS se sastoji od 100 μl G6P + 50 μl $NADP^+$+ 2 μl G6PD)

c = 0,2 mM × (100 (~~μl~~)/100 (~~μl~~)) = 200 μM

γ = 0,0002 mol/l × 300 g/mol → 0,06 g/l (/1000 (mg) ×1000 (ml))

γ = 0,06 mg/ml (×1000 (μg)) = 60 μg/ml = 60 ppm

OTOPINA ZA ANALIZU (160 μl)

U inkubacijsku smjesu (100 μl) doda se 60 μl otapala za zaustavljanje reakcije (acetonitril:20%-tni HCl = 5:1) . Konačni volumen: **160 μl**.

c = 0,2 mM × (100 (~~μl~~)/160 (~~μl~~)) = 0,125 mM =125 μM

γ = 0,000125 mol/l × 300 g/mol → 0,0375 g/l (/1000 (mg) ×1000 (ml))

γ = 0,0375 mg/ml (×1000 (μg)) = 37,5 μg/ml = 37,5 ppm

10% metabolita: 3,75 ppm

1% metabolita: 0,375 ppm

[4] U pretvaranju molarnih i masenih koncentracija za prosječnu molarnu masu flavonoida uzeta je vrijednost 300 g/mol.

Minimalna koncentracija *c* (flavonoid) = 2 μM:

10 μl *POČETNE OTOPINE (20 μM)* u praznu epruvetu → upari se do suha na vodenoj kupelji → pripremi se inkubacijska smjesa od **100 μl** u epruveti u kojoj je prethodno uparen flavonoid dodavanjem:

+ 12,5 μl 8 μM HLM (100 pmol enzima)

+ 5 μl 50 mM kalijev fosfat pufer pH 7,4

+ 67,5 μl H_2O

+ 15 μl GS (15%; GS se sastoji od 100 μl G6P + 50 μl $NADP^+$+ 2 μl G6PD)

c = 0,02 mM × (10 (~~μl~~)/100 (~~μl~~)) = 0,002 mM = 2 μM

γ = 0,000002 mol/l × 300 g/mol → 0,0006 g/l (/1000 (mg) ×1000 (ml))

γ = 0,0006 mg/ml = 0,6 μg/ml = 0,6 ppm

OTOPINA ZA ANALIZU (160 μl)

U inkubacijsku smjesu (100 μl) doda se 60 μl otapala za zaustavljanje reakcije (acetonitril:20%-tni HCl = 5:1) . Konačni volumen: **160 μl**.

c = 2 μM ×(100 (~~μl~~)/160 (~~μl~~)) = 1,25 μM

γ = 0,00000125 mol/l × 300 g/mol → 0,000375 g/l (/1000 (mg) ×1000 (ml))

γ = 0,000375 mg/ml (×1000 (μg)) = 0,375 μg/ml = 0,375 ppm (approx. 0,4 ppm)

10% metabolita: approx. 0,04 ppm (40 ppb)

1% metabolita: approx. 0,004 ppm (4 ppb)

3.8 HPLC/Q-TOF-MS analiza

LC/MS analize provedene su na HPLC sustavu Agilent 1200 RR (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka) povezanom s detektorom masa Agilent 6530 Accurate Mass Q-TOF LC/MS (Agilent Tehcnologies, Waldbronn, Germany) koji koristi elektrosprej ionizacijsko (engl. *electrospray ionization*, ESI) sučelje. Za odjeljivanje u HPLC-u korištena je kolona Poroshell EC-C18 column (100×3.0 mm i.d., 2.7 μm veličine čestica, Agilent) termostatirana na 40 °C. Brzina protoka postavljena je na 0,4 ml/min, a volumen injektiranja bio je 5 μl. Mobilna faza A sastojala se od vode, metanola i mravlje kiseline u omjeru 93:5:2 (*V*/*V*/*V*) dok je omjer istih komponenti u mobilnoj fazi B iznosio 3:95:2 (*V*/*V*/*V*). Primijenjeno je gradijentno ispiranje prema sljedećoj utvrđenoj shemi: 0 min, 40% B; 14 min, 80% B; 15 min, 80% B; 16 min, 40% B; 20 min, 40% B. UV detektor namješten je na 350 nm. Prikupljanje podataka u MS-u provedeno je u MS High Resolution načinu rada (Low 1700 m/z, 4GHz,

HiRes), a brzina snimanja podešena je na 1 scan/s[5]. Dual Agilent Jet Stream (AJS) ESI izvor (engl. *source*) postavljen je u način rada koji producira pozitivno nabijene ione (engl. *positive ionization mode*), a spektri masa snimljeni su u rasponu *m/z* 100-1000. Operativni uvjeti rada MS detektora bili su sljedeći: „drying gas flow“ bio je 8 l/min pri 40 psi „nebulizer gas pressure“ i „drying gas temperature“ na 200 °C, „sheath gas flow“ bio je 11 l/min uz „sheath gas temperature“ koja je postavljena na 300 °C. Analizator masa s vremenom leta (engl. *time-of-flight*, TOF) korišten je uz sljedeće postavke: voltaže fragmentora, „skimmer“-a i oktapola iznosile su redom 175 V, 65 V i 750 V. Svi podaci prikupljeni su i obrađeni pomoću programskog paketa Agilent MassHunter Workstation (Agilent Technologies, Sjedinjene Američke Države). Identifikacija metabolita temeljila se na usporedbi točne molekularne mase (engl. *accurate molecular mass*) i vremena zadržavanja metabolita u odnosu na poredbenu otopinu. Kvantifikacija detektiranih metabolita napravljena je na temelju signala izmjerenih UV detektorom metodom normalizacije. Proces identifikacije detaljnije je opisan u poglavlju 4.2.

3.8.1 LC-MS metoda za ispitivanje metabolizma flavonoida

HPLC uvjeti:

Kolona: Poroshell 120 EC-C18, 100×3,0 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

[5] Detektor snima jedan MS spektar u sekundi

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

3.9 Prediktivni statstički modeli

3.9.1 Statistička analiza

Za utvrđivanje statistički značajnih molekulskih deskriptora (prisutnost supstituenata i fizičko-kemijska svojstva), koji određuju karakteristike metabolizma flavonoida posredovanog humanim citokromima P450 [63], korišten je statistički program R 3.4.4 [64] u programskom paketu RStudio 1.1.447 [65]. Mjera statističke značajnosti je vrijednost *p*: vrijednosti *p* manje od 0,05 smatraju se statistički značajnima u ovom radu.

3.9.2 Sidrenje

Kako bi se ispitalo vezanje flavonoida na vezno mjesto citokroma P450 1A2, za ispitivanje sidrenja odabrani su akacetin i njegov metabolit apigenin. Sidrenje je provedeno računalnim programom AutoDock 4.2.6. (The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA) [66] koji koristi disperziju, vodikove veze, elektrostatske i desolvatacijske komponente za određivanje najvjerojatnije konformacije kompleksa. Trodimenzijske koordinate molekule citokroma P450 1A2 ko-kristalizirane s alfa-naftoflavonom dobivene su iz RCSB Protein Data Bank [67]. Ova je kristalografska struktura odabrana zbog sličnosti alfa-naftoflavona s odabranim supstratima (flavonoidnim aglikonima) u ovom radu, a ima i zadovoljavajuću rezoluciju od 1,95 Å. Proteinska molekula je pripremljena za sidrenje dodavanjem atoma koji nedostaju u bočnim lancima te atoma vodika gdje je bilo potrebno. Svi lizinski, argininski, histidinski i cisteinski bočni lanci su bili protonirani, aspartatni i glutamatni bočni lanci deprotonirani, dok su amino- i karboksilni krajevi lanaca bili nabijeni. Budući da je molekula vode (HOH 733) prisutna u strukturi kompleksa u blizini alfa-naftoflavona u veznom mjestu, sidrenje je provedeno s uklonjenim svim molekulama vode te s uklonjenim svim molekulama vode osim HOH 733. Trodimenzionalni oblici liganada su nacrtani i njihova je inicijalna geometrija bila određena u računalnom programu HyperChem 8.0 (Hypercube, Inc., Gainesville, FL, USA), a njihov je naboj postavljen tako da predstavlja njihove najzastupljenije specije pri pH 7,4 (izračunato na chemicalize.com). Pri pH 7,4 akacetin-7-anion predstavlja 65,49%, a molekula akacetina 11,44% ukupnih specija akacetina. Kod apigenina zastupljenost je iznosila 62,53% za apigenin-7-anion, a 10,92% za molekulu apigenina. U oba slučaja su sidrene obje specije zbog toga što postotak specije molekula oštro raste smanjenjem pH, što se događa u intrahepatičkim uvjetima [68]. Parcijalni naboji flavonoidnih liganada postavljeni su prema Ionescu i suradnicima [69]. Mreža veličine 70 × 70 × 70 Å s razmakom između pojedinih točaka od 0,375 Å i centrirana u šupljini veznog mjesta CYP1A2 (koordinate 4,0, 12,0, 23,0)

generirana je pomoću programa AutoGrid u AutoDock-u [66]. U postupku sidrenja bio je primijenjen lamarkijanski genetski algoritam (engl. *lamarckian genetic algorithm*, LGA) [70]. Molekula CYP1A2 tretirana je kao rigidna dok je svim jednostrukim vezama liganada bila dozvoljena rotacija tijekom postupka Monte Carlo simuliranog traženja globalnog minimuma (engl. *simulated annealing*, SA). Sidrenje svih liganada provedeno je 100 puta, s populacijom veličine 150, maksimalnim brojem procjena energije od $2{,}5 \times 10^7$, 27 000 generacija, učestalošću mutacije od 0,02 te učestalošću krosovera od 0,08. Korijen srednje kvadratne devijacije (engl. *root-mean-square-deviation*, RMSD) od 2,0 Å uzet je kao kriterij za analizu grozdova rezultata sidrenja (s ciljem utvrđivanja jesu li dvije usidrene konformacije dovoljno slične da bi bile smatrane jednakima). Prvo je provedeno sidrenje alfa-naftoflavona u prisutnosti i odsutnosti HOH 733 u svrhu provjere prikladnosti sustava, a nakon toga je provedeno sidrenje specija akacetina i apigenina, također u prisutnosti i odsutnosti HOH 733.

4 REZULTATI

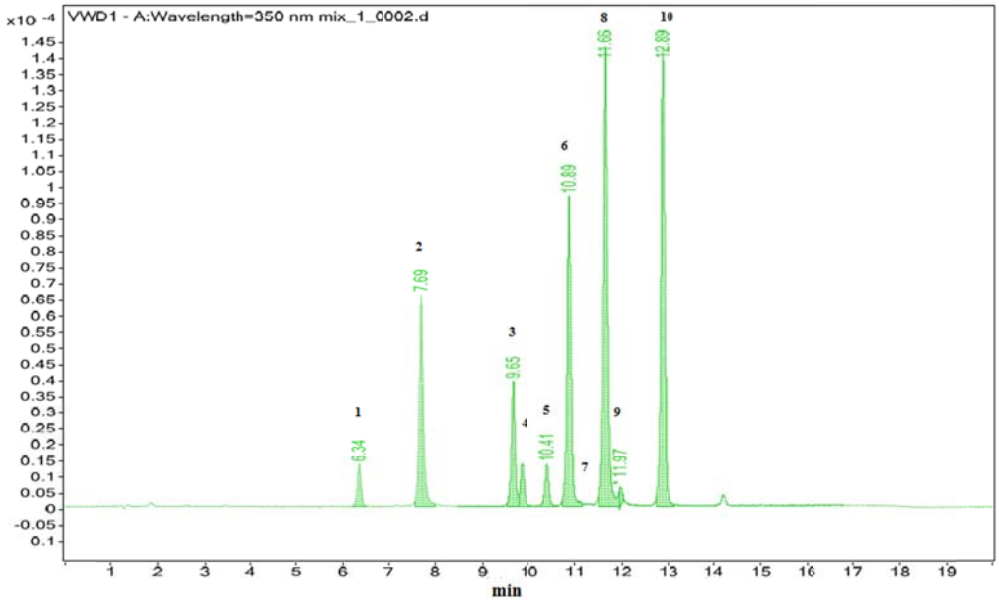
4.1 Razvoj LC/MS metode za identifikaciju i određivanje metabolita aglikona odabranih flavonoida

Razvoj LC/MS metode za identifikaciju i određivanje metabolita aglikona odabranih flavonoida temeljio se na optimizaciji HPLC metode korištene za analizu fenolnih kiselina i flavonoida u različitim uzorcima vina i propolisa, koja je objavljena i opisana u literaturi [71,72]. Metoda je odabrana prvenstveno zbog svog širokog separacijskog prozora i sastava mobilnih faza pogodnog za analizu s MS detektorom. Zbog duljine vremena kromatografiranja i relativno velike brzine protoka morala je biti dalje optimizirana za korištenje u svrhu praćenja metabolizma odabranih flavonoida.

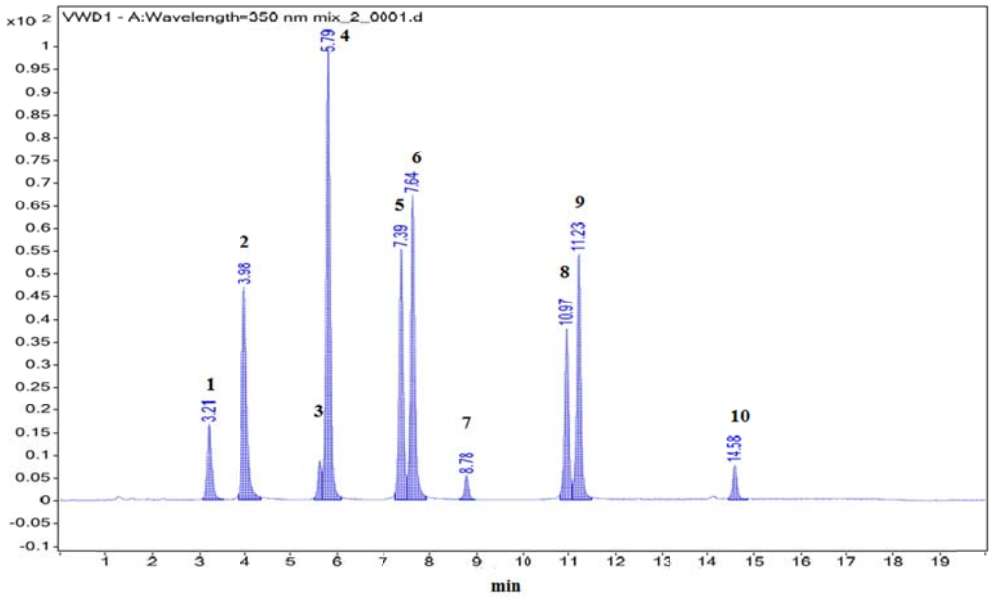
Sastav mobilnih faza nije mijenjan budući da se pokazao optimalnim obzirom na intenzitet signala iona nakon ionizacije u ESI-izvoru u optimiziranim uvjetima. Udio mravlje kiseline, aditiva u mobilnim fazama koji, osim povoljnog utjecaja na odjeljivanje u kromatografiji, ovisno o koncentraciji može pozitivno ili negativno utjecati na ionizaciju u ESI-izvorima, variran je u rasponu 0,1-2% (*V*/*V*) u mobilnoj fazi. Iako je u literaturi opisana supresija ionizacije u ESI-izvoru povećanjem koncentracije mravlje kiseline u mobilnoj fazi u rasponu 0,05-1% [73], osjetljivost mjerena intenzitetom signala iona flavonoida nakon ionizacije u ESI-izvoru u ispitanim uvjetima najveća je bila upravo pri koncentraciji 2%. Očigledno je da udio aditiva u mobilnoj fazi nije jedini izvor supresije ionizacije u ESI-izvoru, budući da u su literaturi opisani slučajevi najveće supresije [74] i najveće osjetljivosti [75] ionizacije pri istoj koncentraciji mravlje kiseline (0,5%) u analizi flavonoida. Dodatno, opisano je i više primjera uspješnih LC/ESI-MS analiza flavonoida u grožđu i vinu u kojima je koncentracija mravlje kiseline u mobilnim fazama premašivala 1%, do najviše zabilježene koncentracije od 10% [76].

Dulja kolona tipa C18 dimenzija 250×4,6 mm punjena 5 µm-skim poptuno poroznim česticama (engl. *fully porous particle*) korištena u inicijalnoj metodi zamijenjena je modernijom kolonim istog tipa (C18), ali znatno kraćih dimenzija pogodnih za analizu na detektoru masa (100×3,0 mm) i punjenu česticama s neporoznom jezgrom (engl. *core-shell particle*) veličine 2,7 µm. U skladu s ovom promjenom, smanjena je brzina protoka s 1 ml/min na 0,4 ml/min, smanjen volumen injektiranja s 20 µl na 5 µl, te prilagođen program gradijentnog ispiranja kako je opisano u poglavlju 3.8. Ukupno vrijeme analize smanjeno je s inicijalnih 85 min na 20 min uključujući i vrijeme kondicioniranja od četiri minute vraćanjem na početne uvjete gradijentnog ispiranja.

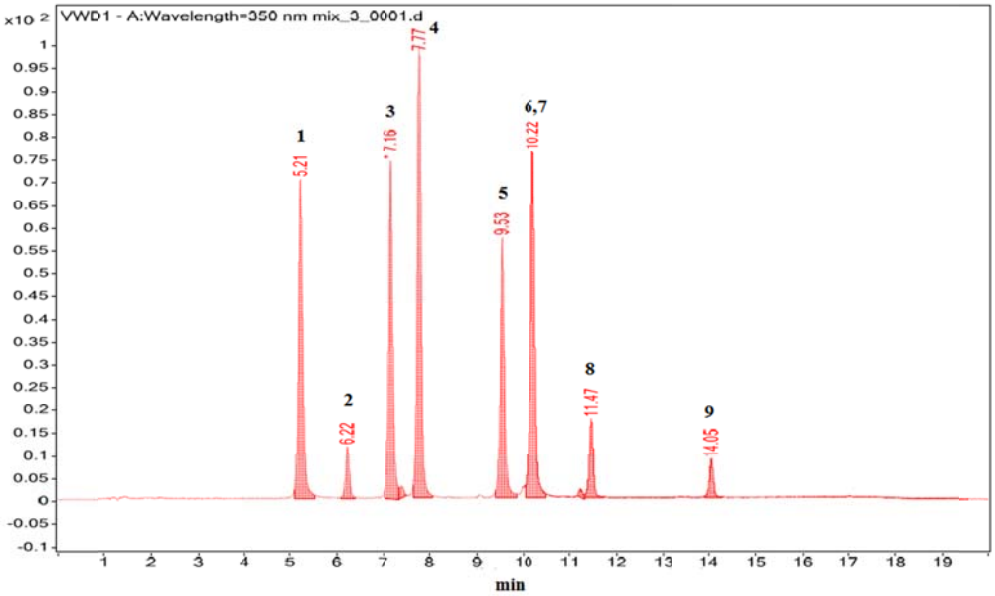
Trideset odabranih flavonoida grupirano je u tri grupe po deset pri čemu u nijednoj od grupa nije bilo strukturnih izomera, tj. spojeva iste molekularne mase. Program gradijentnog ispiranja prilagođen je tako da se dobije optimalno odjeljivanje u sve tri grupe smjesa odabranih flavonoida te da bude omogućena brza i jednostavna detekcija i kvantifikacija odabranih flavonoida i njihovih metabolita. Nakon završnog optimiziranja LC/MS metode, snimljeni su tipični UV-kromatogrami svake od ovih grupa flavonoida i prikazani na slikama 11, 12 i 13.



Slika 11. Tipični kromatogram smjese prve grupe 10 odabranih flavonoida različitih molekularnih masa koncentracije 9 µl/ml, tj. 9 ppm. Flavonoidi su označeni prema redosljedu elucije: 1 = hesperetin, 2 = izoramnetin, 3 = 6-hidroksiflavon, 4 = sakuranetin, 5 = prunetin, 6 = krizin, 7 = flavon (detektiran samo na MS detektoru, vrijeme zadržavanja (engl. *retention time*, RT) = 11,13 min), 8 = galangin, 9 = flavanon, 10 tangeretin.



Slika 12. Tipični kromatogram smjese druge grupe 10 odabranih flavonoida različitih molekularnih masa koncentracije 9 µl/ml, tj. 9 ppm. Flavonoidi su označeni prema redosljedu elucije: 1 = miricetin, 2 = morin, 3 = naringenin, 4 = luteolin, 5 = apigenin, 6 = tamariksetin, 7 = 7-hidroksiflavon, 8 = 3,6-dihidroksiflavon, 9 = akacetin, 10 tektokrizin.

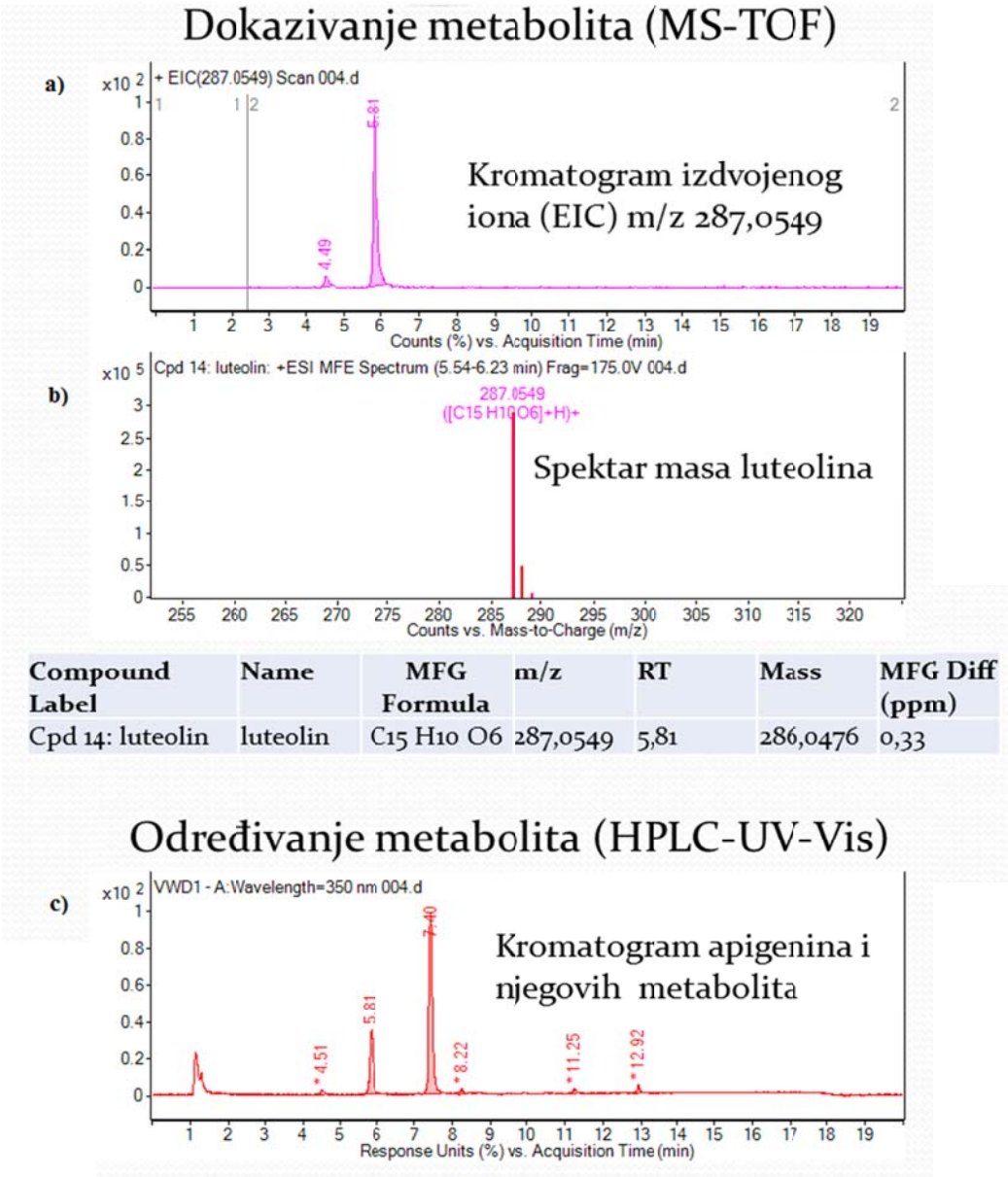


Slika 13. Tipični kromatogram smjese treće grupe 10 odabranih flavonoida različitih molekularnih masa koncentracije 9 µl/ml, tj. 9 ppm. Flavonoidi su označeni prema redosljedu elucije: 1 = kvercetin, 2 = genistein, 3 = kemferol, 4 = diosmetin, 5 = ramnetin, 6 = pinocembrin (RT na MS detektoru 10,11 min), 7 = 3,7-dihidroksiflavon (RT na MS detektoru 10,22 min), 8 = krizindimetileter, 9 = pinocembrin-7-metileter. Katehin nije detektiran.

4.2 Izrada baze podataka za identifikaciju odabranih flavonoida i njihovih metabolita

Obzirom na dobro odjeljivanje i kromatografsku izvedbu karakteriziranu uskim vrhovima i velikom učinkovitošću prikupljeni su kvalitetni podaci na MS detektoru. TOF analizator omogućio je određivanje točne mase i izračun molekulske formule za detektirane ione flavonoida na temelju njihovog specifičnog izotopnog obrasca. Obzirom da su se u svakoj grupi od po 10 flavonoida razlikovale njihove teoretske molekularne mase, svaki od odabranih flavonoida lako je identificiran na temelju kombiniranih podataka prikupljenih iz UV- i MS-detektora o vremenu zadržavanja te o točnoj masi. Kombinacijom ovih podataka dobivenih analizom poredbenih otopina odabranih flavonoida pomoću prikladnog softvera opisanog u poglavlju 3.8 kreirana je njihova baza podataka koja je dalje korištena za identifikaciju istih te za provjeru prikladnosti LC/MS sustava prije svake analize. Ova baza podataka nadograđivana je tijekom eksperimenta novim standardima metabolita redom kako su otkrivani i nabavljani od certificiranih dobavljača. Pretpostavljeni spojevi metabolita koji nisu bili komercijalno dostupni nisu do kraja identificirani, već su na temelju utvrđene razike u masi između supstrata i nastalog metabolita karakterizirani do razine poznavanja vrste metaboličke reakcije koja se zbila i utvrđivanja njegove molekulske formule. Dodatno je za svaki metabolit snimljen niz MS/MS spektara pri različitim enegrijama u kolizijskoj ćeliji (engl. *collision cell)* na temelju kojih je bilo moguće utvrditi na kojem se prstenu flavonoidnog skeleta zbila reakcija. Točne sutrukture nepoznatih metabolita za koje nisu bili komercijalno dostupni standardi nije bilo moguće utvrditi samo na temelju MS i MS/MS podataka. Literaturni podaci potvrđuju ovakav zaključak u slučaju ove skupine spojeva u radovima koje su proveli Tsimogiannis i suradnici [77] te Cuyckens i Claeys [74].

Na slici 14 dan je primjer tijeka procesa prikupljanja podataka iz LC/MS analize za kreiranje baze podataka i identifikaciju apigenina i njegovog metabolita luteolina (vidi poglavlje 4.3.4). A na slici 15 prikazana je konačna baza podataka odabranih flavonoida i njihovih metabolita s pohranjenim spektralnim podacima na temelju kojih se provodila identifikacija komponenti iz inkubacijskih smjesa u svim eksperimentima.



Slika 14. Metodologija identifikacije i određivanja metabolita. Podaci koji su pohranjeni u bazu podataka odabranih flavonoida i njihovih metabolita: vrijeme zadržavanja na koloni, točna masa, molekulska formula. Na slici je dan primjer identifikacije metabolita apigenina. Kromatogram na slici c) upućuje na dominantan metabolit s vremenom zadržavanja (RT) 5,81 min. Na slici b) prikazan je spektar masa vrha na RT 5,81 min, a na slici a) kromatogram izdvojenog odgovarajućeg iona na istoj retenciji. Na temelju usporedbe ovih podataka s podacima čistih standarada pohranjenima u bazi podataka odabranih flavonoida i njihovih metabolita nepoznati je metabolit softverski identificiran kao luteolin. Određivanje metabolita provedeno je pomoću HPLC-UV-Vis detektora.

PCDL: D:\MassHunter\PCDL\flavonoidi.cdb

Compound Name	Formula	Mass	Anion	Cation	RT (min)	CAS	ChemSpider	IUPAC Name	Num Spectra
myricetin	C15H10O8	318.03757			3.380				0
morin	C15H10O7	302.04265			4.150				0
eriodictyol	C15H12O6	288.06339			4.210				0
orobol	C15H10O6	286.04774			4.450				0
quercetin	C15H10O7	302.04265			5.370				0
7,4'-dihydroxyflavone	C15H10O4	254.05791			5.400				0
3,7,4'-trihydroxyflavone	C15H10O5	270.05282			5.640				0
naringenin	C15H12O5	272.06847			5.770				0
7,8-dihydroxyflavone	C15H10O4	254.05791			5.920				0
luteolin	C15H10O6	286.04774			5.960				0
genistein	C15H10O5	270.05283			6.380				0
hesperetin	C16H14O6	302.07904			6.510				0
cajanin	C16H12O6	300.06339			6.560				0
kaempferol	C15H10O6	286.04774			7.320				0
norwogonin	C15H10O5	270.05282			7.500				0
apigenin	C15H10O5	270.05283			7.560				0
tamarixetin	C16H12O7	316.05830			7.800				0
isorhamnetin	C16H12O7	316.05830			7.860				0
6,7-dihydroxyflavone	C15H10O4	254.05791			7.880				0
diosmetin	C16H12O6	300.06339			7.940				0
5,3',4'-trihydroxy-7-methoxyflavanone	C16H14O6	302.07904			8.140				0
4'-hydroxyflavone	C15H10O3	238.06299			8.510				0
santal	C16H12O6	300.06339			8.540				0
baicalein	C15H10O5	270.05282			8.630				0
7-hydroxyflavone	C15H10O3	238.06300			8.950				0
rhamnetin	C16H12O7	316.05830			9.690				0
6-hydroxyflavone	C15H10O3	238.06300			9.820				0
sakuranetin	C16H14O5	286.08412			10.020				0
pinocembrin	C15H12O4	256.07356			10.280				0
3,7-dihydroxyflavone	C15H10O4	254.05791			10.390				0
2'-hydroxyflavone	C15H10O3	238.06299			10.510				0
prunetin	C16H12O5	284.06847			10.580				0
chrysin	C15H10O4	254.05791			10.890				0
3,6-dihydroxyflavone	C15H10O4	254.05791			11.140				0
flavone	C15H10O2	222.06808			11.290				0
acacetin	C16H12O5	284.06847			11.400				0
chrysin-dimethyleter	C17H14O4	282.08921			11.630				0
galangin	C15H10O5	270.05282			11.820				0
flavanone	C15H12O2	224.08373			12.140				0
tangeritin	C20H20O7	372.12090			13.050				0
pinocembrin-7-methylether	C16H14O4	270.08921			14.220				0
techtochrysin	C16H12O4	268.07356			14.750				0

Slika 15. Slika tablice iz baze podataka odabranih flavonoida i njihovih metabolita sa spektralnim podacima na temelju kojih su identificirani u inkubacijskim smjesama. Preuzeto iz programskog paketa Agilent MassHunter Workstation (Agilent Technologies, Sjedinjene Američke Države).

4.3 Probir aglikona flavonoida na temelju metabolizma s humanim jetrenim mikrosomima

Probir odabranih flavonoidnih aglikona koji pokazuju metabolizam posredovan humanim jetrenim citokromima P450 napravljen je u eksperimentima s HLM-om. Inkubacije flavonoida s enzimima u HLM-u pripremljene su i analizirane kako je opisano u poglavlju 3.4. Metaboličke promjene primijećene su u 15 od 30 analiziranih flavonoida (slika 16).

Br.	Flavonoid
1	3,6-dihidroksiflavon
2	3,7-dihidroksiflavon
3	6-hidroksiflavon
4	7-hidroksiflavon
5	akacetin
6	apigenin
7	diosmetin
8	flavanon
9	flavon
10	galangin
11	genistein
12	hesperetin
13	izoramnetin
14	kemferol
15	katehin
16	krizin
17	krizindimetileter
18	kvercetin
19	luteolin
20	miricetin
21	morin
22	naringenin
23	pinocembrin
24	pinocembrin-7-metileter
25	prunetin
26	ramnetin
27	sakuranetin
28	tamariksetin
29	tangeretin
30	tektokrizin

HLM

Br.	Flavonoid	HLM (LC-MS)
1	3,6-dihidroksiflavon	/
2	3,7-dihidroksiflavon	DA
3	6-hidroksiflavon	/
4	7-hidroksiflavon	DA
5	akacetin	DA
6	apigenin	DA
7	diosmetin	DA
8	flavanon	/
9	flavon	DA
10	galangin	DA
11	genistein	DA
12	hesperetin	DA
13	izoramnetin	/
14	kemferol	DA
15	katehin	/
16	krizin	DA
17	krizindimetileter	/
18	kvercetin	/
19	luteolin	/
20	miricetin	/
21	morin	/
22	naringenin	DA
23	pinocembrin	/
24	pinocembrin-7-metileter	/
25	prunetin	DA
26	ramnetin	/
27	sakuranetin	DA
28	tamariksetin	/
29	tangeretin	DA
30	tektokrizin	/

Slika 16. Probir aglikona flavonoida na temelju metabolizma s HLM-om. Zeleno ispunjeni retci označavaju flavonoide kod kojih je primijećen nastanak metabolita djelovanjem humanih jetrenih citokroma P450.

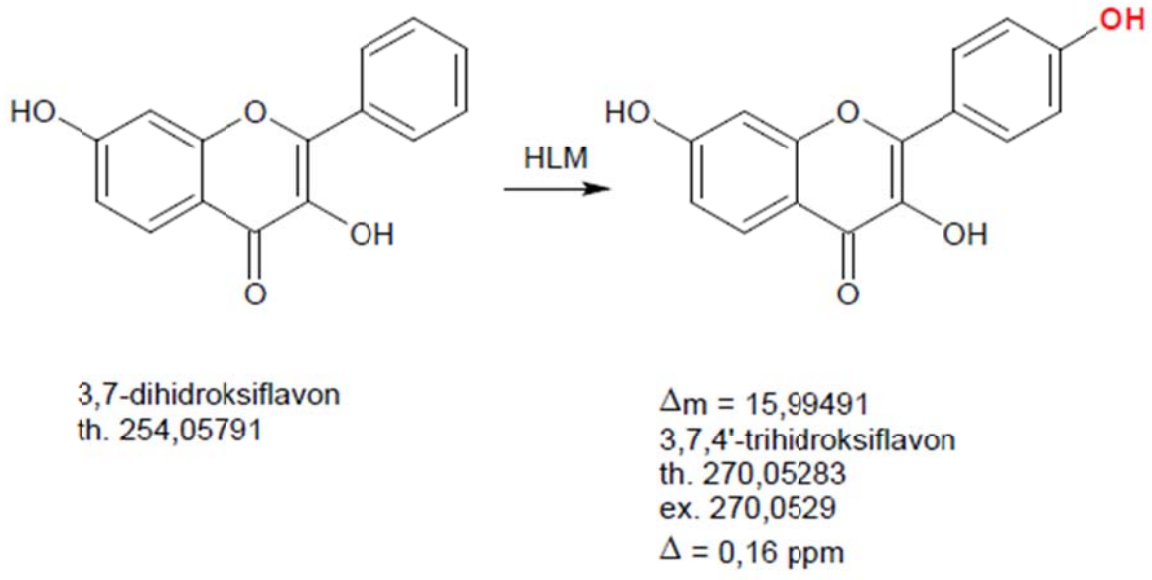
Detektirani metaboliti nastali su reakcijama aromatske hidroksilacije ili *O*-demetilacije ili kombinacijom ovih reakcija. U inkubacijama sa 6-hidroksiflavonom zabilježena je promjena mase od 2,015645 Da (unificirana jedinica atomske mase) i na temelju MS podataka izračunata molekulska formula $C_{15}H_{12}O_3$. Ovi podaci upućuju na moguću reakciju

hidrogenacije – zasićenja dvostruke veze u strukturi molekule, tj. adicije dva atoma vodika. Najvjerojatnije mjesto hidrogenacije je dvostruka veza C2=C3 na prstenu C u strukturi flavonoida, pri čemu nastaje 6-hidroksiflavanon. Moguće je i da je došlo do pucanja prstena C pri čemu nastaje odgovarajući kalhon (eng. *chalchone*). Također je zabilježena i promjena mase od –15,99491 Da i na temelju MS podataka izračunata molekulska formula $C_{15}H_{12}O_2$. Ovi podaci upućuju na pucanje prstena C i nastajanje odgovarajućeg analoga kalhona. Obje ove reakcije primijećene su već u inkubacijama bez dodanog generirajućeg sustava, dakle u slijepim probama. Budući da zabilježene iste promjene u inkubacijama s dodanim generirajućim sustavom nisu mogle jednoznačno biti pripisane djelovanju enzima citokroma P450, a ostale promjene koje se mogu pripisati djelovanju citokroma P450 nisu se odnosile na ishodišni odabrani flavonoid 6-hidroksiflavon, rezultati metabolizma 6-hidroksiflavona nisu uzeti u daljnje razmatranje.

U nastavku slijede rezultati metabolizma posredovanog HLM-om za 15 flavonoidnih aglikona kod kojih je primijećeno formiranje metabolita i to redom za: 3,7-dihidroksiflavon, 7-hidroksiflavon, akacetin, apigenin, diosmetin, flavon, galangin, genistein, hesperetin, kemferol, krizin, naringenin, prunetin, sakuranetin i tangeretin.

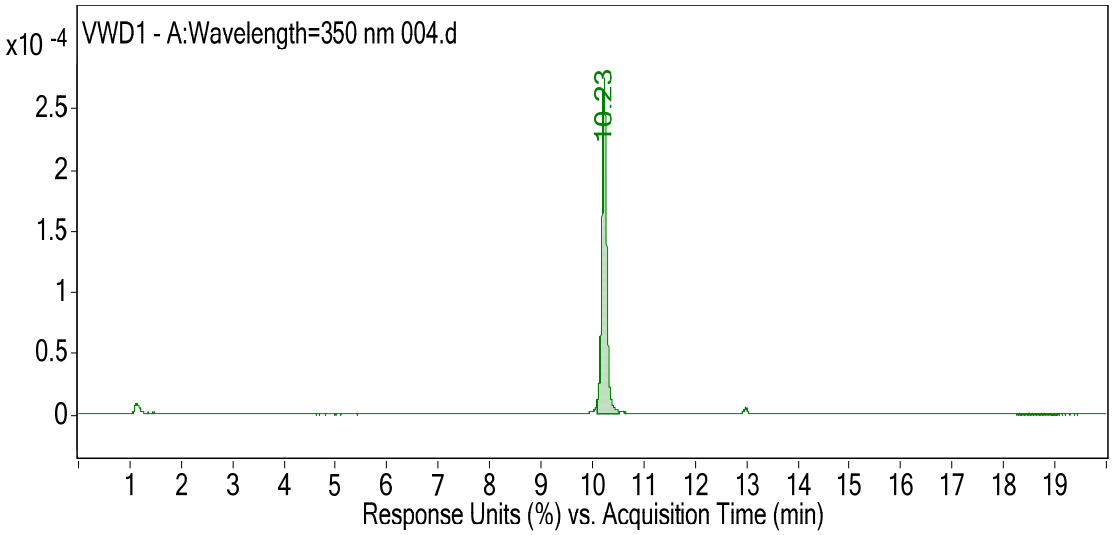
4.3.1 3,7-Dihidroksiflavon

U inkubacijama 3,7-dihidroksiflavona s humanim jetrenim mikrosomima detektirano je formiranje dva metabolita nastalih kao produkti aromatske hidroksilacije. Glavni produkt identificiran je kao 3,7,4'-trihidroksiflavon (slika 17). Drugi produkt, zastupljen u znatno manjoj količini, zbog nedostatka komercijalno dostupnog standarda nije mogao biti identificiran, no ipak je na temelju MS i MS/MS podataka dalje karakteriziran kao produkt hidroksilacije koja se zbila na prstenu A, i to ili na položaju 6 ili na položaju 8. Dakle, drugi, manji produkt metabolizma 3,7-dihidroksiflavona je ili 3,6,7-trihidroksiflavon ili 3,7,8-trihidroksiflavon.

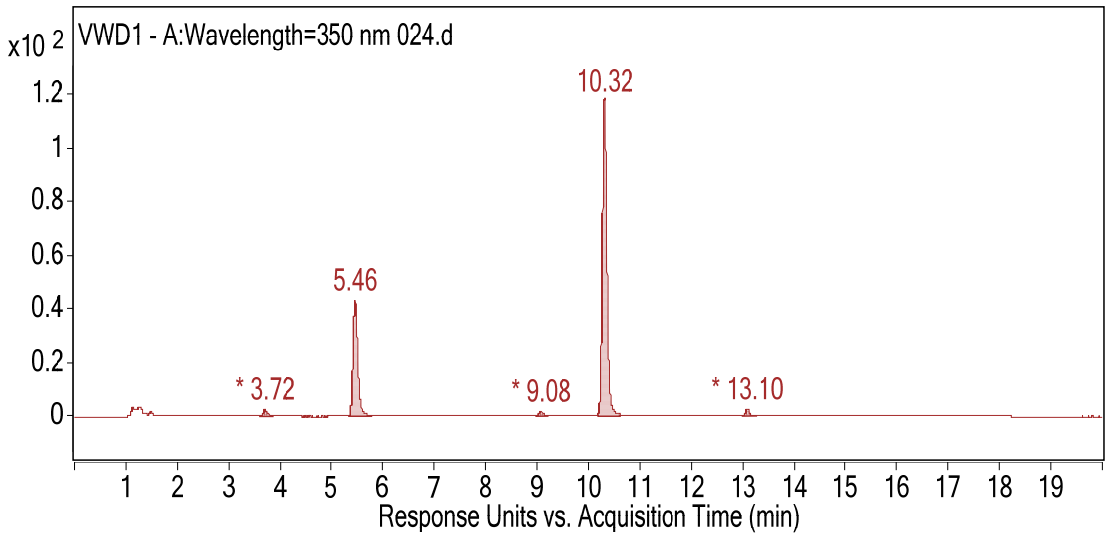


Slika 17. Metabolizam 3,7-dihidroksiflavona posredovan HLM-om. Aromatskom hidroksilacijom na prstenu B na položaju 4' nastaje glavni metabolit 3,7,4'-trihidroksiflavon. Th = teoretska masa, ex = eksperimentalno određena masa.

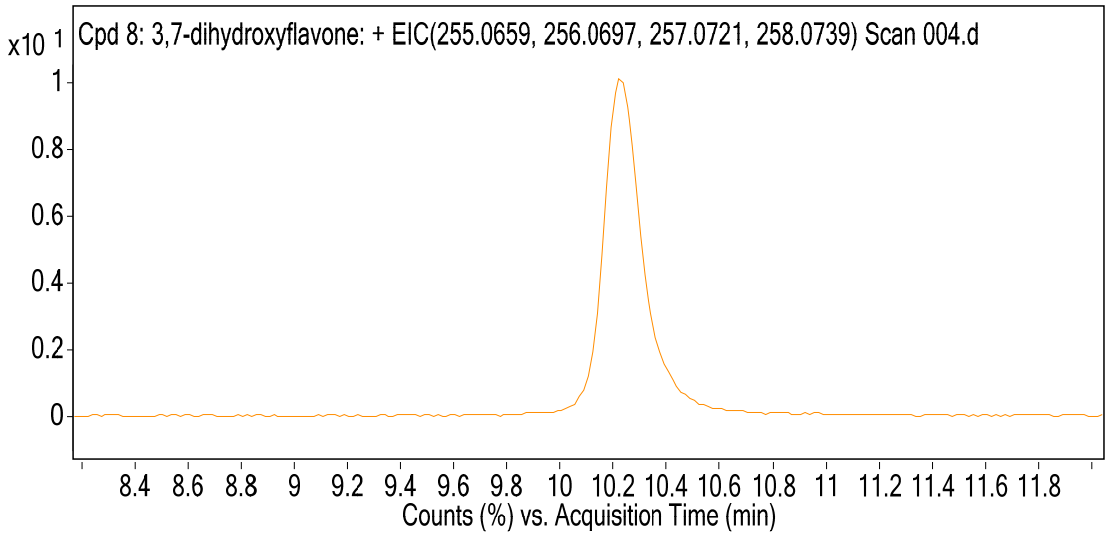
Na slikama 18a-f prikazani su LC/MS podaci na temelju kojih je karakteriziran metabolizam 3,7-dihidroksiflavona posredovan HLM-om.

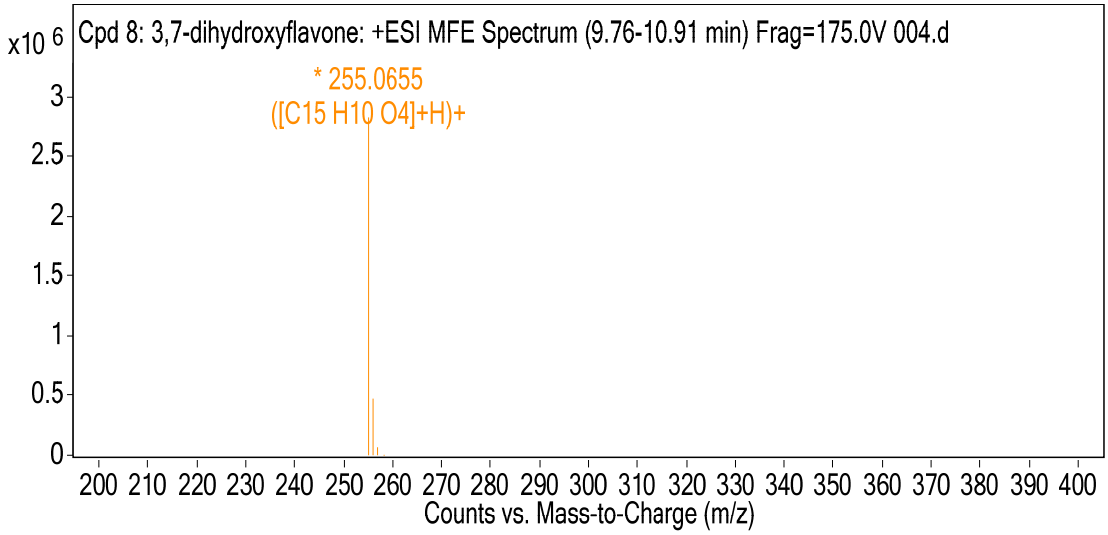


Slika 18a. UV kromatogram inkubacijske smjese 3,7-dihidroksiflavona s HLM-om bez dodanog NADPH-generirajućeg sustava.



Slika 18b. UV kromatogram inkubacijske smjese 3,7-dihidroksiflavona s HLM-om s dodanim NADPH-generirajućim sustavom.

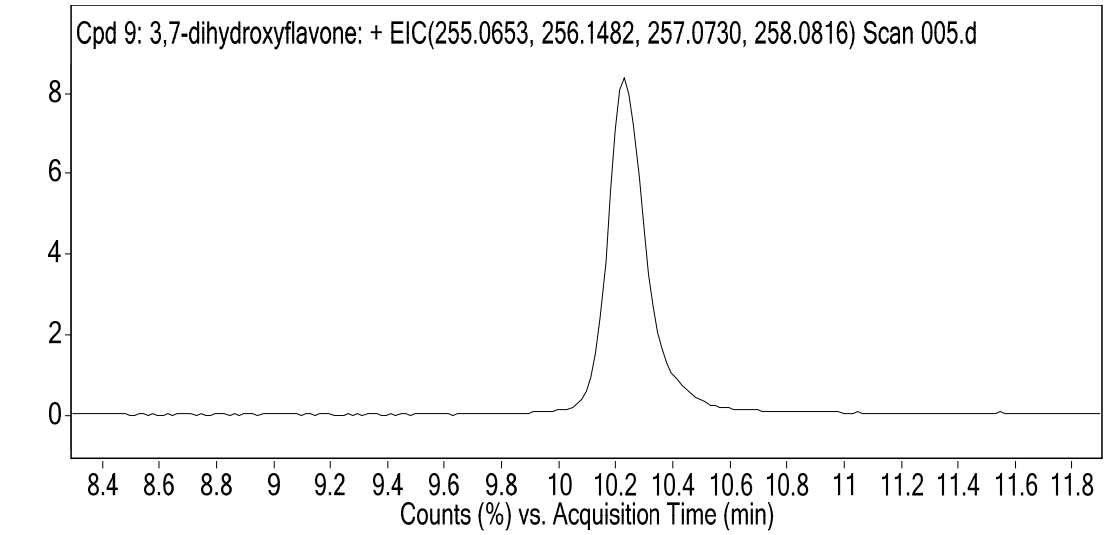


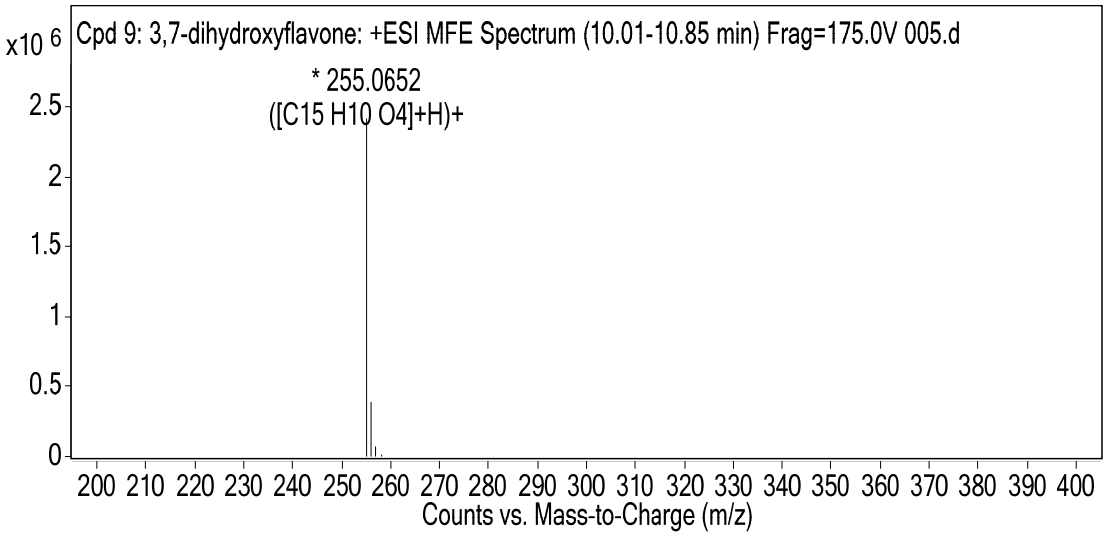


Compound Label	RT	Mass	Name	DB Formula	DB Diff (ppm)
Cpd 8: 3,7-dihydroxyflavone	10,23	254,0582	3,7-dihydroxyflavone	C15 H10 O4	-1,11

Compound Label	Name	*m/z*	RT	Algorithm	Mass
Cpd 8: 3,7-dihydroxyflavone	**3,7-dihydroxyflavone**	255,0655	10,23	Find by Molecular Feature	254,0582

Slika 18c. Kromatogram izdvojenog iona (engl. *extracted ion chromatogram*, EIC) i spektar masa supstrata (3,7-dihidroksiflavon) u inkubacijskoj smjesi bez dodanog NADPH-generirajućeg sustava.

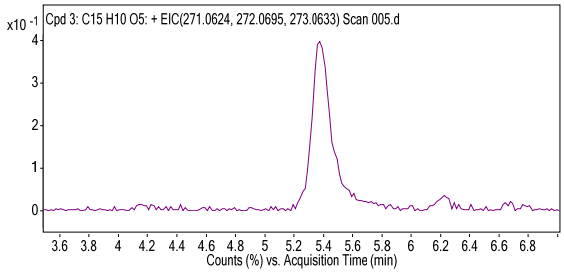


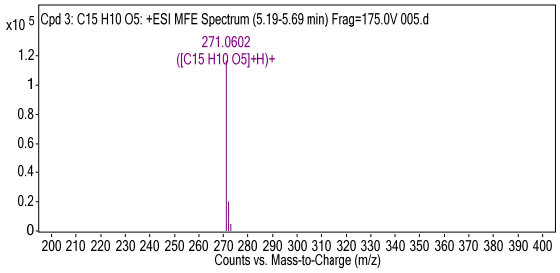


Compound Label	RT	Mass	Name	DB Formula	DB Diff (ppm)
Cpd 9: 3,7-dihydroxyflavone	10,23	254,058	3,7-dihydroxyflavone	C15 H10 O4	-0,31

Compound Label	Name	*m/z*	RT	Algorithm	Mass
Cpd 9: 3,7-dihydroxyflavone	**3,7-dihydroxyflavone**	255,0652	10,23	Find by Molecular Feature	254,058

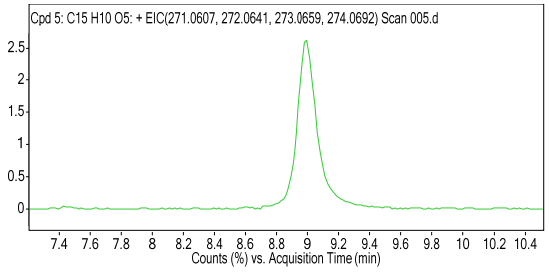
Slika 18d. Kromatogram izdvojenog iona i spektar masa supstrata (3,7-dihidroksiflavon) u inkubacijskoj smjesi s dodanim NADPH-generirajućim sustavom.

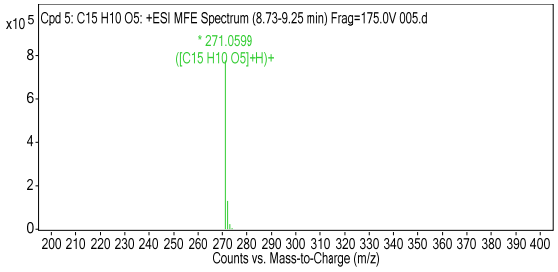




Compound Label	RT	Mass	MFG Formula	MFG Diff (ppm)
Cpd 3: C15 H10 O5	5,38	270,0529	C15 H10 O5	-0,16

Compound Label	*m/z*	RT	Algorithm	Mass
Cpd 3: C15 H10 O5	271,0602	5,38	Find by Molecular Feature	270,0529

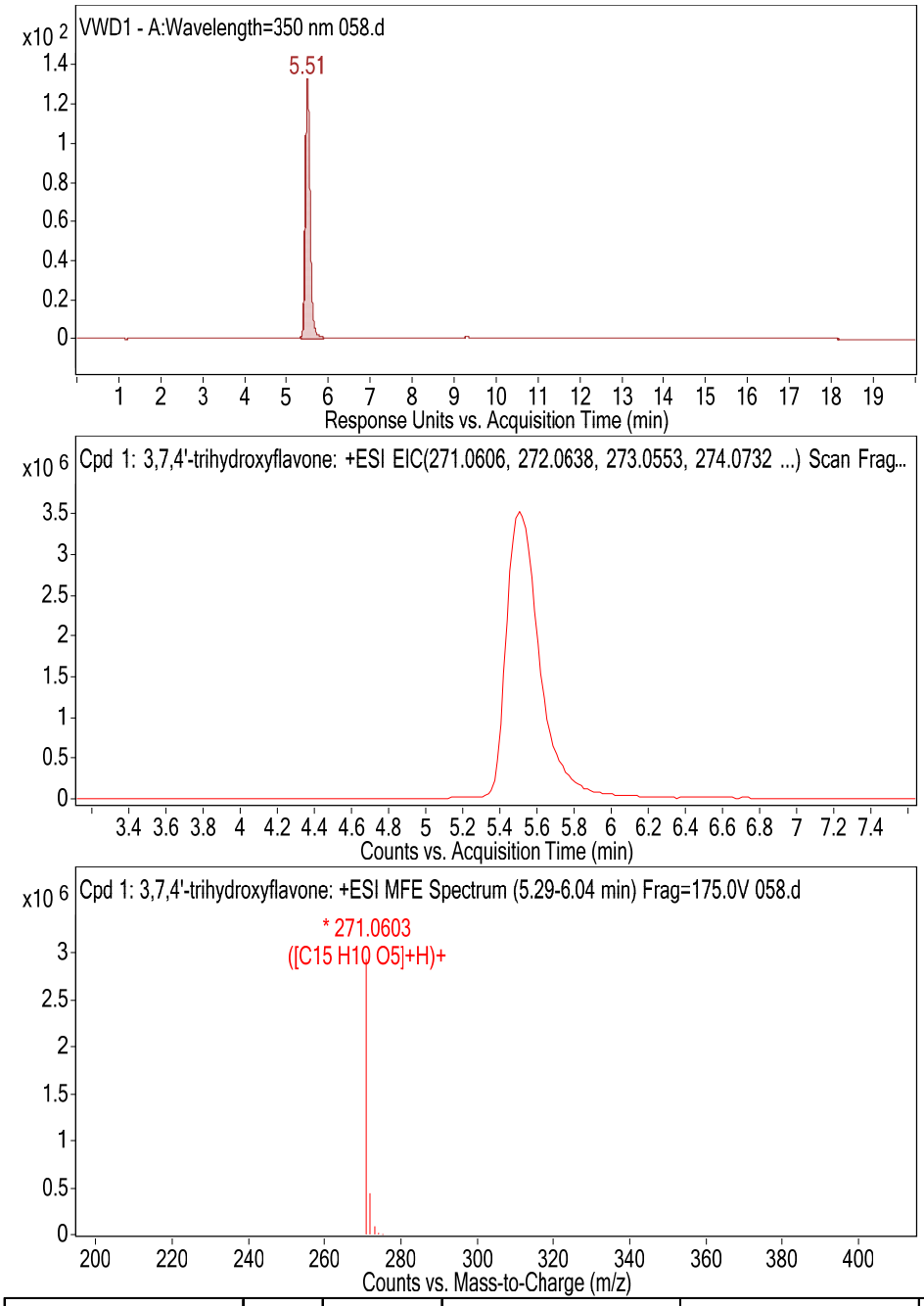




Compound Label	RT	Mass	MFG Formula	MFG Diff (ppm)	DB Formula
Cpd 5: C15 H10 O5	8,99	270,0527	C15 H10 O5	0,39	C15 H10 O5

Compound Label	*m/z*	RT	Algorithm	Mass
Cpd 5: C15 H10 O5	271,0599	8,99	Find by Molecular Feature	270,0527

Slika 18e. Kromatogram izdvojenog iona i spektar masa detektiranih metabolita u inkubacijskoj smjesi 3,7-dihidroksiflavona s HLM-om s dodanim NADPH-generirajućim sustavom.



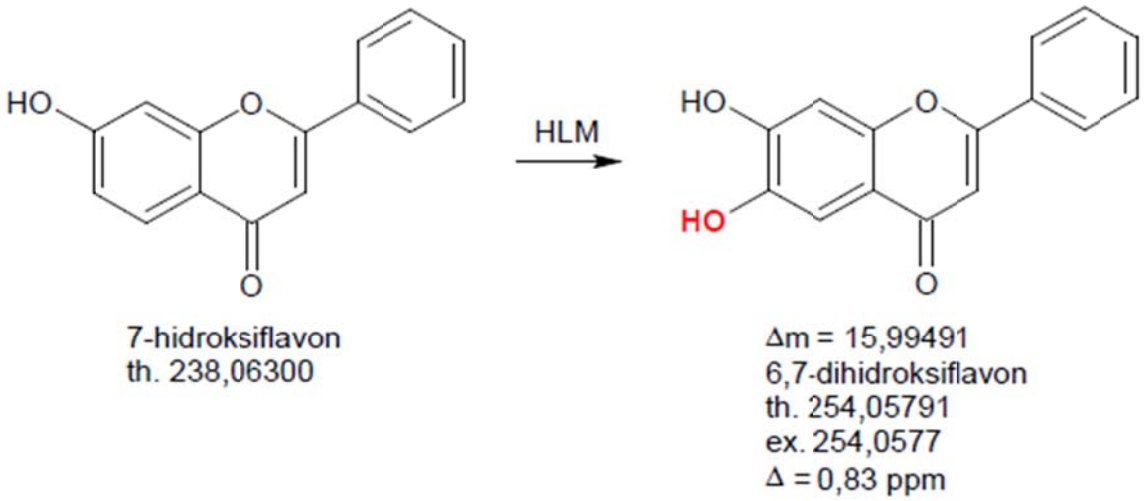
Compound Label	RT	Mass	Name	DB Formula	DB Diff (ppm)
Cpd 1: 3,7,4'-trihydroxyflavone	5,51	270,0531	3,7,4'-trihydroxyflavone	C15 H10 O5	-0,98

Compound Label	Name	*m/z*	RT	Algorithm	Mass
Cpd 1: 3,7,4'-trihydroxyflavone	**3,7,4'-trihydroxyflavone**	271,0603	5,51	Find by Molecular Feature	270,0531

Slika 18f. UV kromatogram, kromatogram izdvojenog iona i spektar masa poredbene otopine 3,7,4'-trihidroksiflavona.

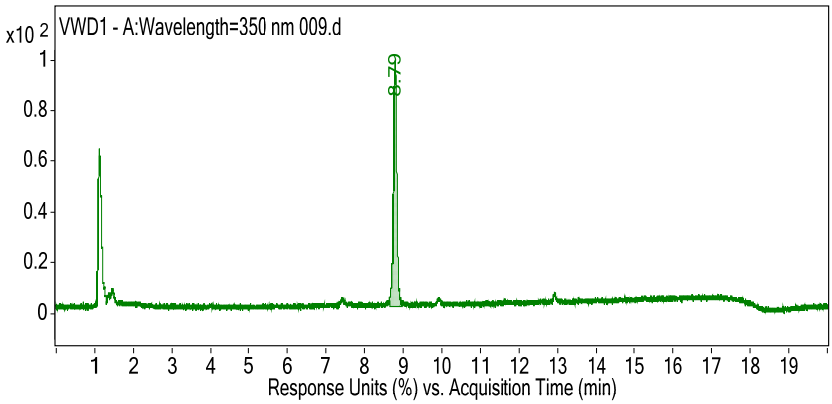
4.3.2 7-Hidroksiflavon

U inkubacijama 7-hidroksiflavona s humanim jetrenim mikrosomima detektirano je formiranje triju metabolita nastalih kao produkti aromatske hidroksilacije na prstenu A na položaju 6 i 8, te na prstenu B na položaju 4'. Glavni produkt identificiran je kao 6,7-dihidroksiflavon (slika 19), a druga dva produkta, zastupljena u znatno manjoj količini identificirana su kao 7,8-dihidroksiflavon i 7,4'-dihidroksiflavon.

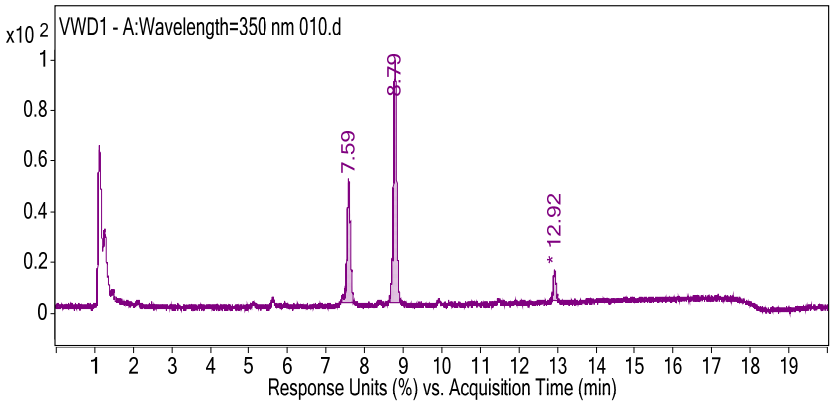


Slika 19. Metabolizam 7-hidroksiflavona posredovan HLM-om. Aromatskom hidroksilacijom na prstenu A na položaju 6 nastaje glavni metabolit 6,7-dihidroksiflavon. Th = teoretska masa, ex = eksperimentalno određena masa.

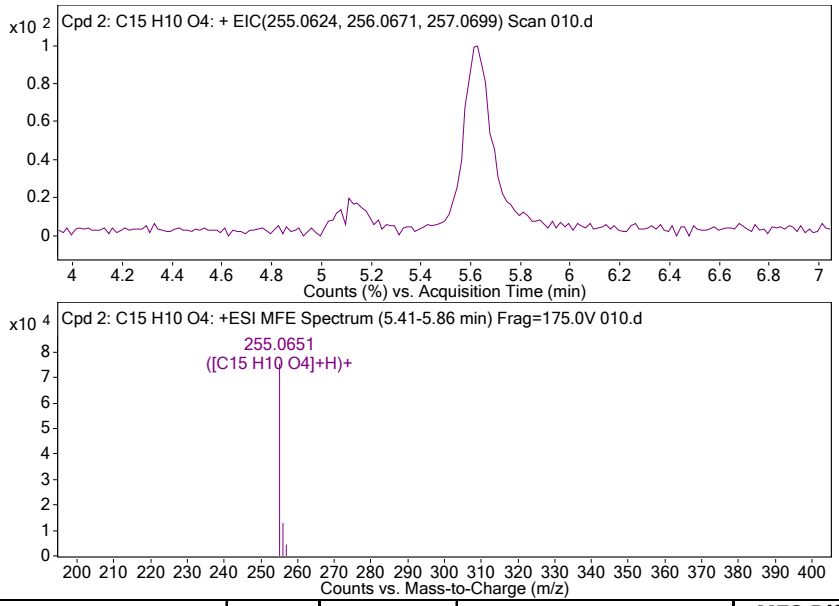
Na slikama 20a-f prikazani su LC/MS podaci na temelju kojih je karakteriziran metabolizam 7-hidroksiflavona posredovan HLM-om.



Slika 20a. UV kromatogram inkubacijske smjese 7-hidroksiflavona s HLM-om bez dodanog NADPH-generirajućeg sustava.

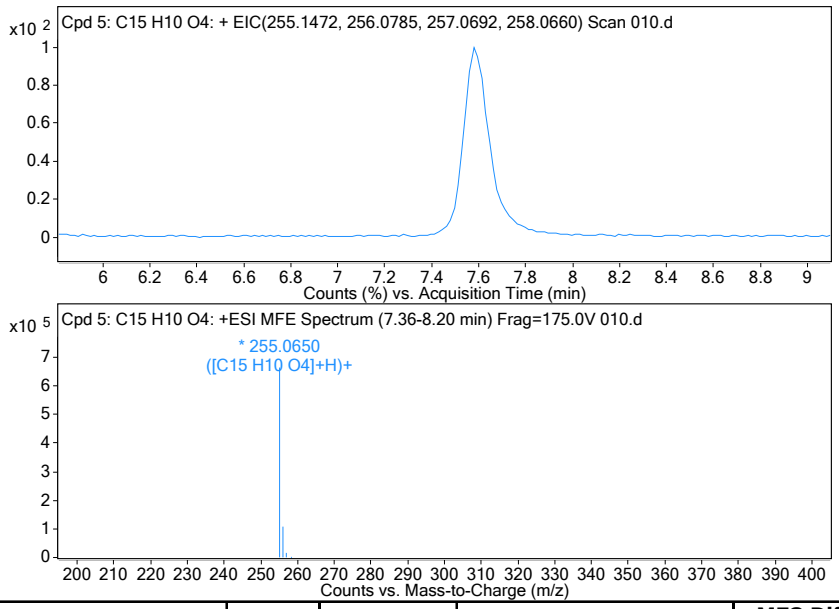


Slika 20b. UV kromatogram inkubacijske smjese 7-hidroksiflavona s HLM-om s dodanim NADPH-generirajućim sustavom.



Compound Label	RT	Mass	MFG Formula	MFG Diff (ppm)
Cpd 2: C15 H10 O4	5,63	254,0578	C15 H10 O4	0,34

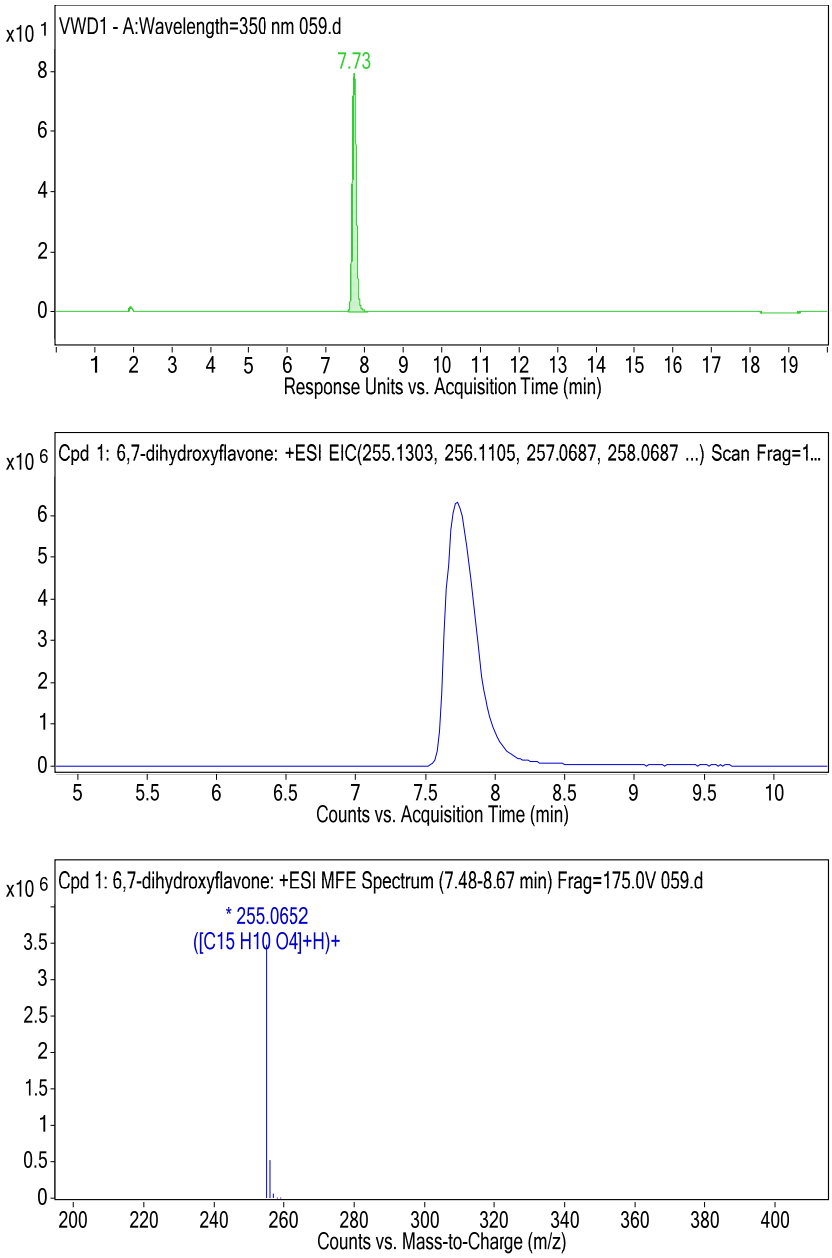
Compound Label	*m/z*	RT	Algorithm	Mass
Cpd 2: C15 H10 O4	255,0651	5,63	Find by Molecular Feature	254,0578



Compound Label	RT	Mass	MFG Formula	MFG Diff (ppm)
Cpd 5: C15 H10 O4	7,59	254,0577	C15 H10 O4	0,83

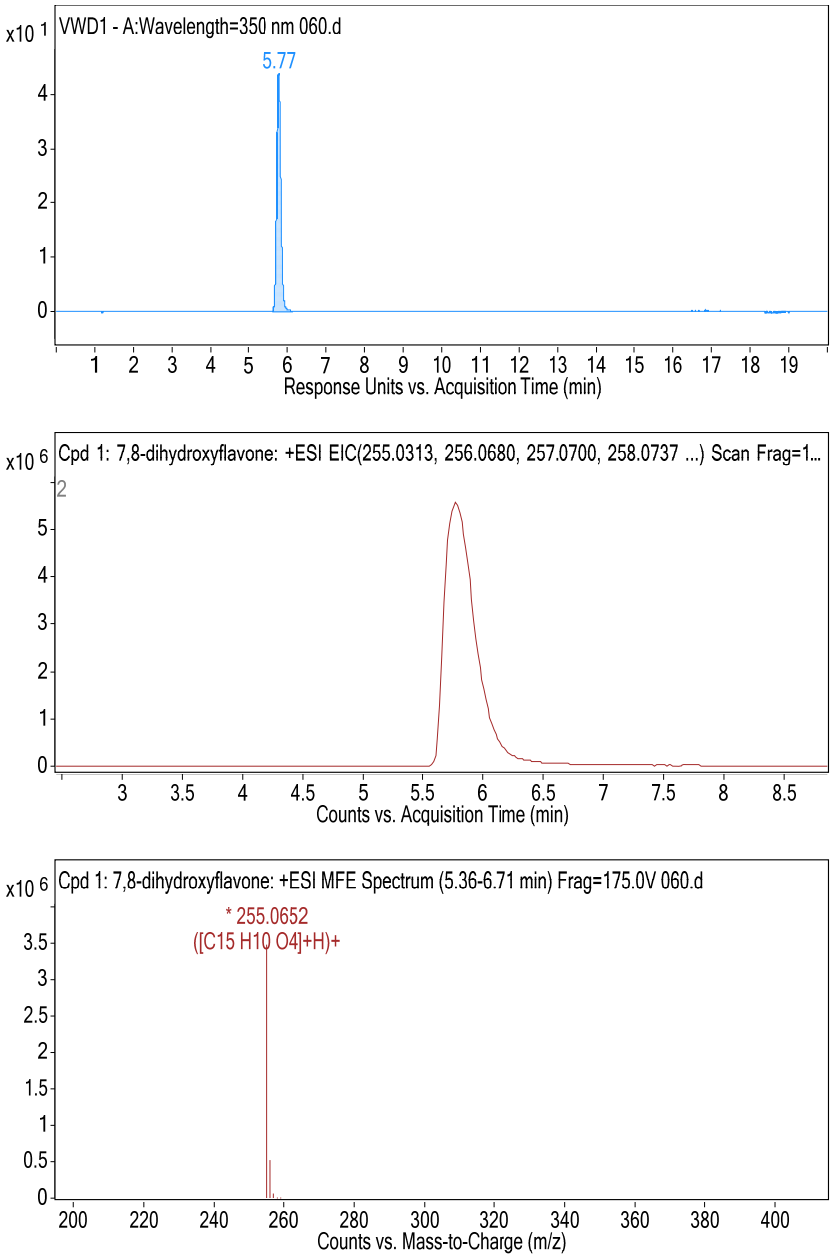
Compound Label	*m/z*	RT	Algorithm	Mass
Cpd 5: C15 H10 O4	255,065	7,59	Find by Molecular Feature	254,0577

Slika 20c. Kromatogram izdvojenog iona i spektar masa detektiranih metabolita u inkubacijskoj smjesi 7-hidroksiflavona s HLM-om s dodanim NADPH-generirajućim sustavom.



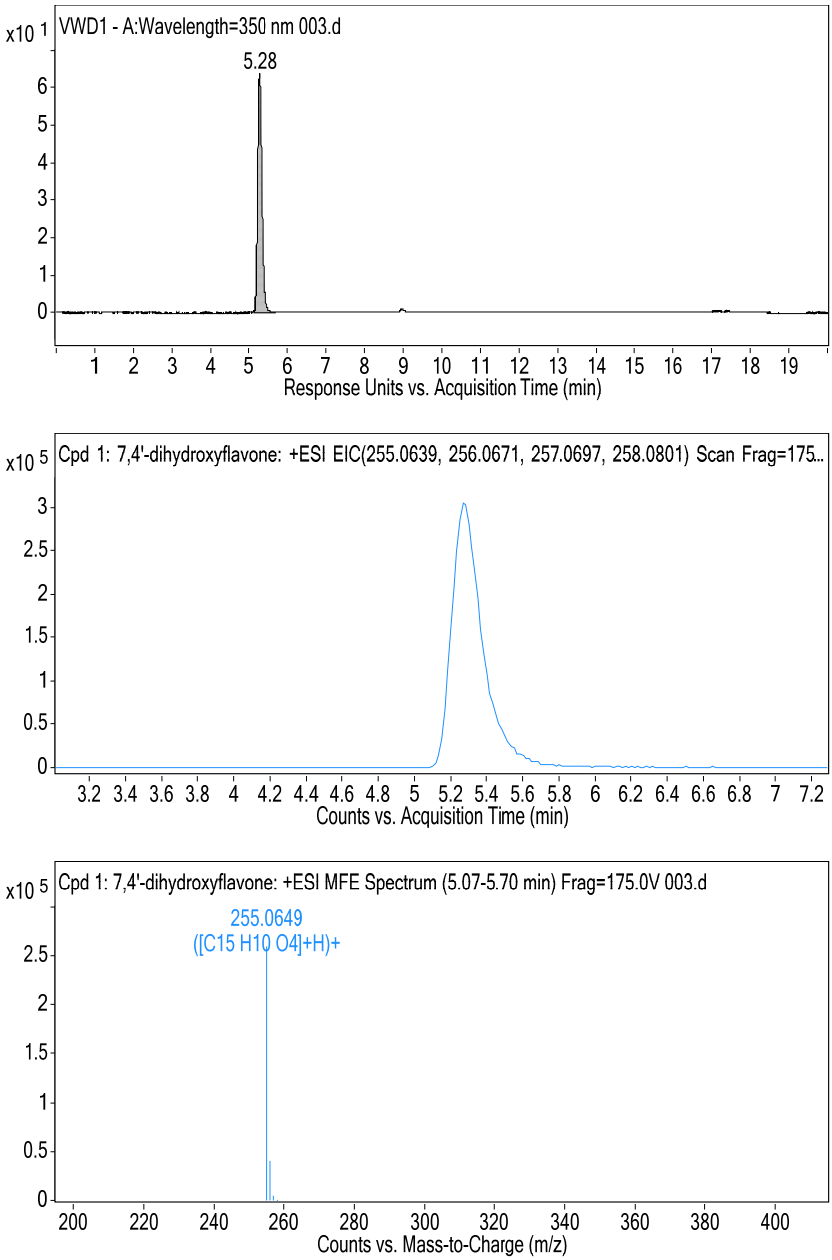
Compound Label	RT	Mass	Name	MFG Formula	MFG Diff (ppm)
Cpd 1: 6,7-dihydroxyflavone	7,75	254,0579	6,7-dihydroxyflavone	C15 H10 O4	-0,07

Slika 20d. UV kromatogram, kromatogram izdvojenog iona i spektar masa poredbene otopine 6,7-dihidroksiflavona.



Compound Label	RT	Mass	Name	MFG Formula	MFG Diff (ppm)
Cpd 1: 7,8-dihydroxyflavone	5,79	254,058	7,8-dihydroxyflavone	C15 H10 O4	-0,21

Slika 20e. UV kromatogram, kromatogram izdvojenog iona i spektar masa poredbene otopine 7,8-dihidroksiflavona.

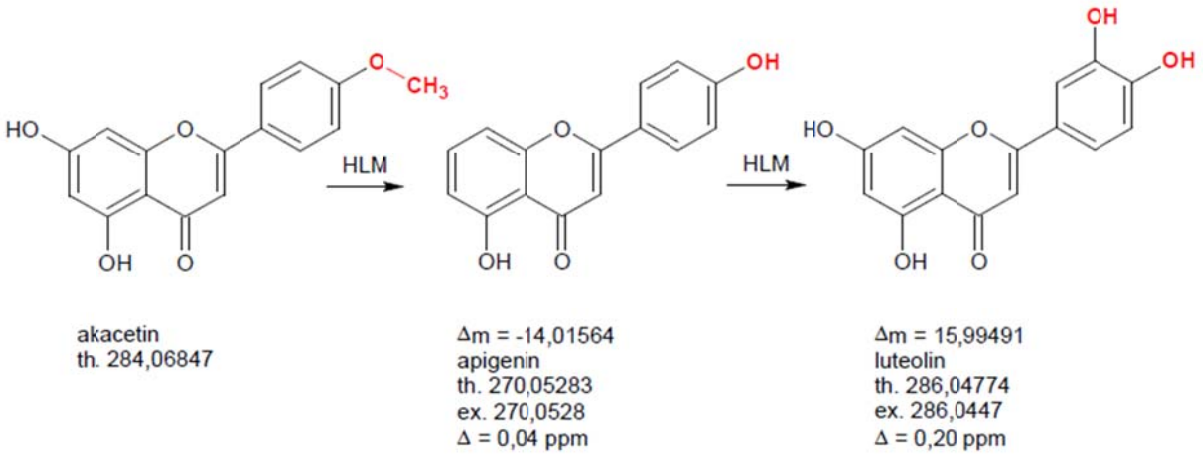


Compound Label	RT	Mass	Name	MFG Formula	MFG Diff (ppm)
Cpd 1: 7,4'-dihydroxyflavone	5,28	254,0576	7,4'-dihydroxyflavone	C15 H10 O4	1,31

Slika 20f. UV kromatogram, kromatogram izdvojenog iona i spektar masa poredbene otopine 7,4'-dihidroksiflavona.

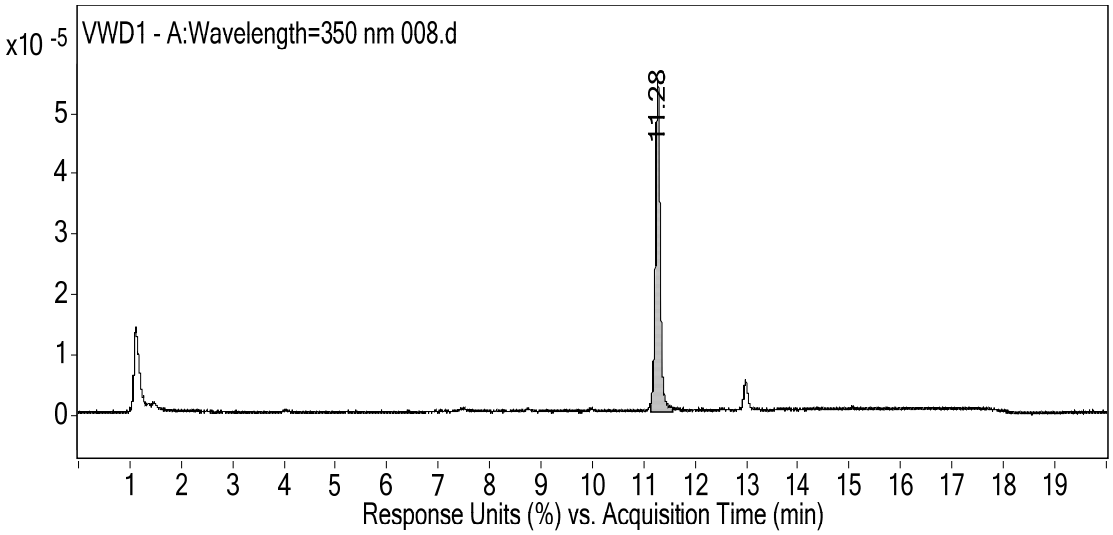
4.3.3 Akacetin

U inkubacijama akacetina s humanim jetrenim mikrosomima detektirano je formiranje dvaju metabolita, apigenina i luteolina. Pronalazak apigenina i luteolina kao produkata metabolizma upućuje na distributivno formiranje metabolita djelovanjem citokroma P450. Najprije se ishodišni susptrat akacetin demetilira na položaju 4' prstena B te nastaje apigenin, a potom se apigenin hidroksilira na položaju 3' prstena B pri čemu nastaje luteolin (slika 21). Apigenin je količinski najzastupljeniji produkt metabolizma, što ukazuje na to da je demetilacija akacetina na položaju 4' prstena B glavni metabolički put kataliziran citokromima 450.

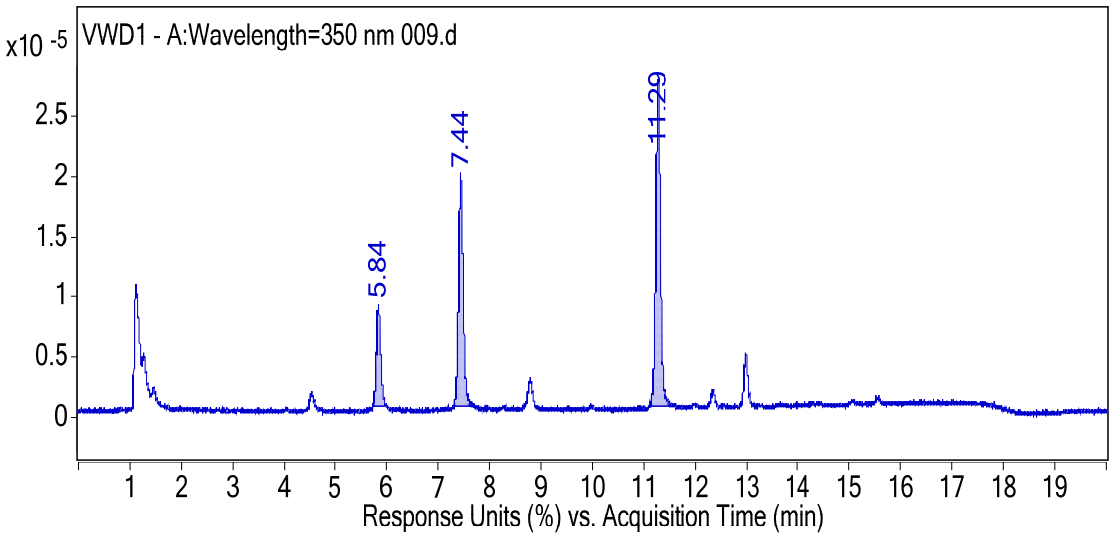


Slika 21. Metabolizam akacetina posredovan HLM-om. Demetilacijom na položaju 4' prstena B nastaje glavni metabolit apigenin. Distributivnom aromatskom hidroksilacijom apigenina na položaju 3' prstena B nastaje drugi produkt luteolin. Th = teoretska masa, ex = eksperimentalno određena masa.

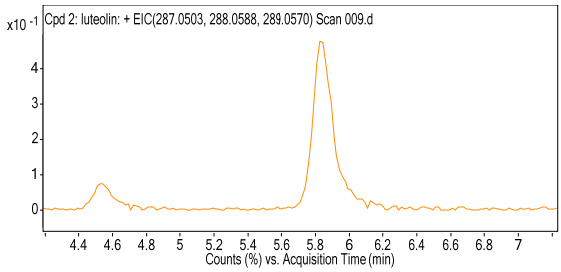
Na slikama 22a-c prikazani su LC/MS podaci na temelju kojih je karakteriziran metabolizam akacetina posredovan HLM-om.

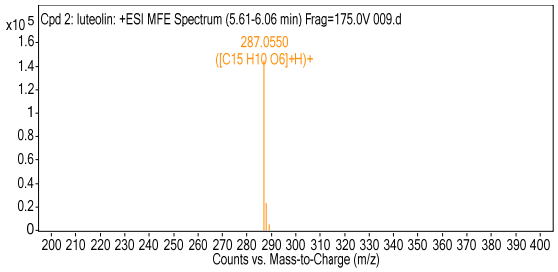


Slika 22a. UV kromatogram inkubacijske smjese akacetina s HLM-om bez dodanog NADPH-generirajućeg sustava.



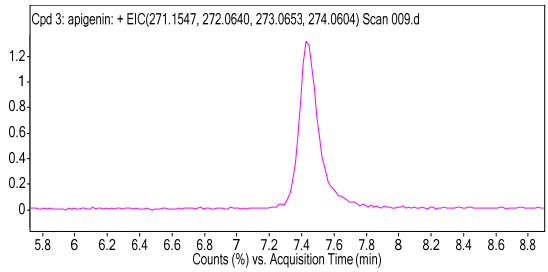
Slika 22b. UV kromatogram inkubacijske smjese akacetina s HLM-om s dodanim NADPH-generirajućim sustavom.

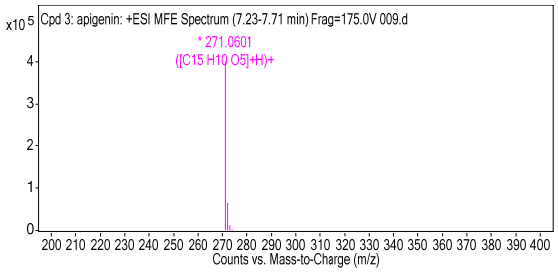




Compound Label	RT	Mass	Name	DB Formula	DB Diff (ppm)
Cpd 2: luteolin	5,84	286,0477	luteolin	C15 H10 O6	0,2

Compound Label	Name	*m/z*	RT	Algorithm	Mass
Cpd 2: luteolin	**luteolin**	287,055	5,84	Find by Molecular Feature	286,0477





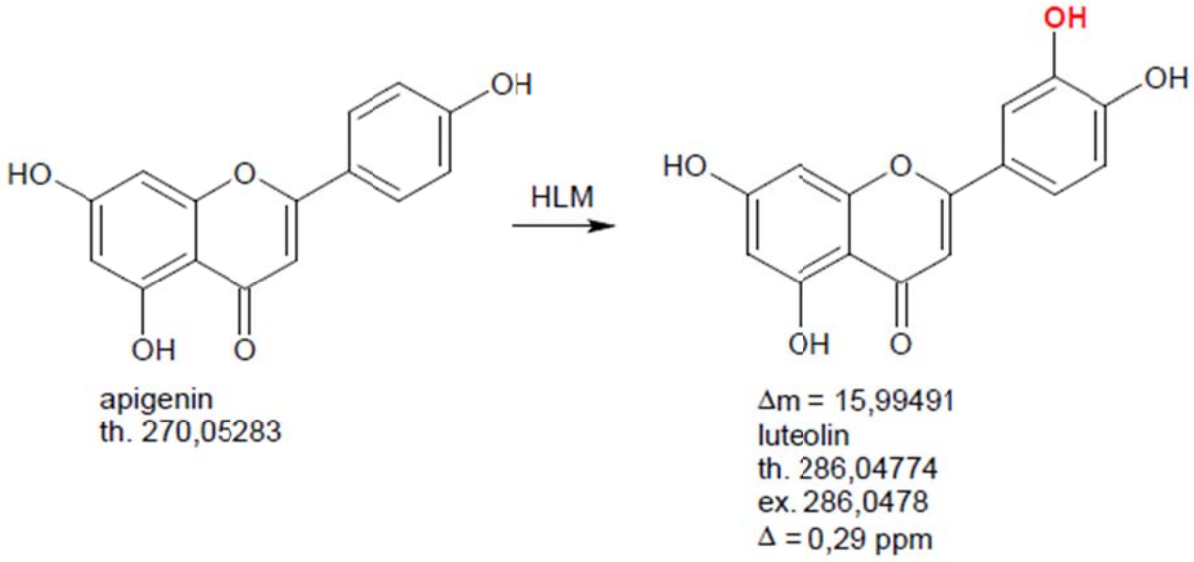
Compound Label	RT	Mass	Name	DB Formula	DB Diff (ppm)
Cpd 3: apigenin	7,44	270,0528	apigenin	C15 H10 O5	0,04

Compound Label	Name	*m/z*	RT	Algorithm	Mass
Cpd 3: apigenin	**apigenin**	271,0601	7,44	Find by Molecular Feature	270,0528

Slika 22c. Kromatogram izdvojenog iona i spektar masa detektiranih metabolita u inkubacijskoj smjesi akacetina s HLM-om s dodanim NADPH-generirajućim sustavom.

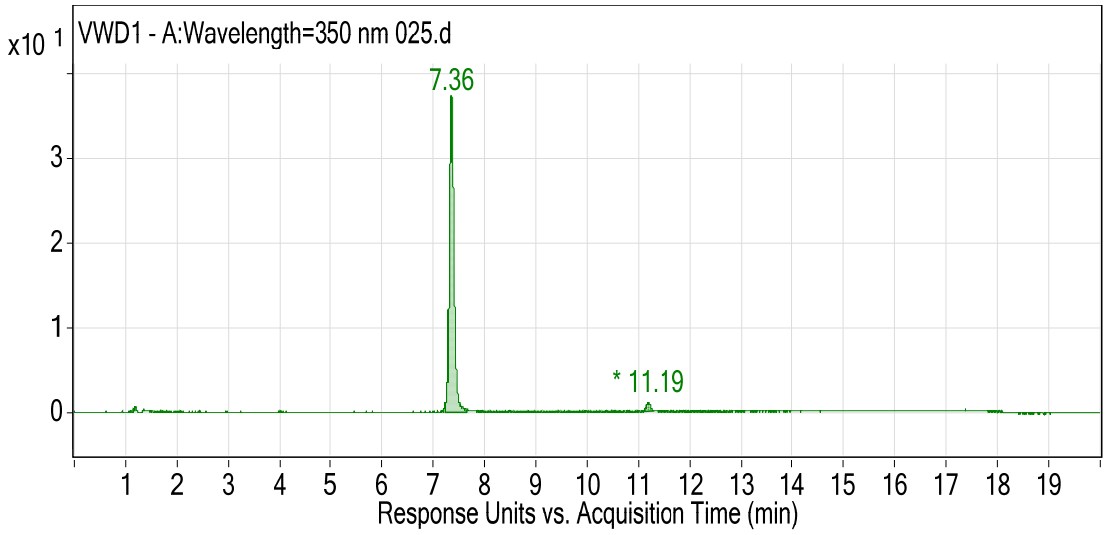
4.3.4 Apigenin

U inkubacijama apigenina s humanim jetrenim mikrosomima detektirano je formiranje jednog metabolita koji je identificiran kao luteolin. Pronalazak luteolina kao produkta metabolizma upućuje na aromatsku hidroksilaciju supstrata apigenina na položaju 3' prstena B (slika 23).

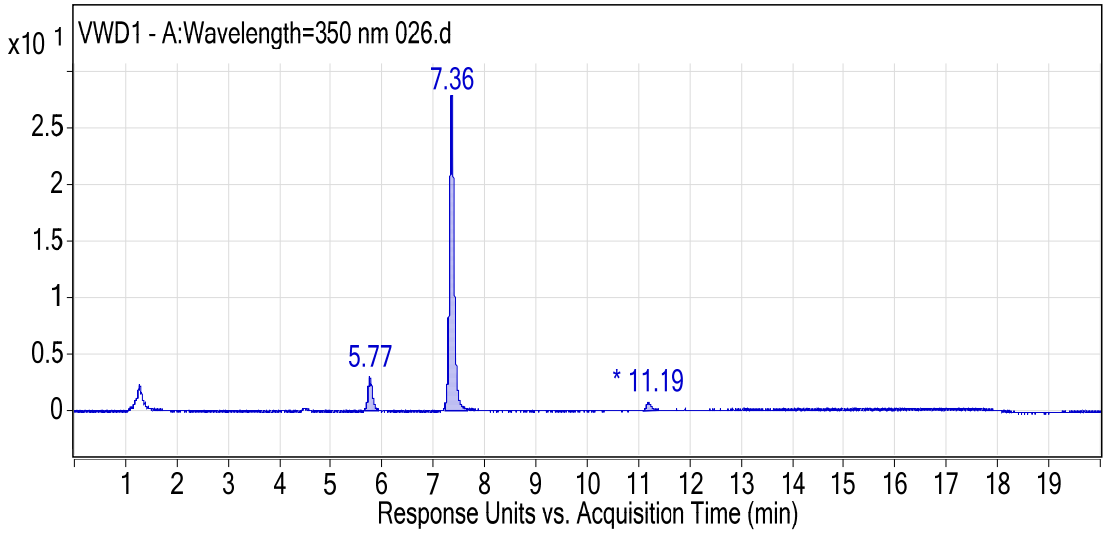


Slika 23. Metabolizam apigenina posredovan HLM-om. Aromatskom hidroksilacijom apigenina na položaju 3' prstena B nastaje jedini metabolit luteolin. Th = teoretska masa, ex = eksperimentalno određena masa.

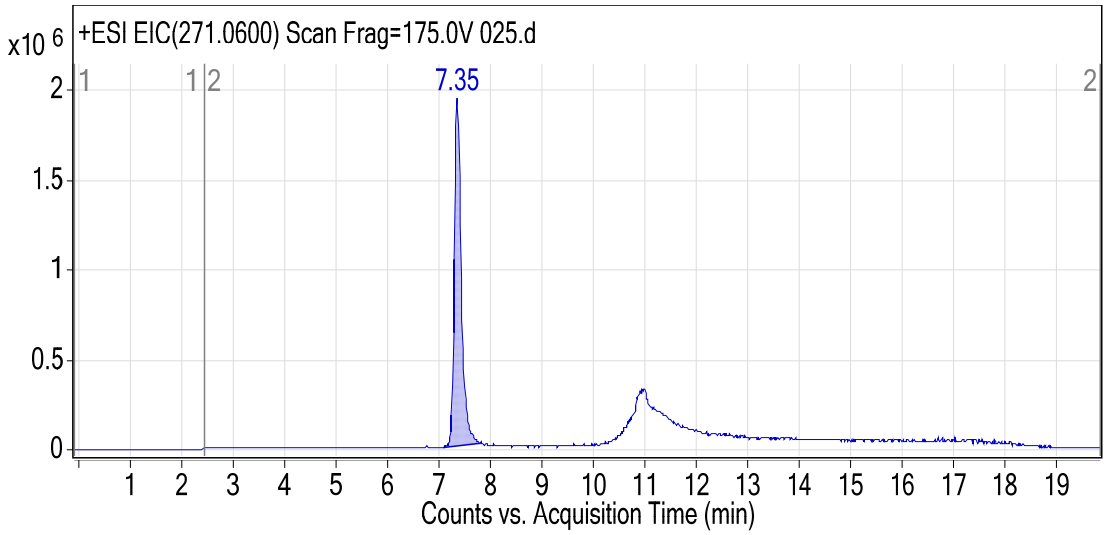
Na slikama 24a-g prikazani su LC/MS podaci na temelju kojih je karakteriziran metabolizam apigenina posredovan HLM-om.



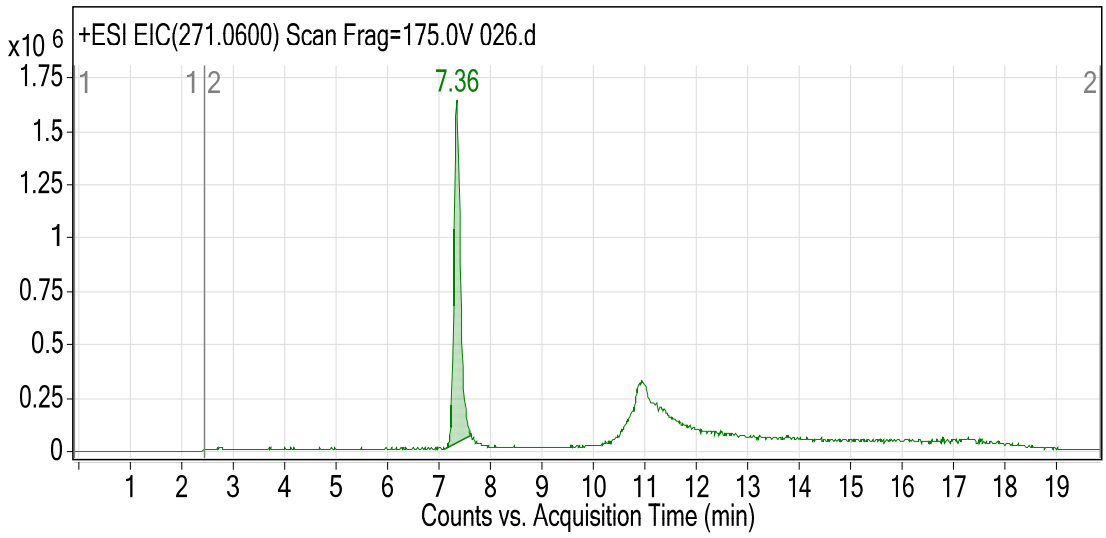
Slika 24a. UV kromatogram inkubacijske smjese apigenina s HLM-om bez dodanog NADPH-generirajućeg sustava.



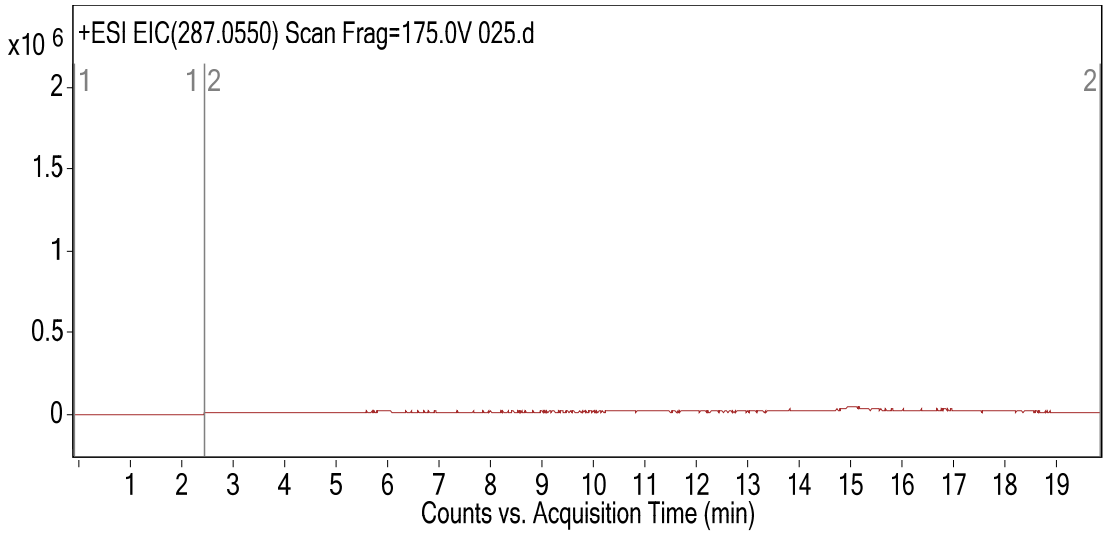
Slika 24b. UV kromatogram inkubacijske smjese apigenina s HLM-om s dodanim NADPH-generirajućim sustavom.



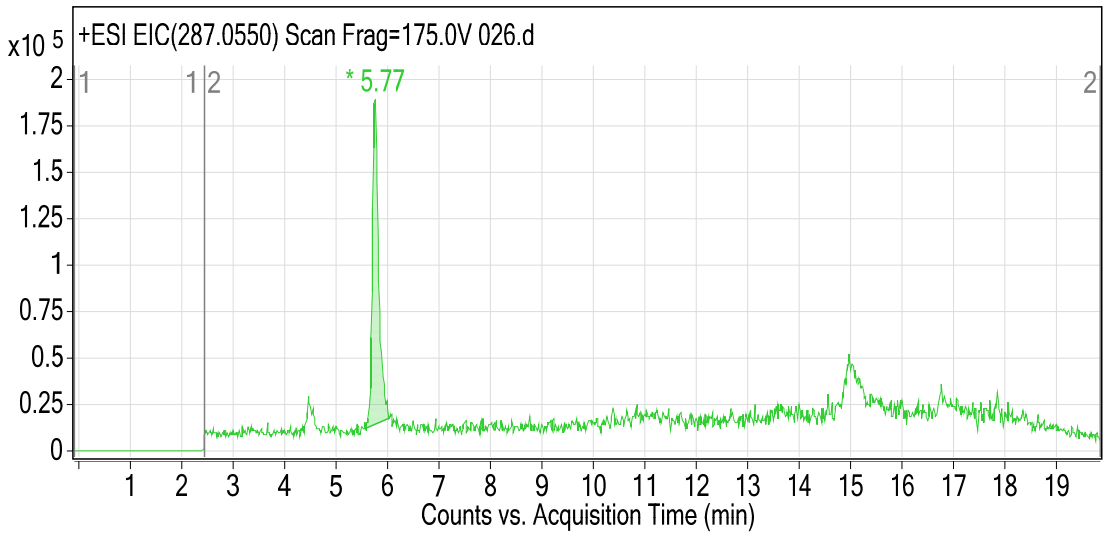
Slika 24c. Kromatogram izdvojenog iona *m/z* 271,0600 (apigenin) u inkubacijskoj smjesi apigenina s HLM-om bez dodanog NADPH-generirajućeg sustava.



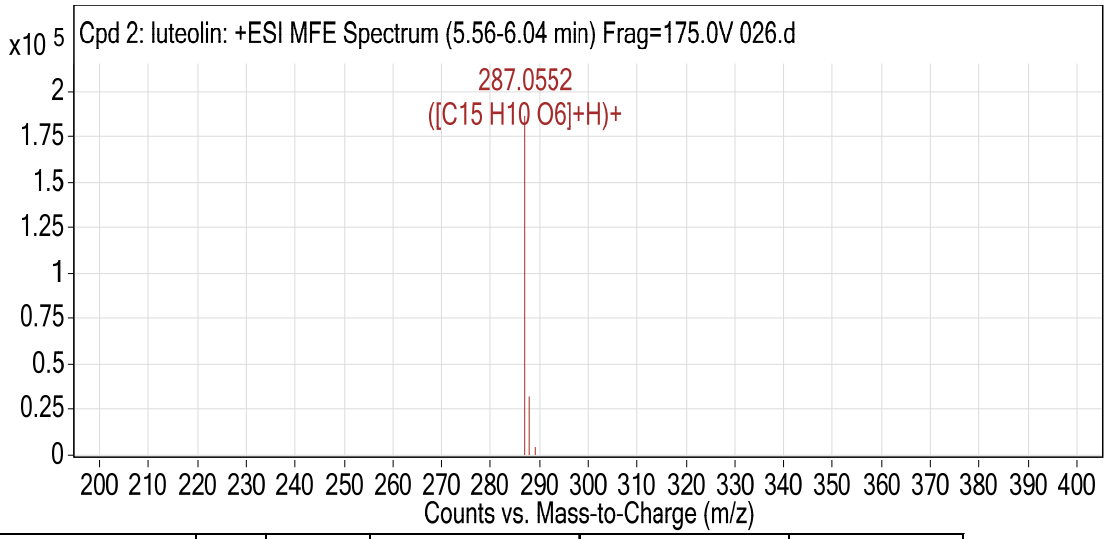
Slika 24d. Kromatogram izdvojenog iona *m/z* 271,0600 (apigenin) u inkubacijskoj smjesi apigenina s HLM-om s dodanim NADPH-generirajućim sustavom.



Slika 24e. Kromatogram izdvojenog iona *m/z* 287,0550 (luteolin) u inkubacijskoj smjesi apigenina s HLM-om bez dodanog NADPH-generirajućeg sustava.



Slika 24f. Kromatogram izdvojenog iona *m/z* 287,0550 (luteolin) u inkubacijskoj smjesi apigenina s HLM-om s dodanim NADPH-generirajućim sustavom.



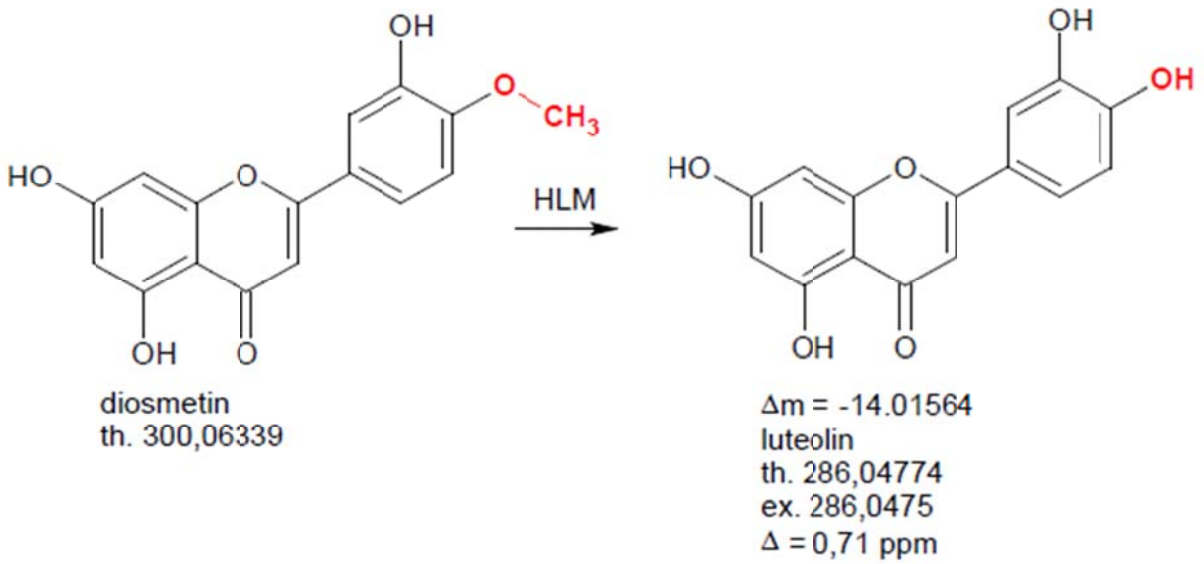
Compound Label	RT	Mass	Name	DB Formula	DB Diff (ppm)
Cpd 2: luteolin	5,77	286,0478	luteolin	C15 H10 O6	-0,29

Compound Label	Name	*m/z*	RT	Algorithm	Mass
Cpd 2: luteolin	**luteolin**	287,0552	5,77	Find by Molecular Feature	286,0478

Slika 24g. Spektar masa detektiranog metabolita na RT = 5,77 (luteolin) u inkubacijskoj smjesi apigenina s HLM-om s dodanim NADPH-generirajućim sustavom.

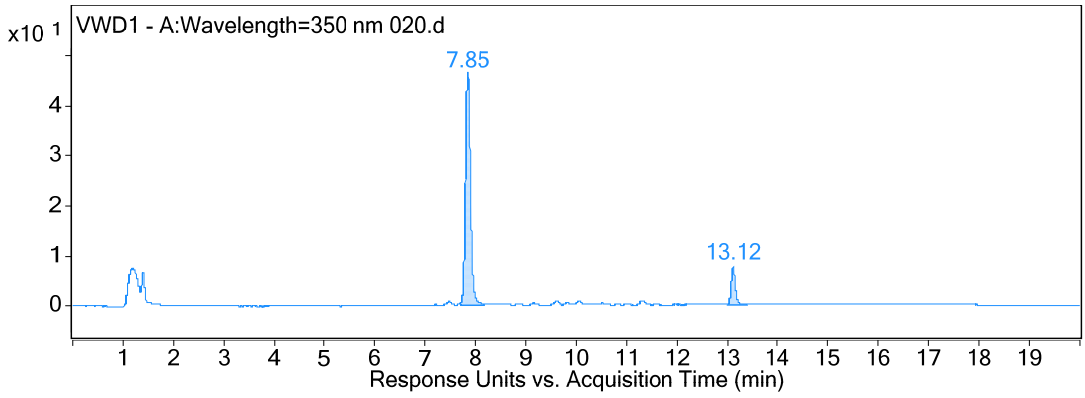
4.3.5 Diosmetin

U inkubacijama diosmetina s humanim jetrenim mikrosomima detektirano je formiranje jednog metabolita koji je identificiran kao luteolin. Pronalazak luteolina kao produkta metabolizma upućuje na *O*-demetilaciju supstrata diosmetina na položaju 4' prstena B (slika 25).

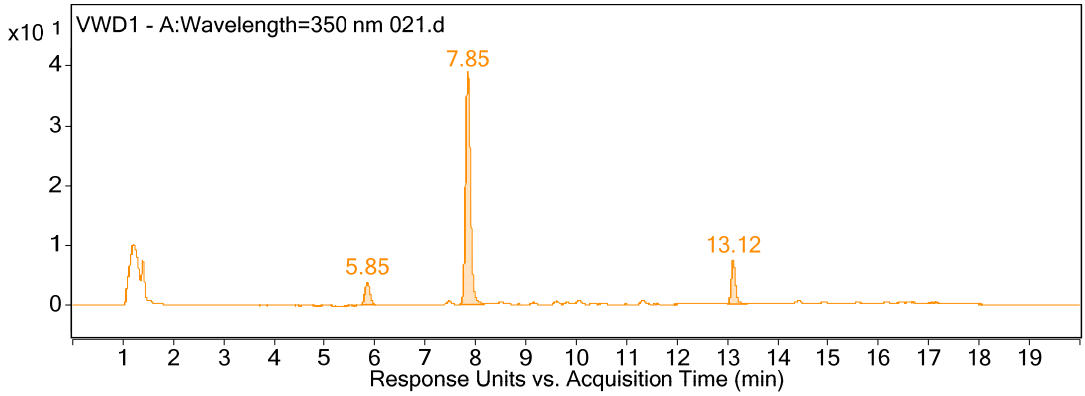


Slika 25. Metabolizam diosmetina posredovan HLM-om. Jedini metabolit luteolin nastaje *O*-demetilacijom diosmetina na položaju 4' prstena B. Th = teoretska masa, ex = eksperimentalno određena masa.

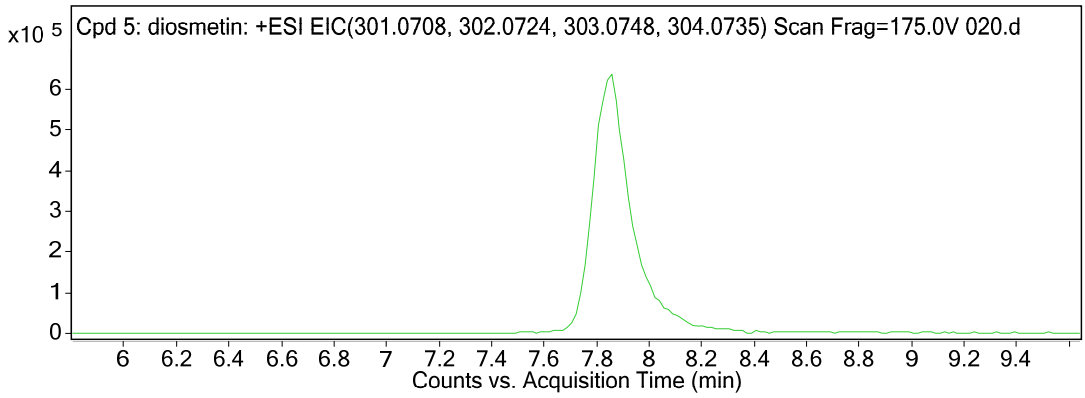
Na slikama 26a-e prikazani su LC/MS podaci na temelju kojih je karakteriziran metabolizam diosmetina posredovan HLM-om.

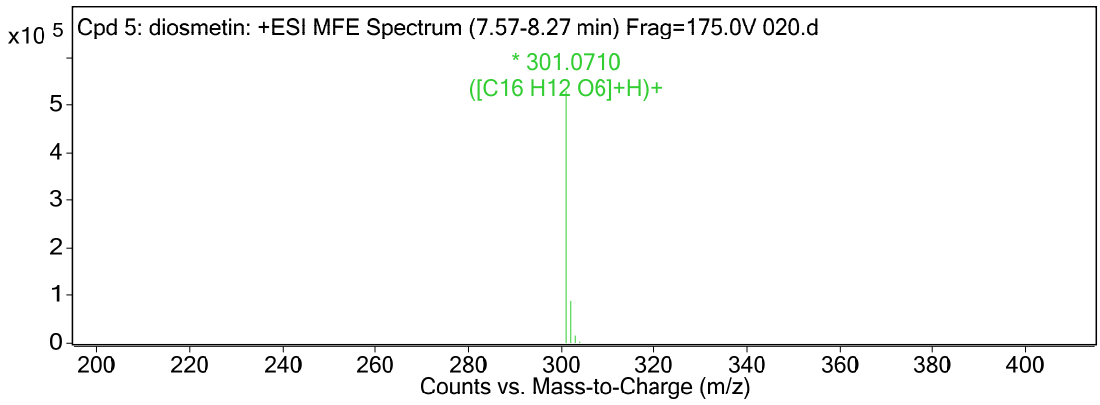


Slika 26a. UV kromatogram inkubacijske smjese diosmetina s HLM-om bez dodanog NADPH-generirajućeg sustava.



Slika 26b. UV kromatogram inkubacijske smjese diosmetina s HLM-om s dodanim NADPH-generirajućim sustavom.

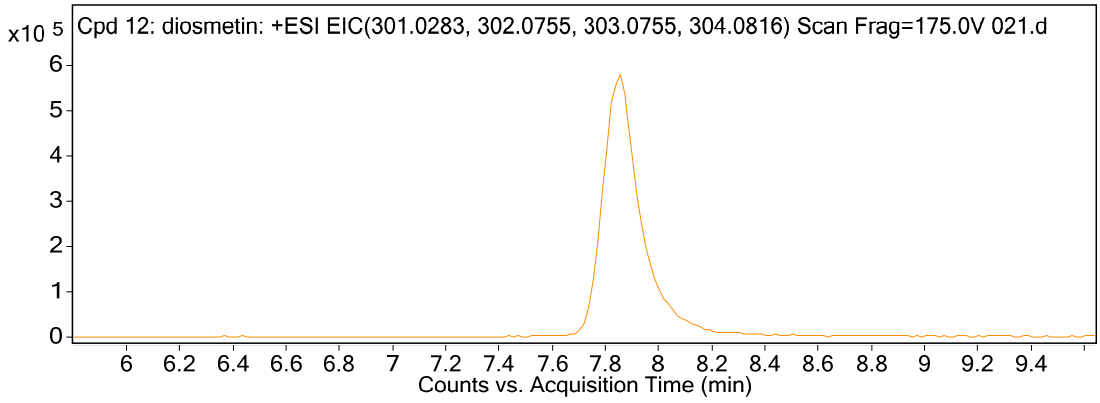


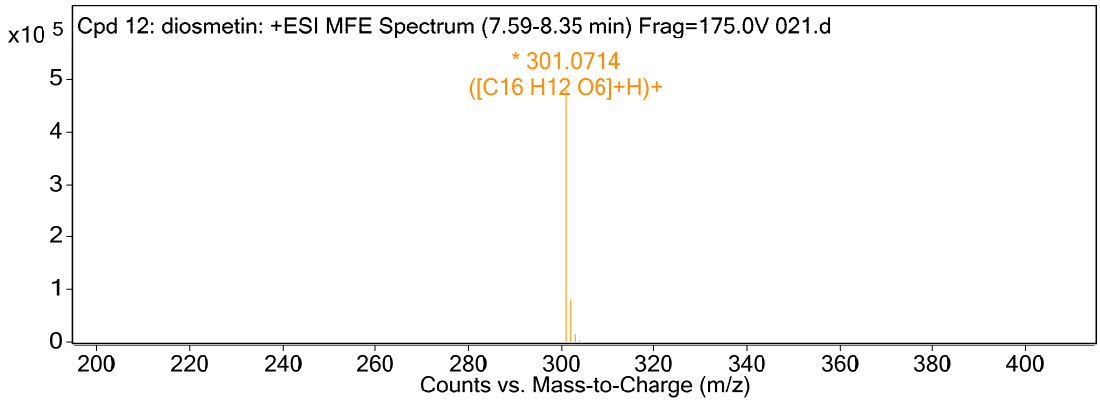


Compound Label	RT	Mass	Name	DB Formula	DB Diff (ppm)
Cpd 5: diosmetin	7,85	300,0634	diosmetin	C16 H12 O6	0,11

Compound Label	Name	*m/z*	RT	Algorithm	Mass
Cpd 5: diosmetin	**diosmetin**	301,071	7,85	Find by Molecular Feature	300,0634

Slika 26c. Kromatogram izdvojenog iona i spektar masa supstrata (diosmetin) u inkubacijskoj smjesi bez dodanog NADPH-generirajućeg sustava.

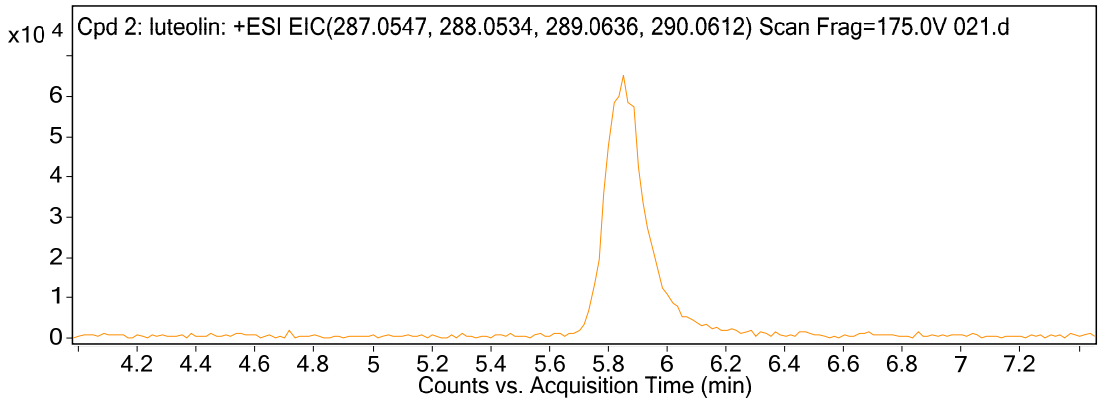


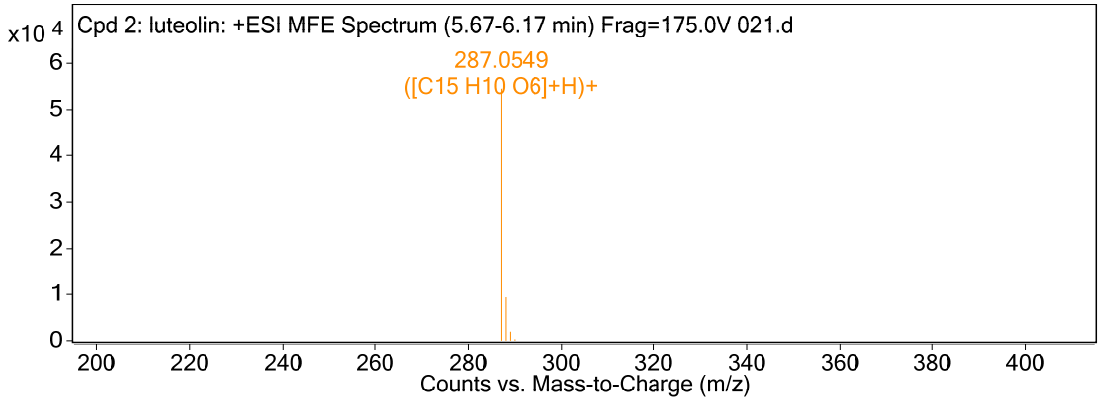


Compound Label	RT	Mass	Name	DB Formula	DB Diff (ppm)
Cpd 12: diosmetin	7,85	300,0638	diosmetin	C16 H12 O6	-1,41

Compound Label	Name	*m/z*	RT	Algorithm	Mass
Cpd 12: diosmetin	**diosmetin**	301,0714	7,85	Find by Molecular Feature	300,0638

Slika 26d. Kromatogram izdvojenog iona i spektar masa supstrata (diosmetin) u inkubacijskoj smjesi s dodanim NADPH-generirajućim sustavom.





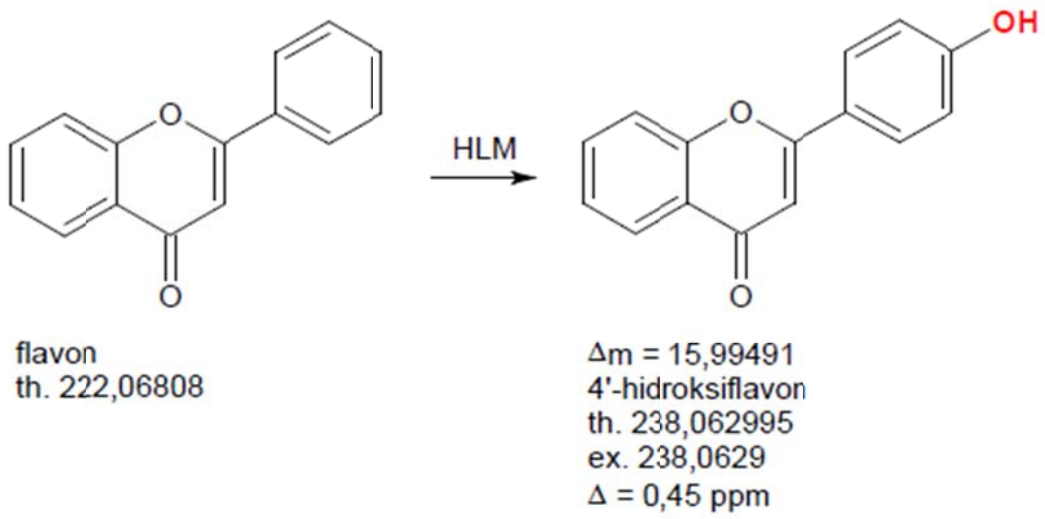
Compound Label	RT	Mass	Name	DB Formula	DB Diff (ppm)
Cpd 2: luteolin	5,85	286,0475	luteolin	C15 H10 O6	0,71

Compound Label	Name	*m/z*	RT	Algorithm	Mass
Cpd 2: luteolin	**luteolin**	287,0549	5,85	Find by Molecular Feature	286,0475

Slika 26e. Kromatogram izdvojenog iona i spektar masa detektiranog metabolita (luteolin) u inkubacijskoj smjesi diosmetina s HLM-om s dodanim NADPH-generirajućim sustavom.

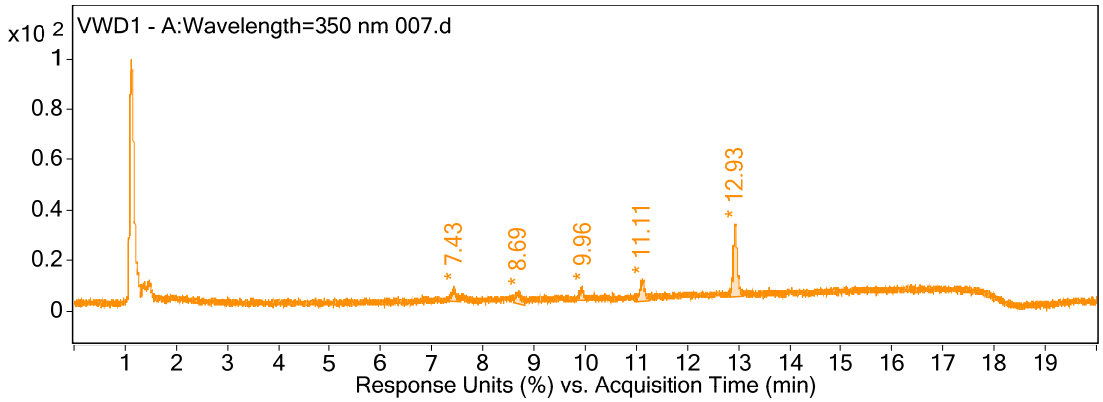
4.3.6 Flavon

U inkubacijama flavona s humanim jetrenim mikrosomima pomoću UV-detektora detektirano je formiranje jednog metabolita koji je identificiran kao 4'-hidroksiflavon. MS-detektorom primijećen je nastanak još nekoliko hidroksiliranih produkata s različitim vremenima elucije, ali u praktički zanemarivim količinama. Među njima identificirani su 6-hidroksiflavon i 7-hidroksiflavon. Pronalazak 4'-hidroksiflavona kao glavnog produkta metabolizma upućuje na aromatsku hidroksilaciju supstrata flavona koja je preferirana na položaju 4' prstena B (slika 27).

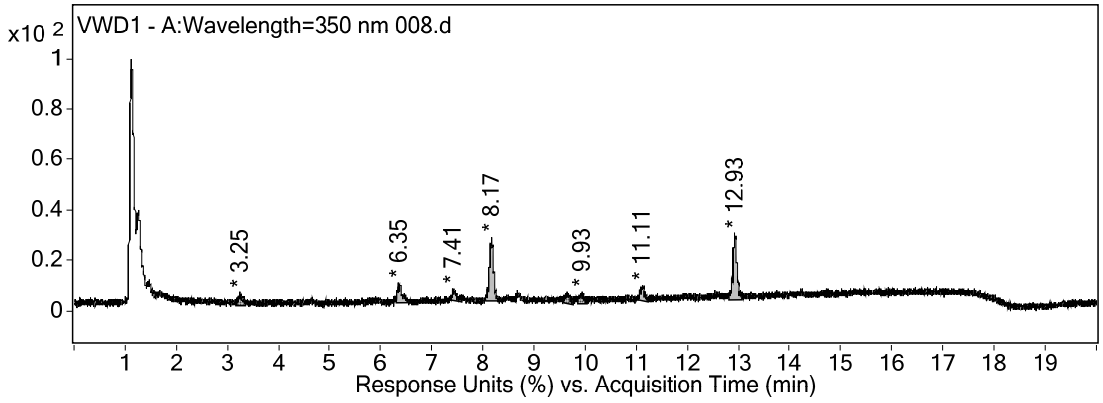


Slika 27. Metabolizam flavona posredovan HLM-om. Aromatskom hidroksilacijom flavona na položaju 4' prstena B nastaje glavni metabolit 4'-hidroksiflavon. Th = teoretska masa, ex = eksperimentalno određena masa.

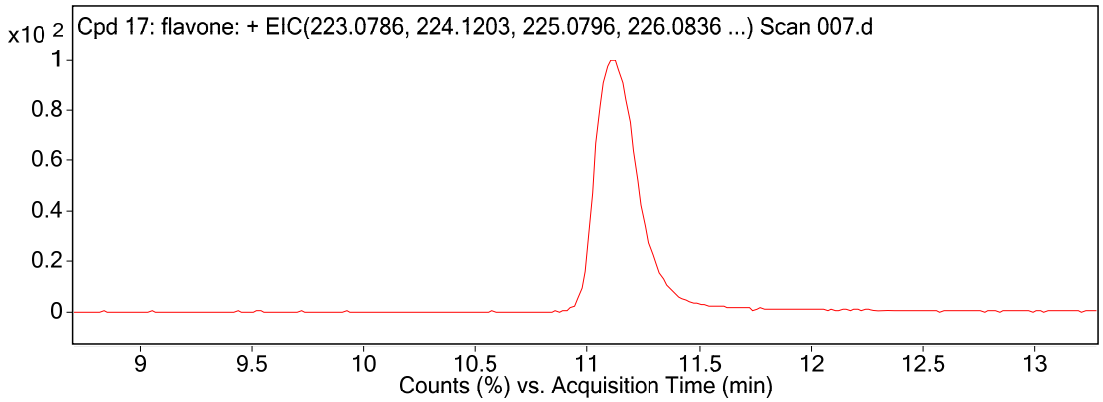
Na slikama 28a-f prikazani su LC/MS podaci na temelju kojih je karakteriziran metabolizam flavona posredovan HLM-om.

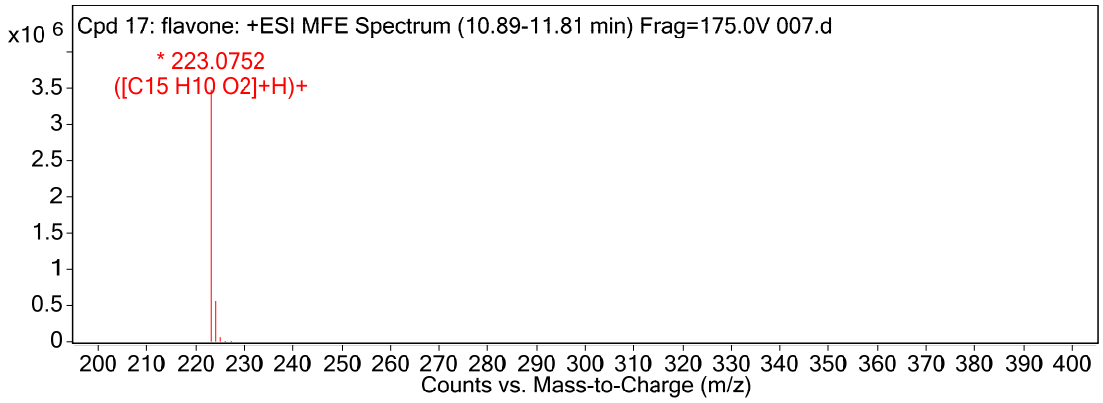


Slika 28a. UV kromatogram inkubacijske smjese flavona s HLM-om bez dodanog NADPH-generirajućeg sustava.



Slika 28b. UV kromatogram inkubacijske smjese flavona s HLM-om s dodanim NADPH-generirajućim sustavom.

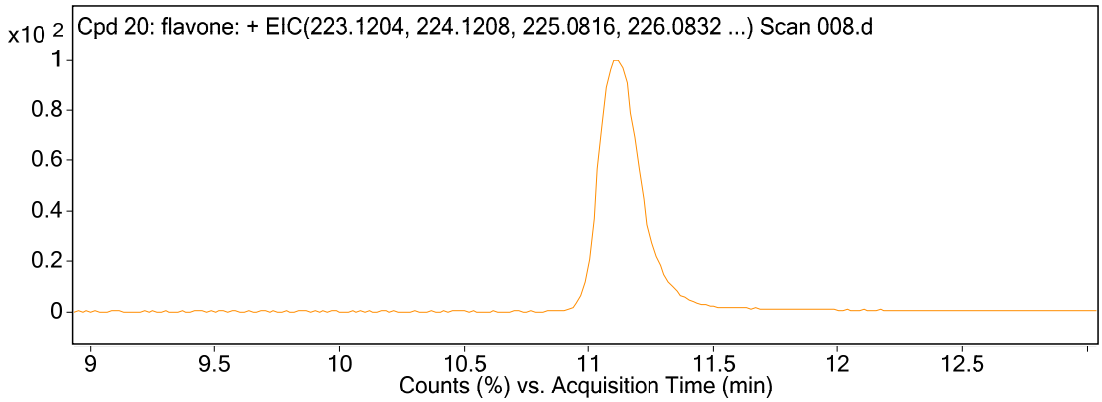


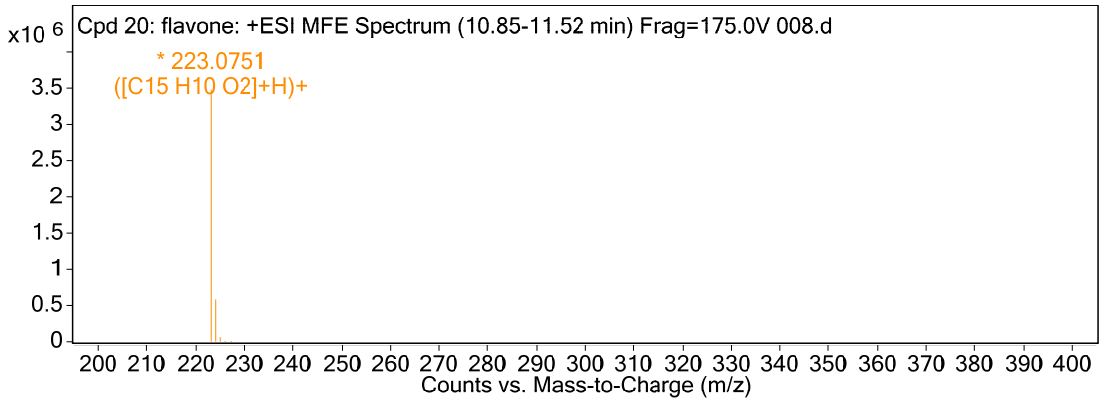


Compound Label	RT	Mass	MFG Formula	MFG Diff (ppm)	DB Formula	DB Diff (ppm)
Cpd 17: flavone	11,12	222,0679	C15 H10 O2	0,89	C15 H10 O2	0,9

Compound Label	Name	*m/z*	RT	Algorithm	Mass
Cpd 17: flavone	**flavone**	223,0752	11,12	Find by Molecular Feature	222,0679

Slika 28c. Kromatogram izdvojenog iona i spektar masa supstrata (flavon) u inkubacijskoj smjesi s HLM-om bez dodanog NADPH-generirajućeg sustava.

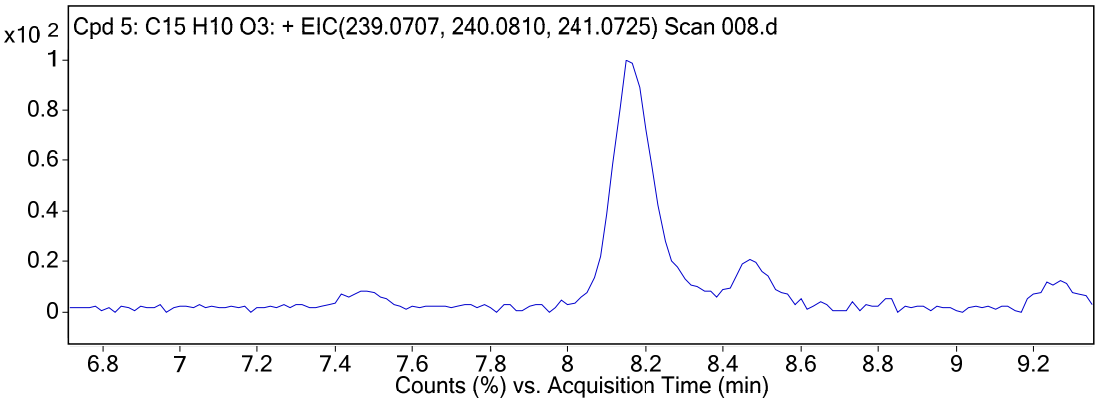


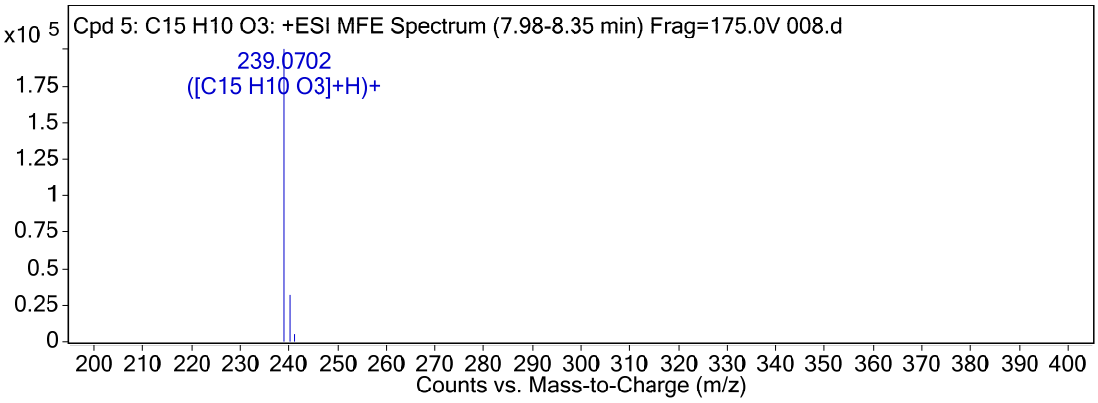


Compound Label	RT	Mass	MFG Formula	MFG Diff (ppm)	DB Formula	DB Diff (ppm)
Cpd 20: flavone	11,12	222,0679	C15 H10 O2	0,76	C15 H10 O2	0,76

Compound Label	Name	*m/z*	RT	Algorithm	Mass
Cpd 20: flavone	**flavone**	223,0751	11,12	Find by Molecular Feature	222,0679

Slika 28d. Kromatogram izdvojenog iona i spektar masa supstrata (flavona) u inkubacijskoj smjesi s HLM-om s dodanim NADPH-generirajućim sustavom.

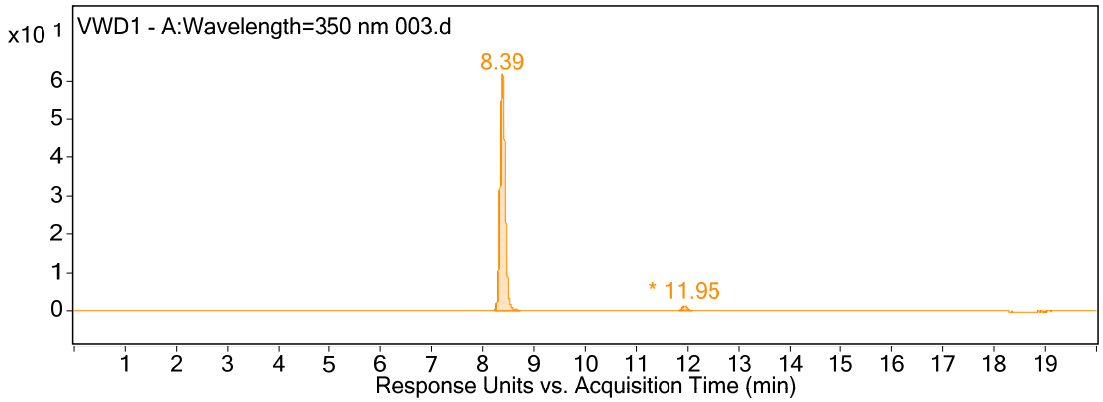


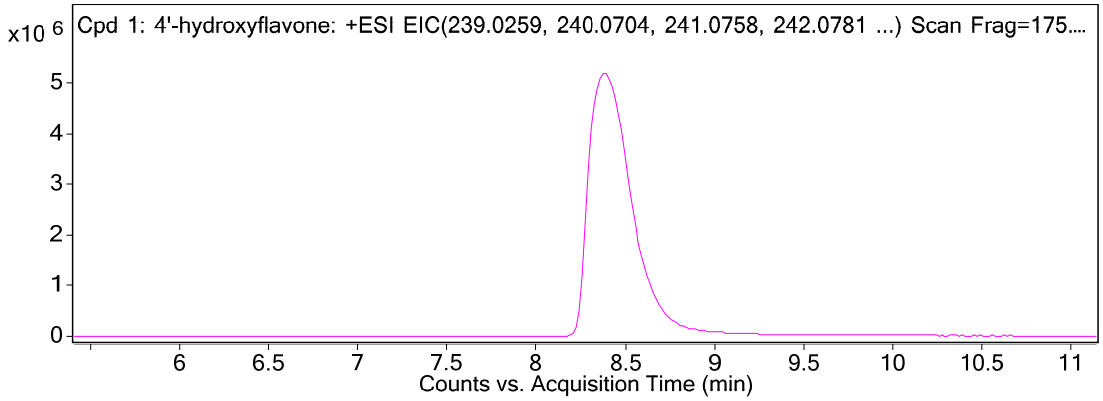


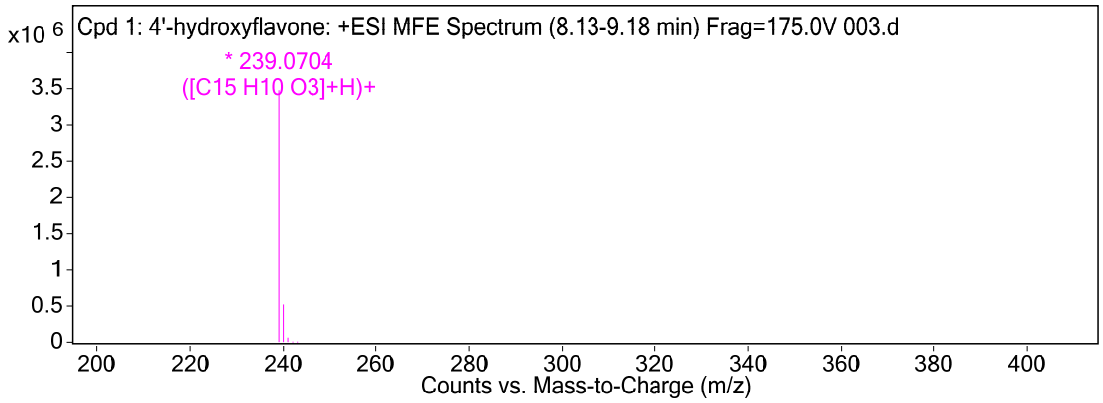
Compound Label	RT	Mass	MFG Formula	MFG Diff (ppm)
Cpd 5: C15 H10 O3	8,16	238,0629	C15 H10 O3	0,45

Compound Label	*m/z*	RT	Algorithm	Mass
Cpd 5: C15 H10 O3	239,0702	8,16	Find by Molecular Feature	238,0629

Slika 28e. Kromatogram izdvojenog iona i spektar masa detektiranog metabolita na RT = 8,16 min u inkubacijskoj smjesi flavona s HLM-om s dodanim NADPH-generirajućim sustavom.







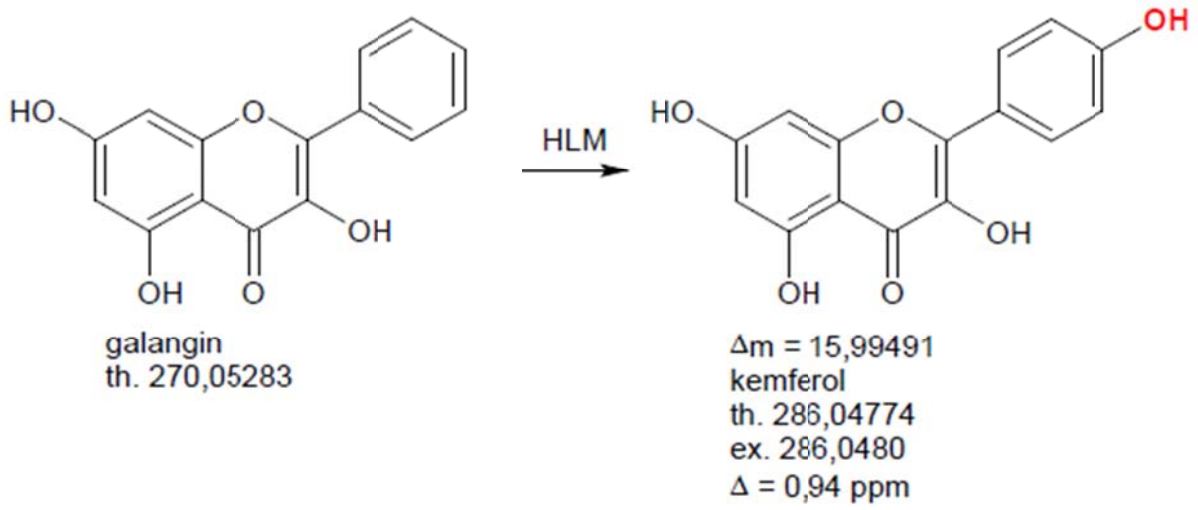
Compound Label	RT	Mass	Name	DB Formula	DB Diff (ppm)
Cpd 1: 4'-hydroxyflavone	8,4	238,0631	4'-hydroxyflavone	C15 H10 O3	-0,47

Compound Label	Name	*m/z*	RT	Algorithm	Mass
Cpd 1: 4'-hydroxyflavone	**4'-hydroxyflavone**	239,0704	8,4	Find by Molecular Feature	238,0631

Slika 28f. UV kromatogram, kromatogram izdvojenog iona i spektar masa poredbene otopine 4'-hidroksiflavona.

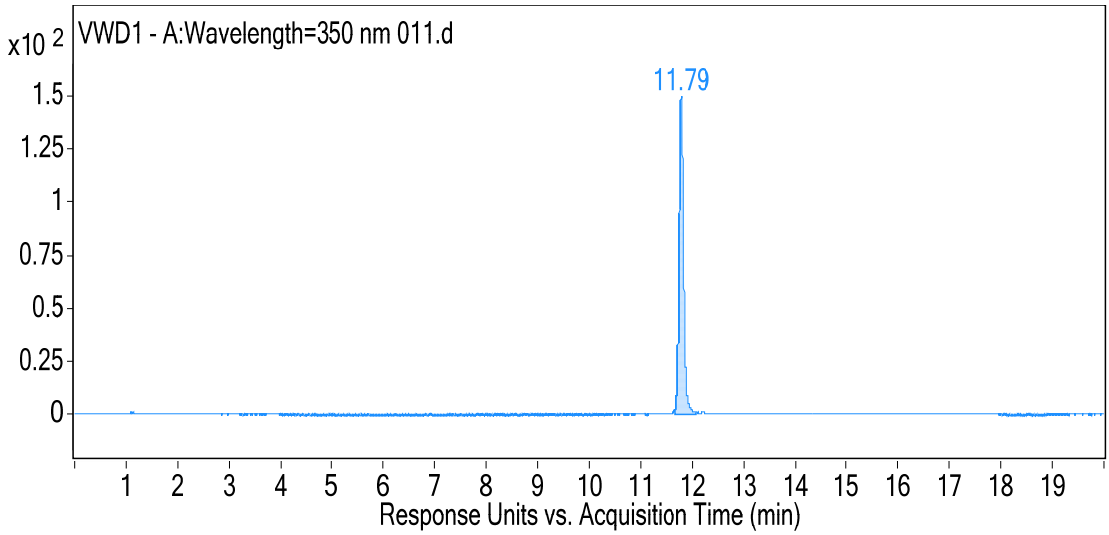
4.3.7 Galangin

U inkubacijama galangina s humanim jetrenim mikrosomima detektirano je formiranje jednog metabolita koji je identificiran kao kemferol. Pronalazak kemferola kao produkta metabolizma upućuje na aromatsku hidroksilaciju supstrata galangina na položaju 4' prstena B (slika 29).

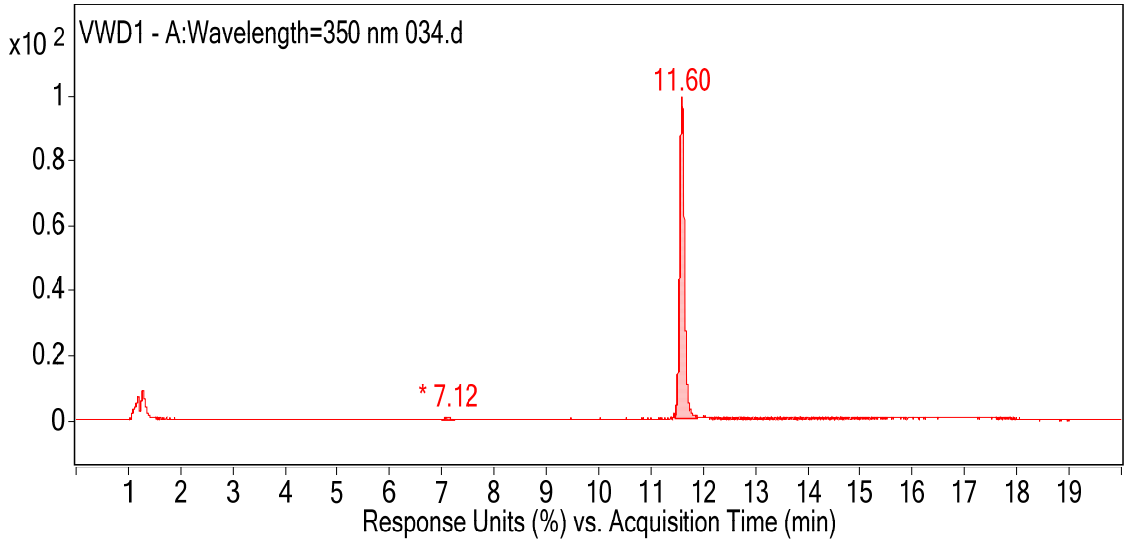


Slika 29. Metabolizam galangina posredovan HLM-om. Aromatskom hidroksilacijom flavona na položaju 4' prstena B nastaje jedini metabolit kemferol. Th = teoretska masa, ex = eksperimentalno određena masa.

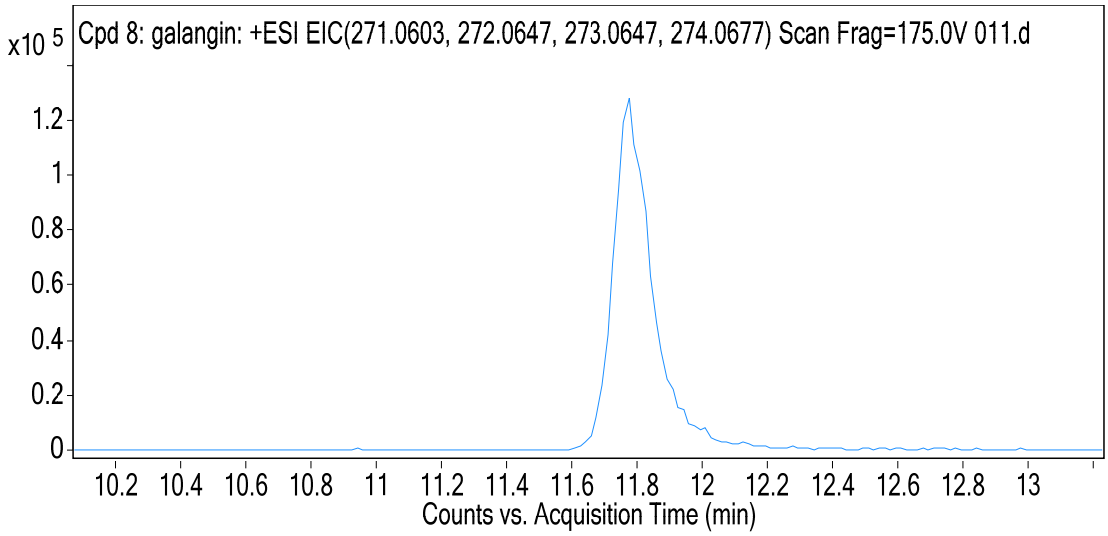
Na slikama 30a-f prikazani su LC/MS podaci na temelju kojih je karakteriziran metabolizam galangina posredovan HLM-om.

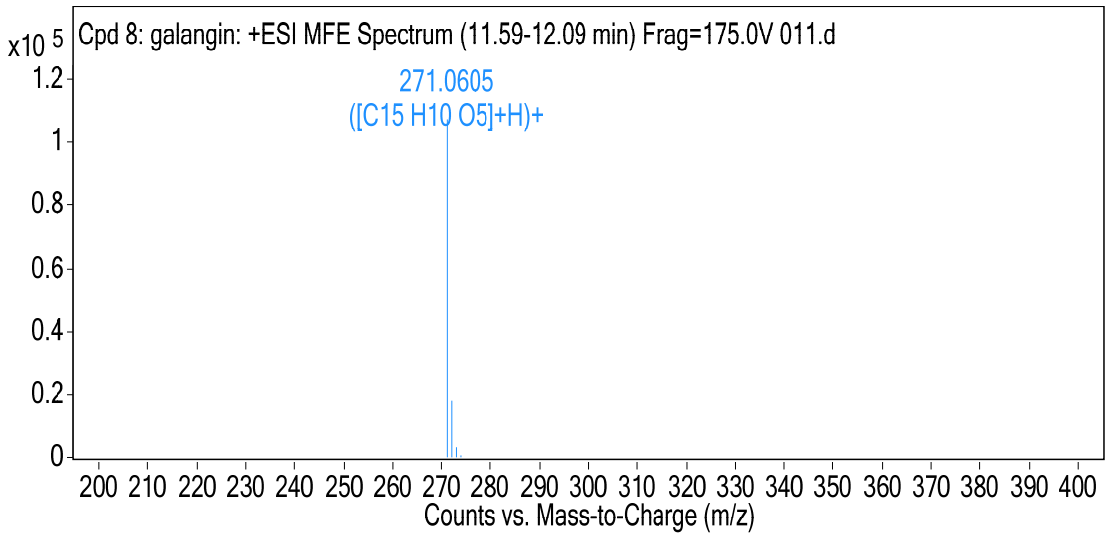


Slika 30a. UV kromatogram inkubacijske smjese galangina s HLM-om bez dodanog NADPH-generirajućeg sustava.



Slika 30b. UV kromatogram inkubacijske smjese galangina s HLM-om s dodanim NADPH-generirajućim sustavom.

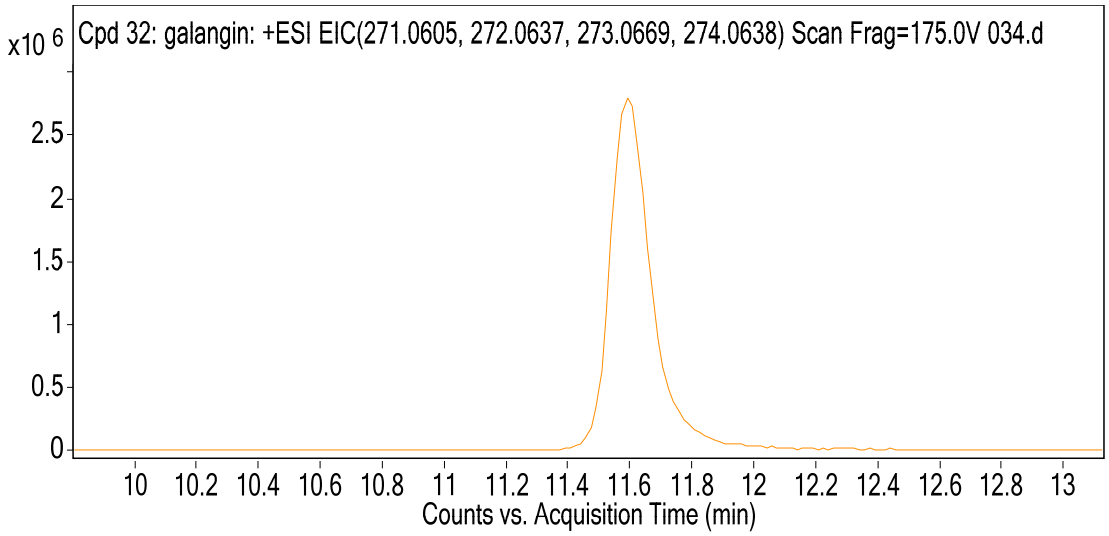


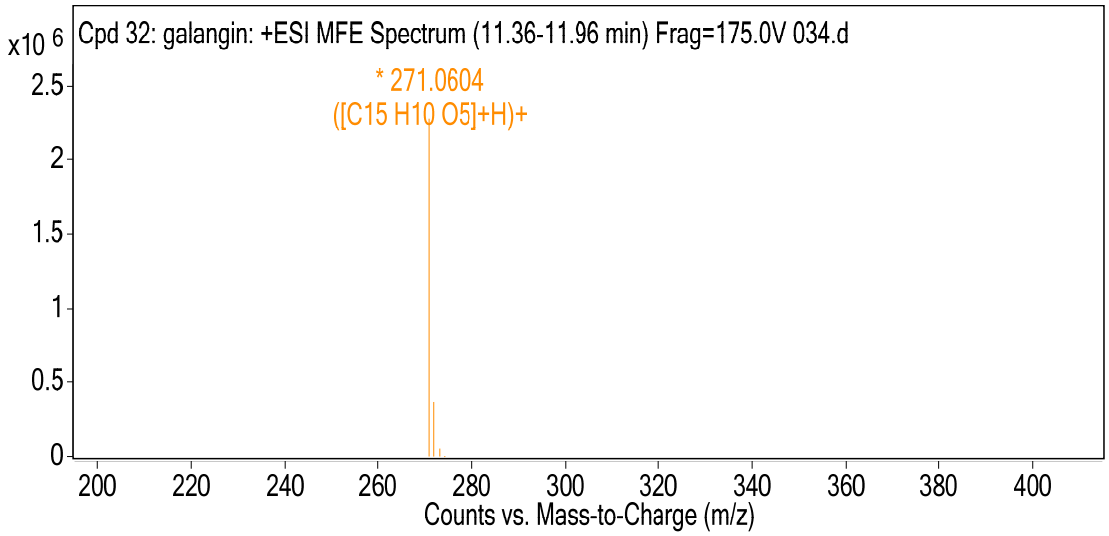


Compound Label	RT	Mass	Name	DB Formula	DB Diff (ppm)
Cpd 8: galangin	11,78	270,0531	galangin	C15 H10 O5	-1,21

Compound Label	Name	*m/z*	RT	Algorithm	Mass
Cpd 8: galangin	**galangin**	271,0605	11,78	Find by Molecular Feature	270,0531

Slika 30c. Kromatogram izdvojenog iona i spektar masa supstrata (galangin) u inkubacijskoj smjesi galangina s HLM-om bez dodanog NADPH-generirajućeg sustava.

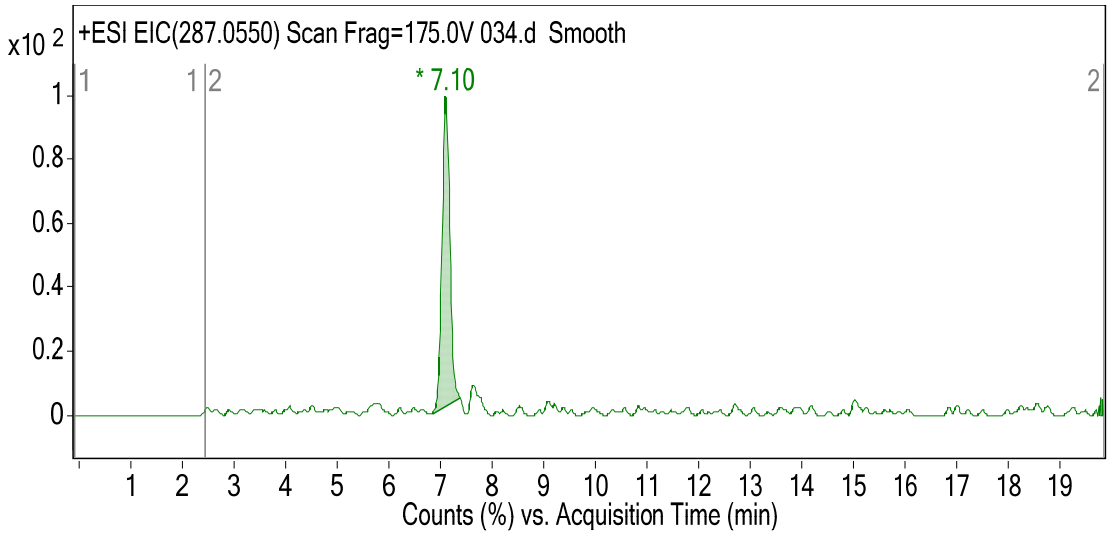




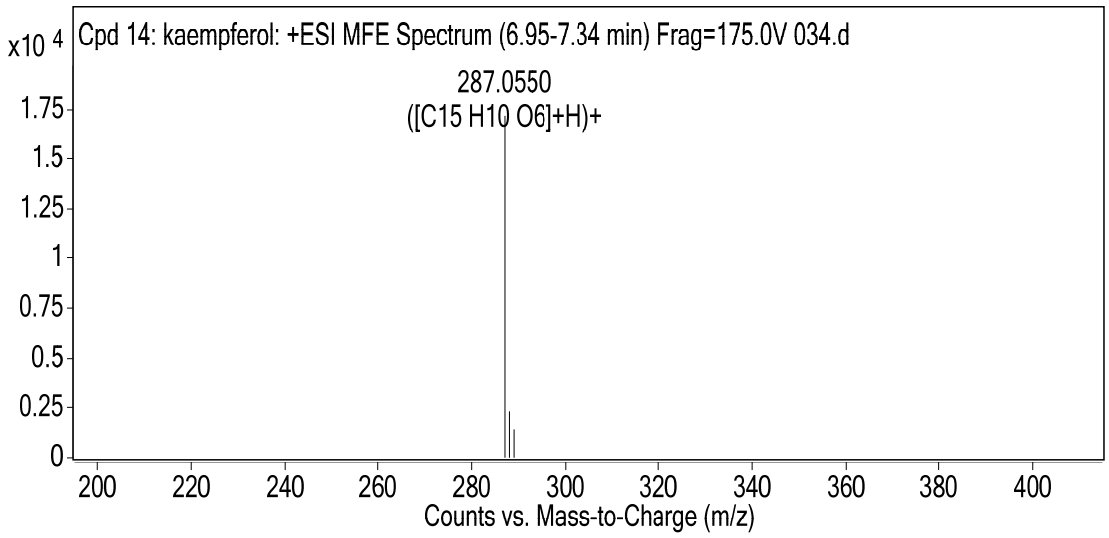
Compound Label	RT	Mass	Name	DB Formula	DB Diff (ppm)
Cpd 32: galangin	11,6	270,0531	galangin	C15 H10 O5	-1,04

Compound Label	Name	*m/z*	RT	Algorithm	Mass
Cpd 32: galangin	**galangin**	271,0604	11,6	Find by Molecular Feature	270,0531

Slika 30d. Kromatogram izdvojenog iona i spektar masa supstrata (galangin) u inkubacijskoj smjesi galangina s HLM-om s dodanim NADPH-generirajućim sustavom.



Slika 30e. Kromatogram izdvojenog iona *m/z* 287,0550 (kemferol) u inkubacijskoj smjesi galangina s HLM-om s dodanim NADPH-generirajućim sustavom.



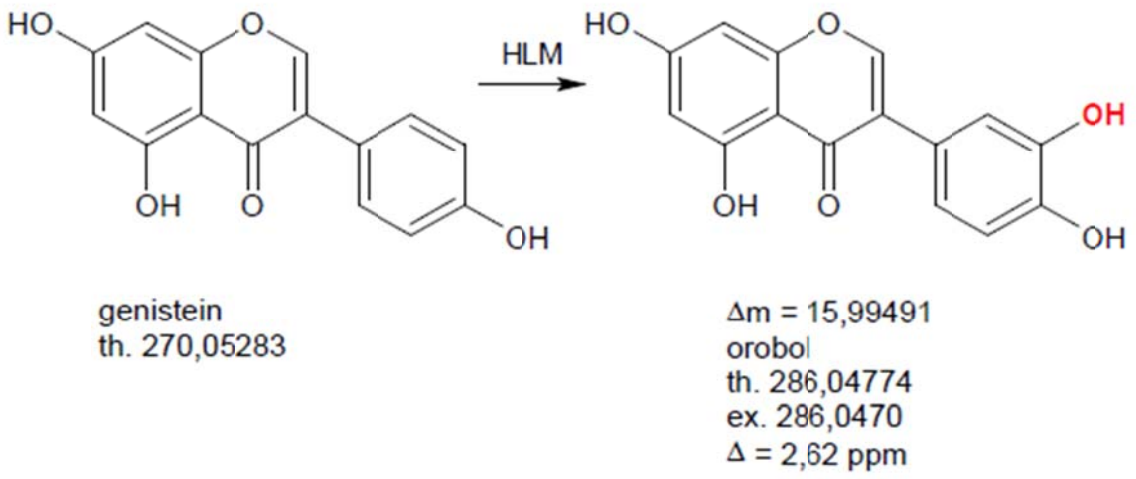
Compound Label	RT	Mass	Name	DB Formula	DB Diff (ppm)
Cpd 14: kaempferol	7,11	286,048	kaempferol	C15 H10 O6	-0,94

Compound Label	Name	*m/z*	RT	Algorithm	Mass
Cpd 14: kaempferol	**kaempferol**	287,055	7,11	Find by Molecular Feature	286,048

Slika 30f. Spektar masa detektiranog metabolita na RT = 7,11 (kemferol) u inkubacijskoj smjesi galangina s HLM-om s dodanim NADPH-generirajućim sustavom.

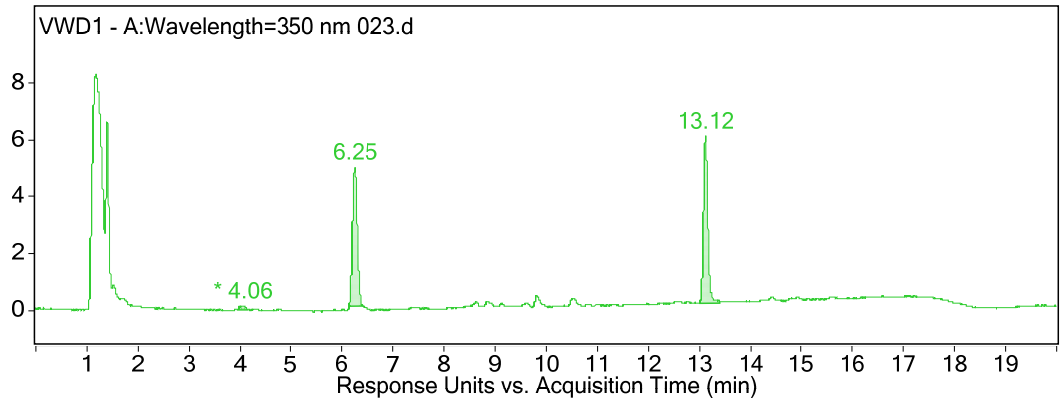
4.3.8 Genistein

U inkubacijama genisteina s humanim jetrenim mikrosomima detektirano je formiranje jednog metabolita koji je identificiran kao orobol. Pronalazak orobola kao produkta metabolizma upućuje na aromatsku hidroksilaciju supstrata genisteina na položaju 3' prstena B (slika 31).

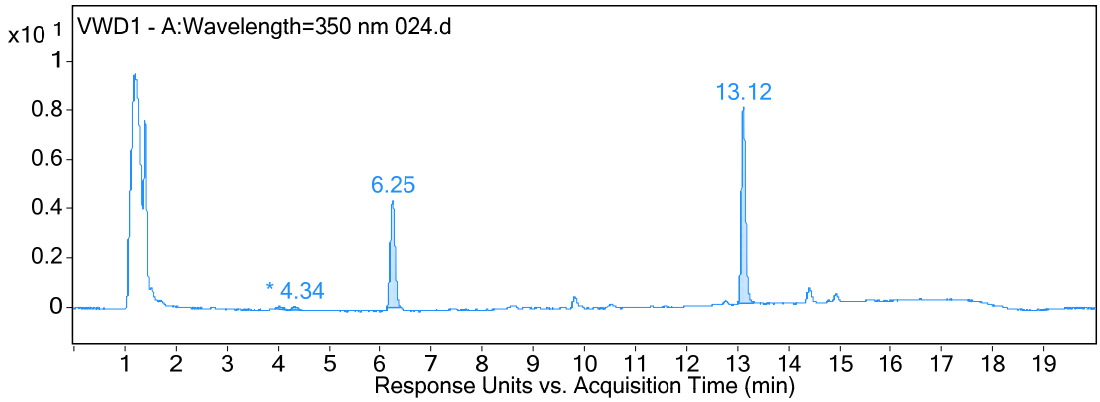


Slika 31. Metabolizam genisteina posredovan HLM-om. Aromatskom hidroksilacijom genisteina na položaju 3' prstena B nastaje jedini metabolit orobol. Th = teoretska masa, ex = eksperimentalno određena masa.

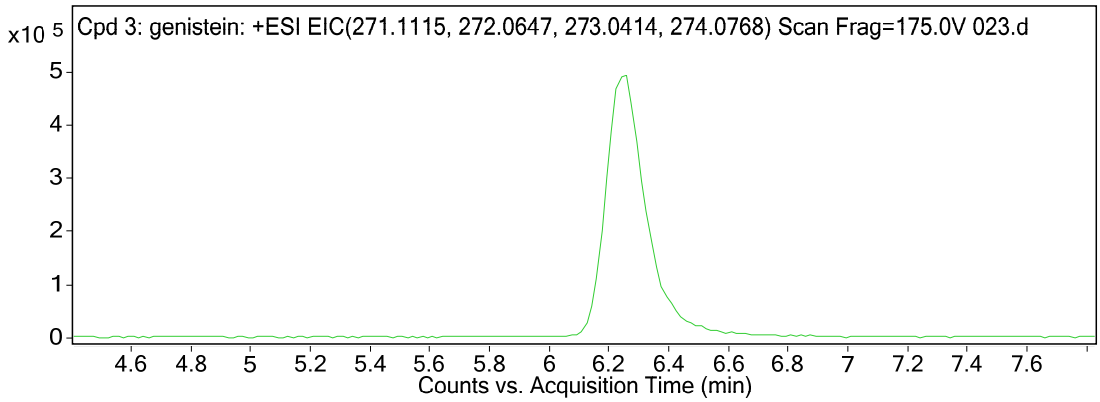
Na slikama 32a-f prikazani su LC/MS podaci na temelju kojih je karakteriziran metabolizam genisteina posredovan HLM-om.

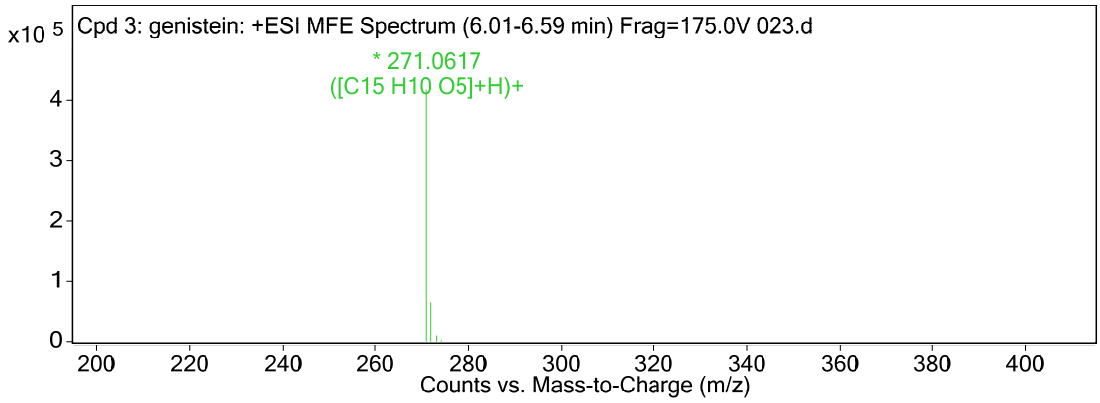


Slika 32a. UV kromatogram inkubacijske smjese genisteina s HLM-om bez dodanog NADPH-generirajućeg sustava.



Slika 32b. UV kromatogram inkubacijske smjese genisteina s HLM-om s dodanim NADPH-generirajućim sustavom.

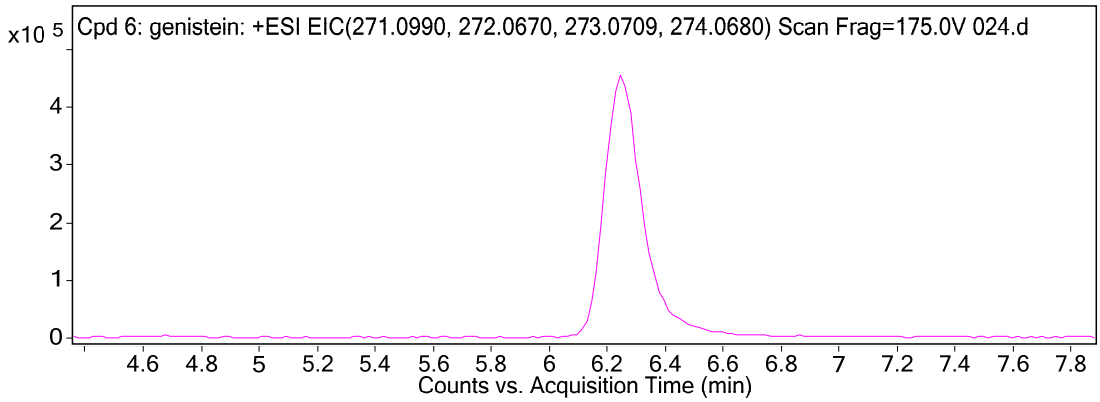


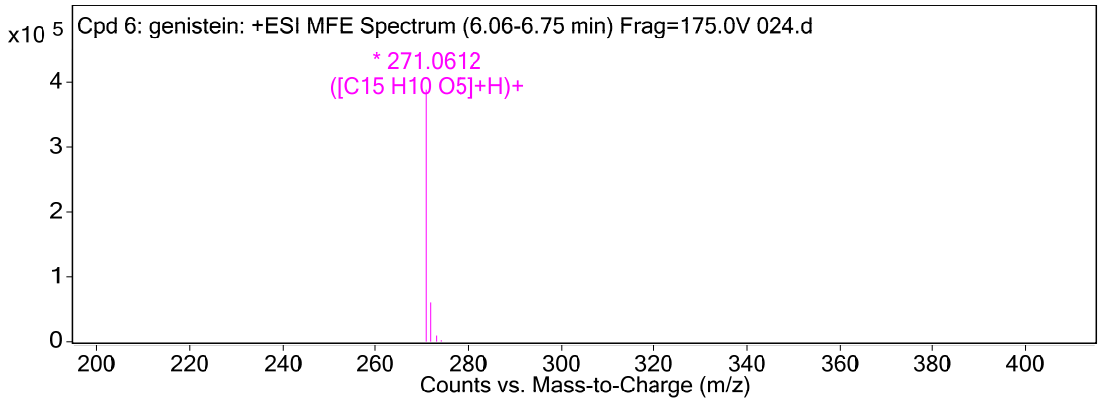


Compound Label	RT	Mass	Name	DB Formula	DB Diff (ppm)
Cpd 3: genistein	6,25	270,0542	genistein	C15 H10 O5	-4,99

Compound Label	Name	*m/z*	RT	Algorithm	Mass
Cpd 3: genistein	**genistein**	271,0617	6,25	Find by Molecular Feature	270,0542

Slika 32c. Kromatogram izdvojenog iona i spektar masa supstrata (genistein) u inkubacijskoj smjesi s HLM-om bez dodanog NADPH-generirajućeg sustava.

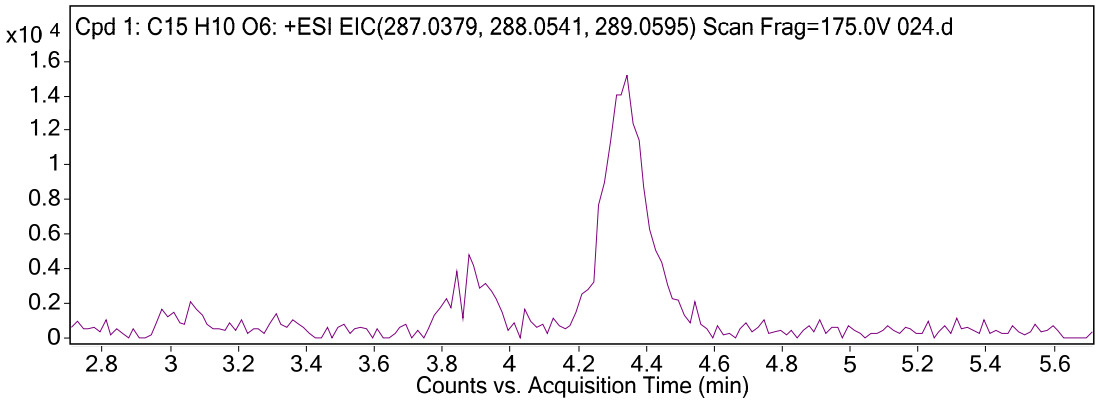


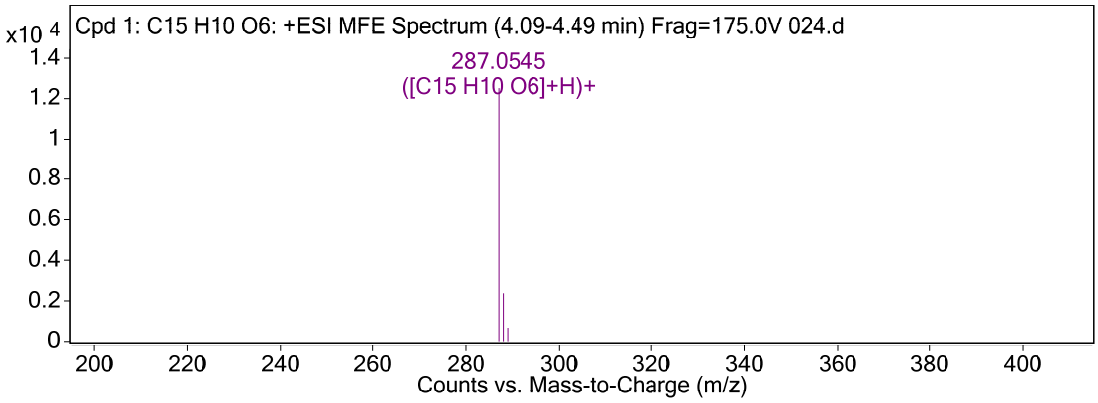


Compound Label	RT	Mass	Name	DB Formula	DB Diff (ppm)
Cpd 6: genistein	6,25	270,0538	genistein	C15 H10 O5	-3,65

Compound Label	Name	*m/z*	RT	Algorithm	Mass
Cpd 6: genistein	**genistein**	271,0612	6,25	Find by Molecular Feature	270,0538

Slika 32d. Kromatogram izdvojenog iona i spektar masa supstrata (genistein) u inkubacijskoj smjesi s HLM-om s dodanim NADPH-generirajućim sustavom.

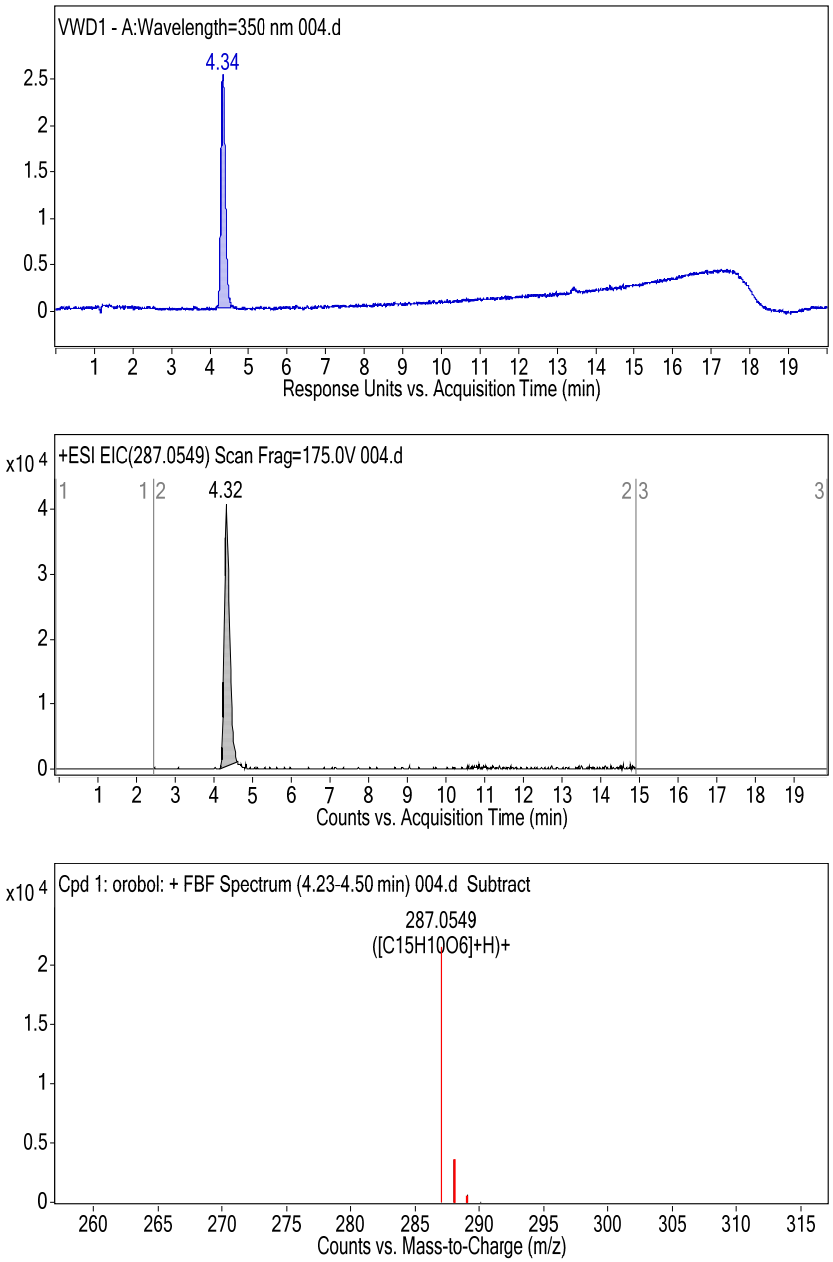




Compound Label	RT	Mass	MFG Formula	MFG Diff (ppm)
Cpd 1: C15 H10 O6	4,33	286,047	C15 H10 O6	2,62

Compound Label	*m/z*	RT	Algorithm	Mass
Cpd 1: C15 H10 O6	287,0545	4,33	Find by Molecular Feature	286,047

Slika 32e. Kromatogram izdvojenog iona i spektar masa detektiranog metabolita na RT = 4,33 min u inkubacijskoj smjesi genisteina s HLM-om s dodanim NADPH-generirajućim sustavom.

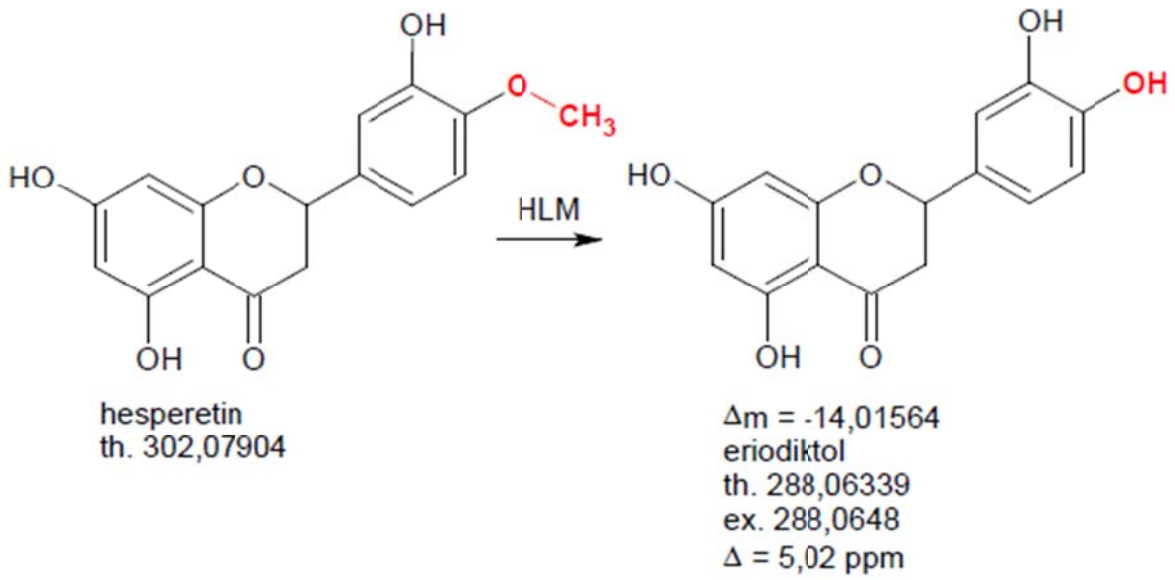


Compound Label	RT	Mass	Name	MFG Formula	Diff (ppm)
Cpd 1: orobol	4,32	286,0476	orobol	C15 H10 O6	-0,52

Slika 32f. UV kromatogram, kromatogram izdvojenog iona i spektar masa poredbene otopine orobola.

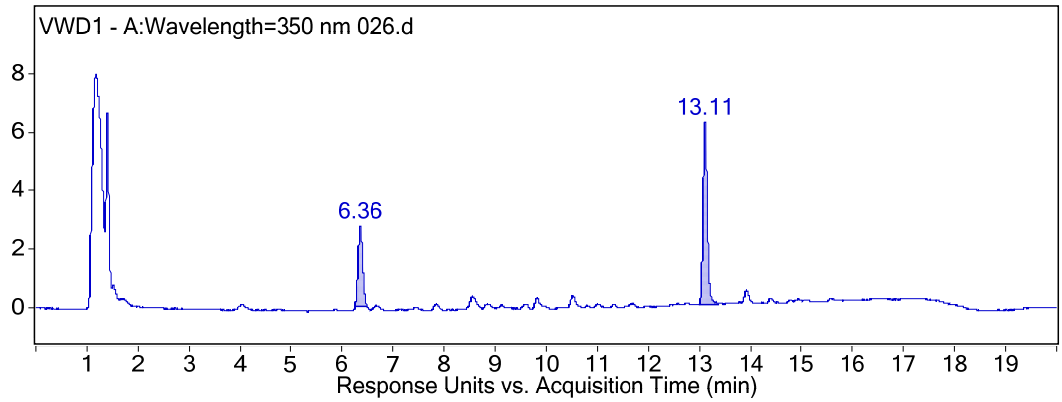
4.3.9 Hesperetin

U inkubacijama hesperetina s humanim jetrenim mikrosomima detektirano je formiranje jednog metabolita koji je identificiran kao eriodiktiol. Pronalazak eriodiktiola kao produkta metabolizma upućuje na *O*-demetilaciju supstrata hesperetina na položaju 4' prstena B (slika 33).

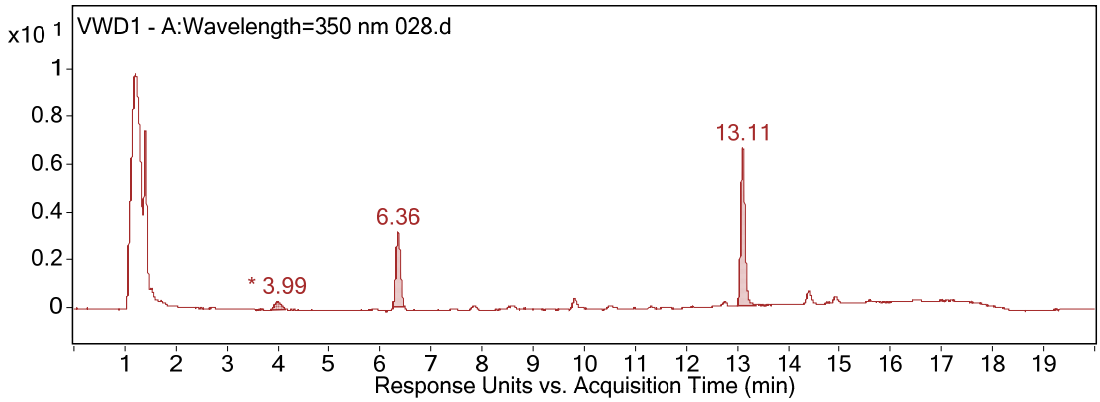


Slika 33. Metabolizam hesperetina posredovan HLM-om. Jedini metabolit eriodiktiol nastaje *O*-demetilacijom hesperetina na položaju 4' prstena B. Th = teoretska masa, ex = eksperimentalno određena masa.

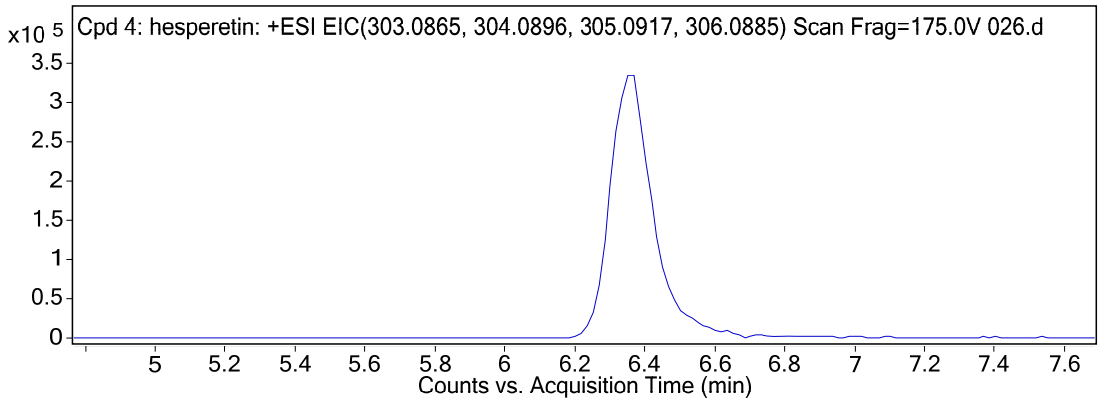
Na slikama 34a-e prikazani su LC/MS podaci na temelju kojih je karakteriziran metabolizam hesperetina posredovan HLM-om.

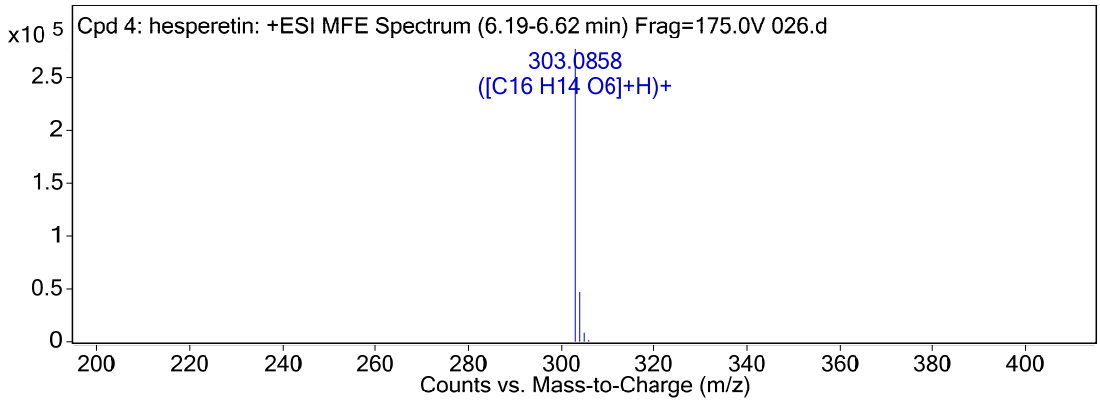


Slika 34a. UV kromatogram inkubacijske smjese hesperetina s HLM-om bez dodanog NADPH-generirajućeg sustava.



Slika 34b. UV kromatogram inkubacijske smjese hesperetina s HLM-om s dodanim NADPH-generirajućim sustavom.

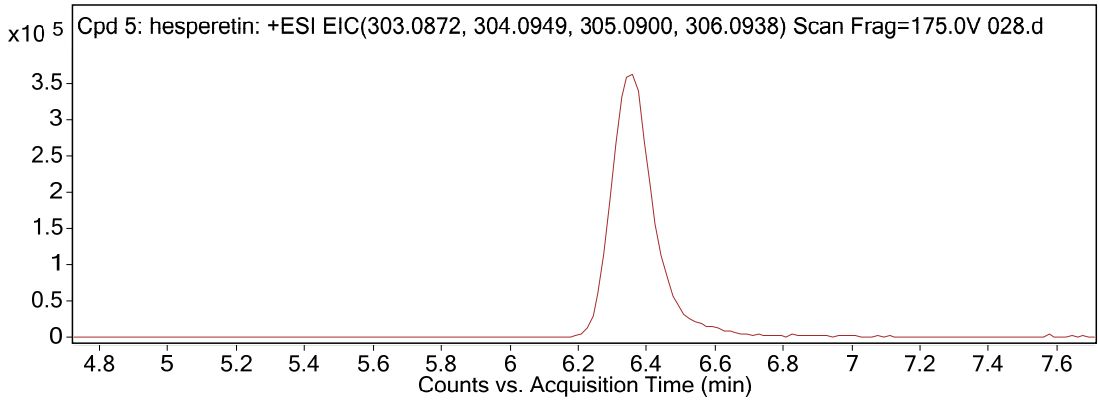


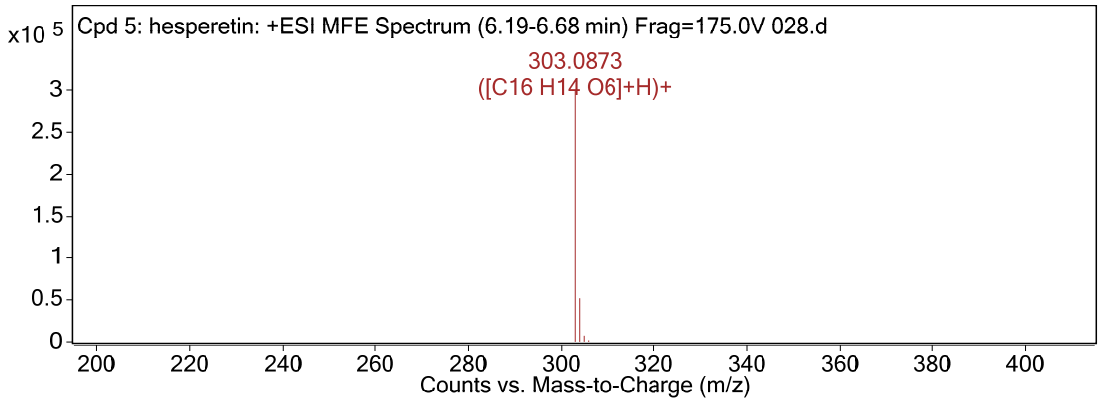


Compound Label	RT	Mass	Name	DB Formula	DB Diff (ppm)
Cpd 4: hesperetin	6,36	302,0785	hesperetin	C16 H14 O6	1,69

Compound Label	Name	*m/z*	RT	Algorithm	Mass
Cpd 4: hesperetin	**hesperetin**	303,0858	6,36	Find by Molecular Feature	302,0785

Slika 34c. Kromatogram izdvojenog iona i spektar masa supstrata (hesperetin) u inkubacijskoj smjesi s HLM-om bez dodanog NADPH-generirajućeg sustava.

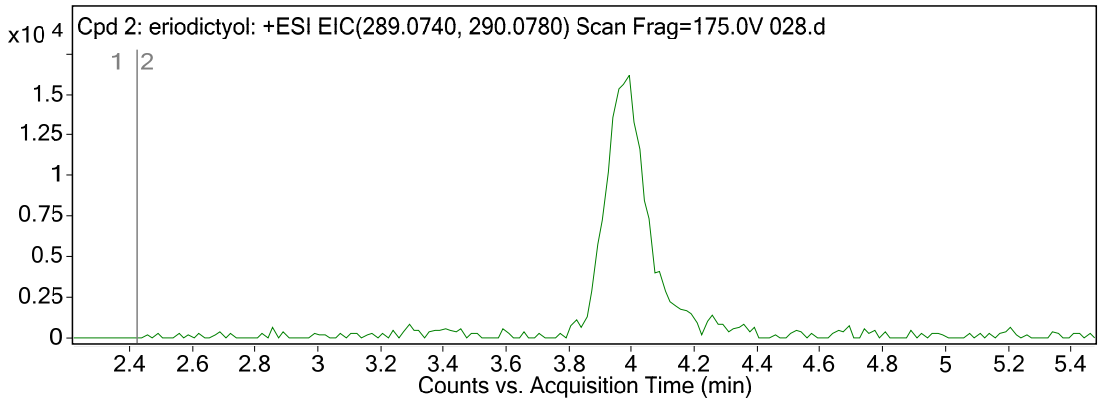


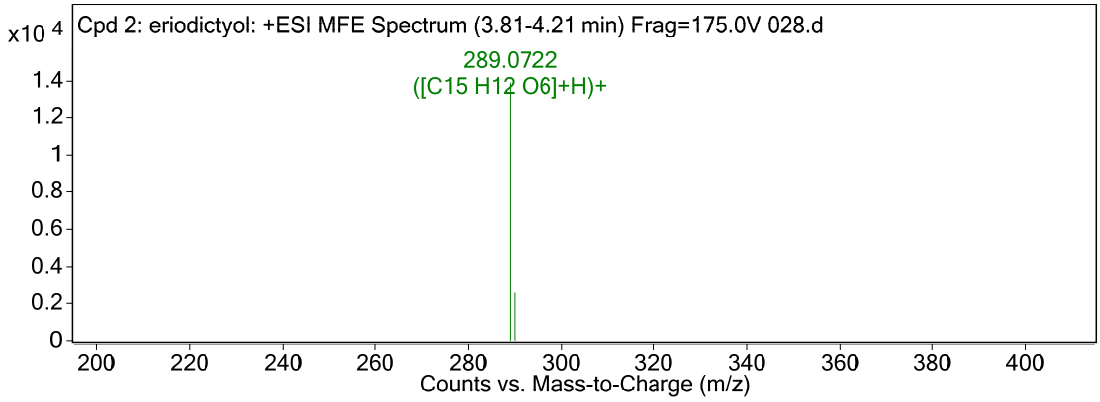


Compound Label	RT	Mass	Name	DB Formula	DB Diff (ppm)
Cpd 5: hesperetin	6,35	302,0799	hesperetin	C16 H14 O6	-2,78

Compound Label	Name	*m/z*	RT	Algorithm	Mass
Cpd 5: hesperetin	**hesperetin**	303,0873	6,35	Find by Molecular Feature	302,0799

Slika 34d. Kromatogram izdvojenog iona i spektar masa supstrata (hesperetin) u inkubacijskoj smjesi s HLM-om s dodanim NADPH-generirajućim sustavom.





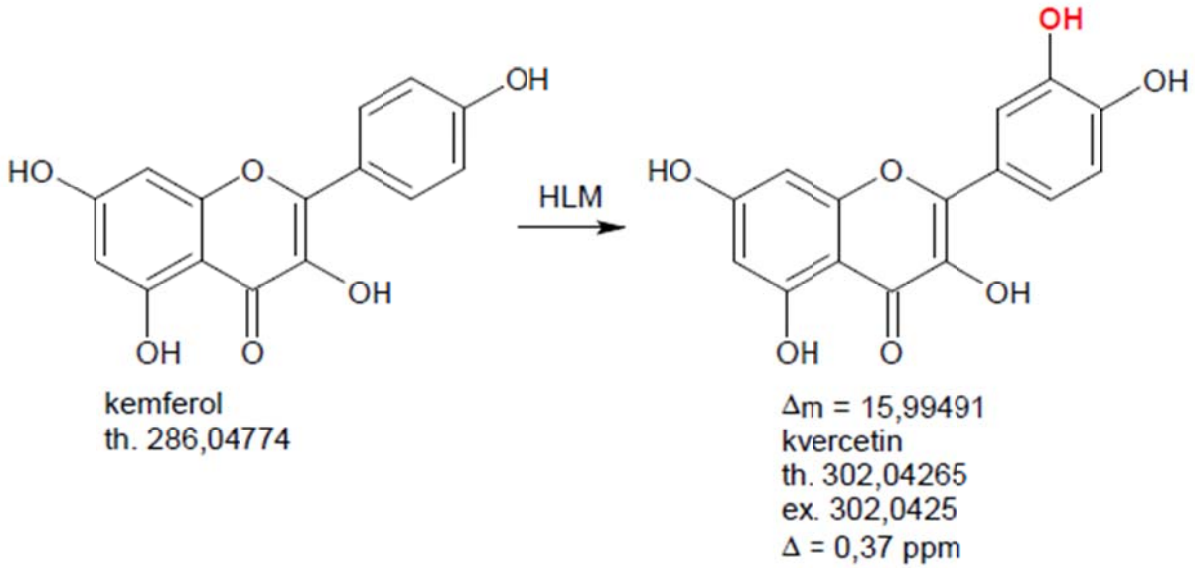
Compound Label	RT	Mass	Name	DB Formula	DB Diff (ppm)
Cpd 2: eriodictyol	3,98	288,0648	eriodictyol	C15 H12 O6	-5,02

Compound Label	Name	*m/z*	RT	Algorithm	Mass
Cpd 2: eriodictyol	**eriodictyol**	289,0722	3,98	Find by Molecular Feature	288,0648

Slika 34e. Kromatogram izdvojenog iona i spektar masa detektiranog metabolita (eriodiktiol) u inkubacijskoj smjesi hesperetina s HLM-om s dodanim NADPH-generirajućim sustavom.

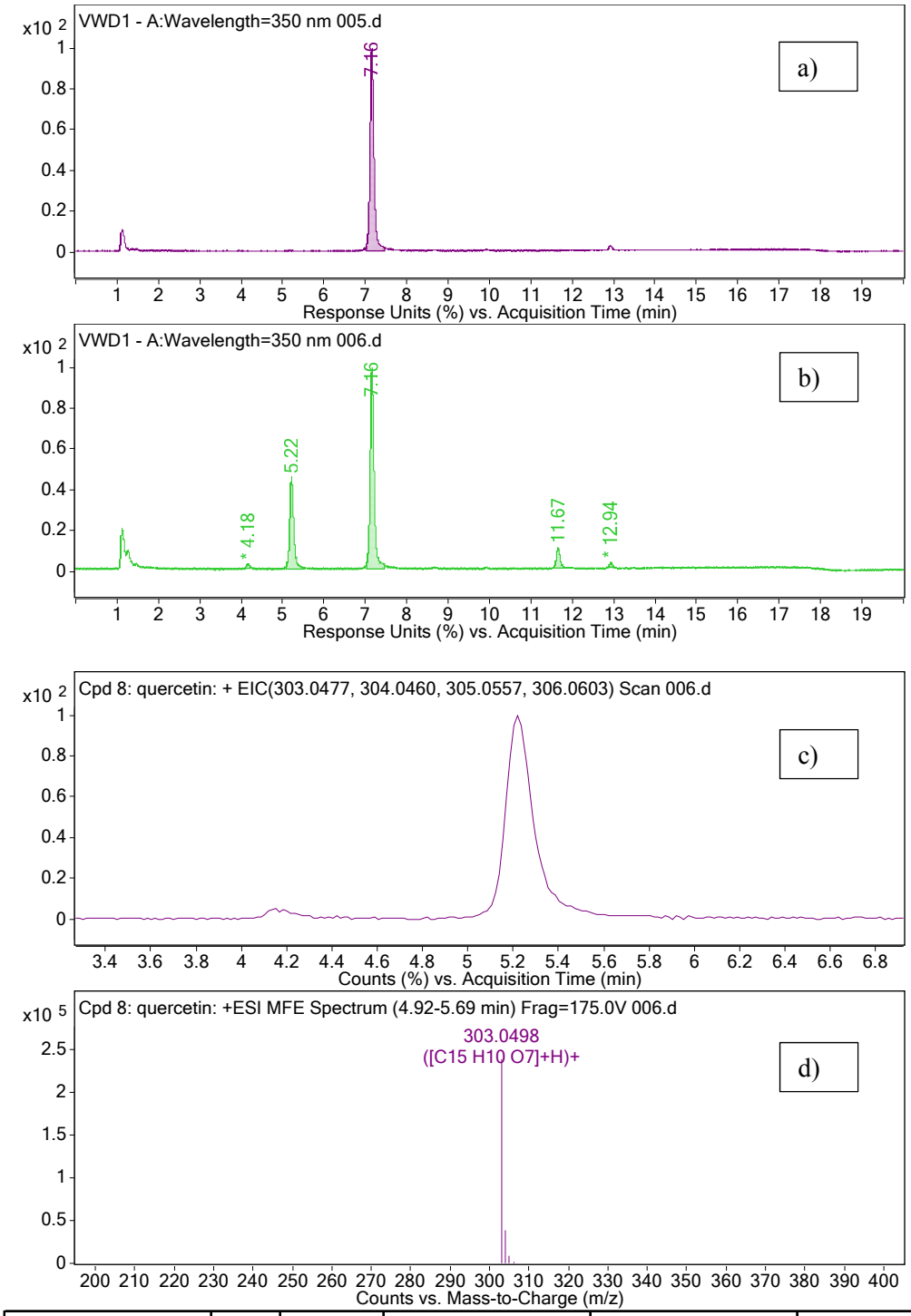
4.3.10 Kemferol

U inkubacijama kemferola s humanim jetrenim mikrosomima detektirano je formiranje jednog metabolita koji je identificiran kao kvercetin. Pronalazak kvercetina kao produkta metabolizma upućuje na aromatsku hidroksilaciju supstrata kemferola na položaju 3' prstena B (slika 35).



Slika 35. Metabolizam kemferola posredovan HLM-om. Aromatskom hidroksilacijom kemferola na položaju 3' prstena B nastaje jedini metabolit kvercetin. Th = teoretska masa, ex = eksperimentalno određena masa.

Na slici 36a-d prikazani su LC/MS podaci na temelju kojih je karakteriziran metabolizam kemferola posredovan HLM-om.



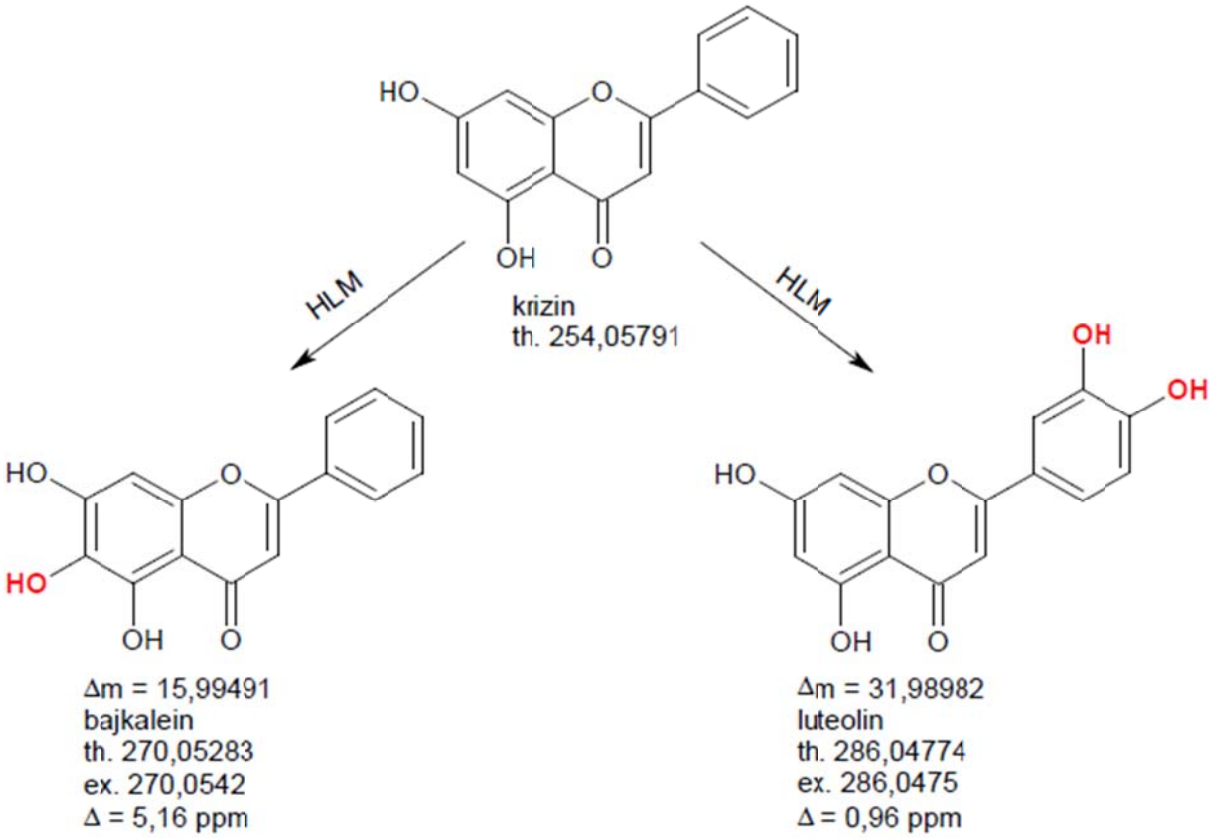
Compound Label	RT	Mass	Name	DB Formula	DB Diff (ppm)
Cpd 8: quercetin	5,22	302,0425	quercetin	C15 H10 O7	0,37

Compound Label	Name	*m/z*	RT	Algorithm	Mass
Cpd 8: quercetin	**quercetin**	303,0498	5,22	Find by Molecular Feature	302,0425

Slika 36. Identifikacija metabolita nastalih u inkubacijama kemferola s HLM-om: a) UV kromatogram inkubacijske smjese bez dodanog NADPH-generirajućeg sustava, b) UV kromatogram inkubacijske smjese s dodanim NADPH-generirajućim sustavom, c) kromatogram izdvojenog iona *m/z* 303,0498 (kvercetin) u inkubacijskoj smjesi s dodanim NADPH-generirajućim sustavom, d) spektar masa detektiranog metabolita na RT = 5,22 min (kvercetin) u inkubacijskoj smjesi s dodanim NADPH-generirajućim sustavom.

4.3.11 Krizin

U inkubacijama krizina s humanim jetrenim mikrosomima detektirano je formiranje dvaju metabolita, bajkaleina i luteolina. Oba produkta nastala su djelovanjem citokroma P450 aromatskom hidroksilacijom na položaju 6 prstena A (bajkalein), te dvostrukom aromatskom hidroksilacijom prstena B na položajima 3' i 4' (luteolin) (slika 37).

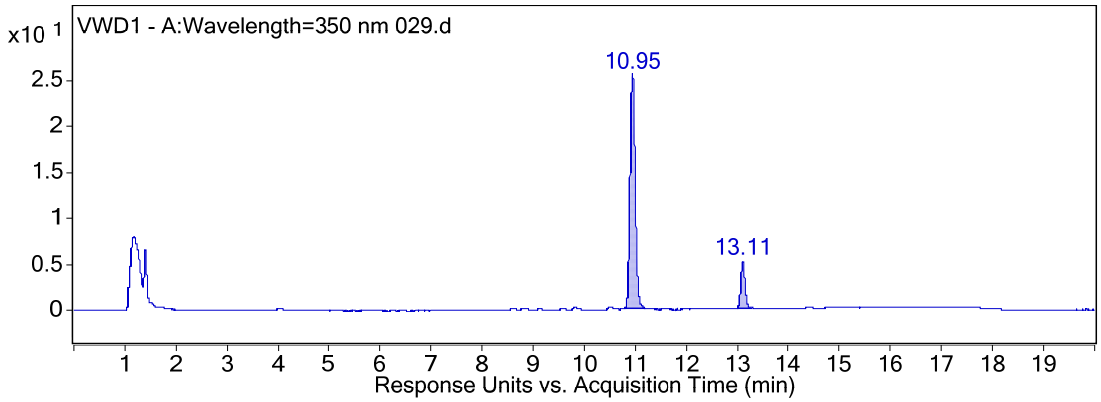


Slika 37. Metabolizam krizina posredovan HLM-om. Nastali odvojenim metaboličkim putevima aromatskom hidroksilacijom krizina detektirana su dva produkta metabolizma: jednostrukom hidroksilacijom na položaju 6 prstena A nastao je bajkalein, dok je dvostrukom hidroksilacijom na položajima 3' i 4' prstena B nastao luteolin. Pritom nije detektiran jednostruko hidroksilirani međuprodukt (npr. apigenin). Th = teoretska masa, ex = eksperimentalno određena masa.

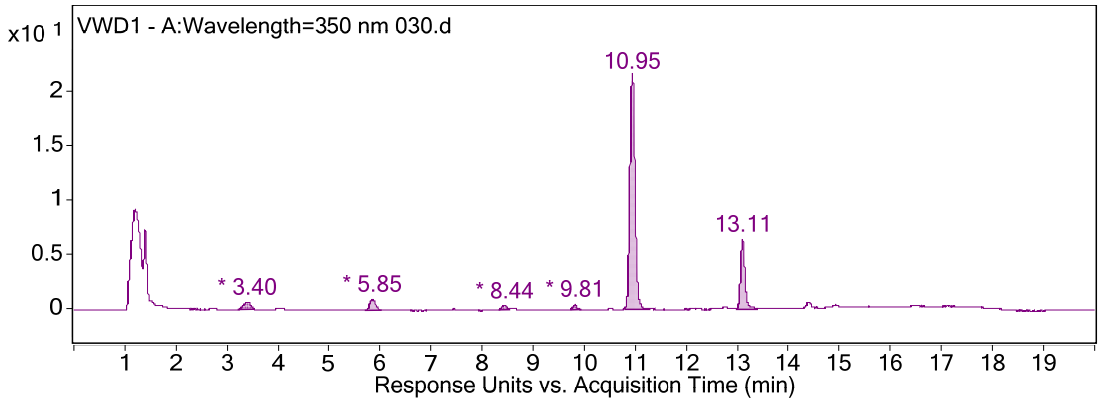
Ovdje je potrebno istaknuti da uz luteolin kao produkt metabolizma iznenađujuće nije pronađen jednostruko hidroksilirani međuprodukt (npr. apigenin), čak niti u tragovima. Naime, u svim dosadašnjim slučajevima u kojima je primijećena kombinirana reakcija (dvostruka hidroksilacija ili demetilacija/hidroksilacija), utvrđeno je da se zbivala

distributivno, preko jednostruko hidroksiliranog/demetiliranog međuprodukta. Oba metabolita zastupljena su u približno jednakim količinama što ukazuje na to da nijedan od ovih metaboličkih puteva kataliziranih citokromima P450 nije preferiran.

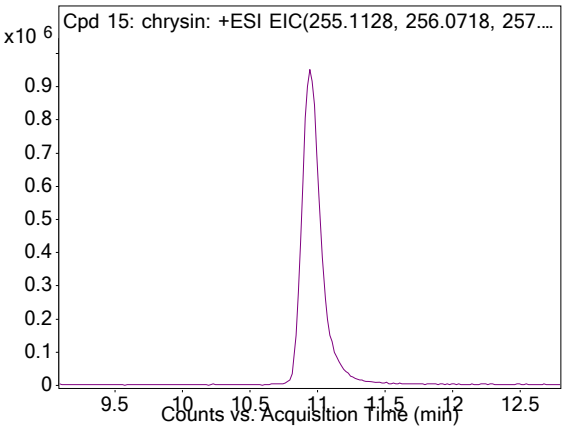
Na slikama 38a-h prikazani su LC/MS podaci na temelju kojih je karakteriziran metabolizam krizina posredovan HLM-om.

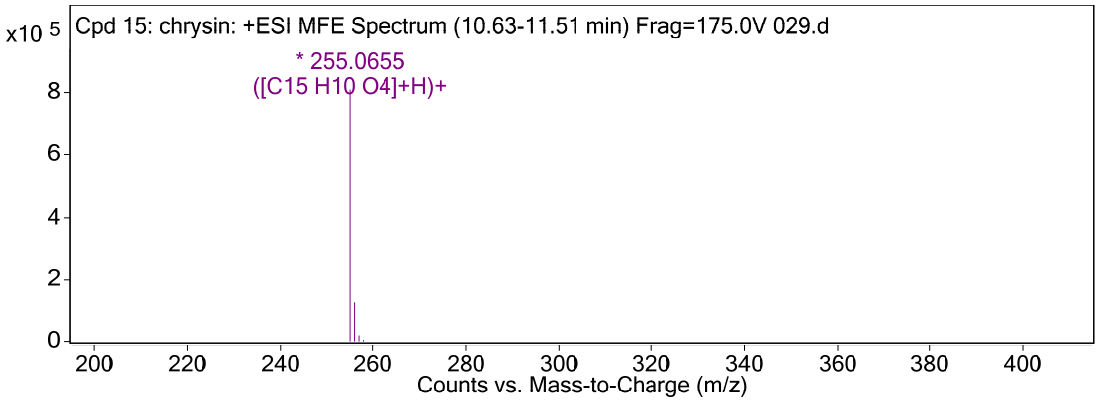


Slika 38a. UV kromatogram inkubacijske smjese krizina s HLM-om bez dodanog NADPH-generirajućeg sustava.



Slika 38b. UV kromatogram inkubacijske smjese krizina s HLM-om s dodanim NADPH-generirajućim sustavom.

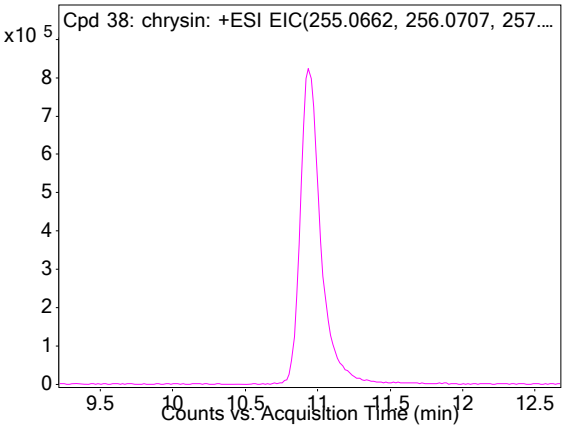


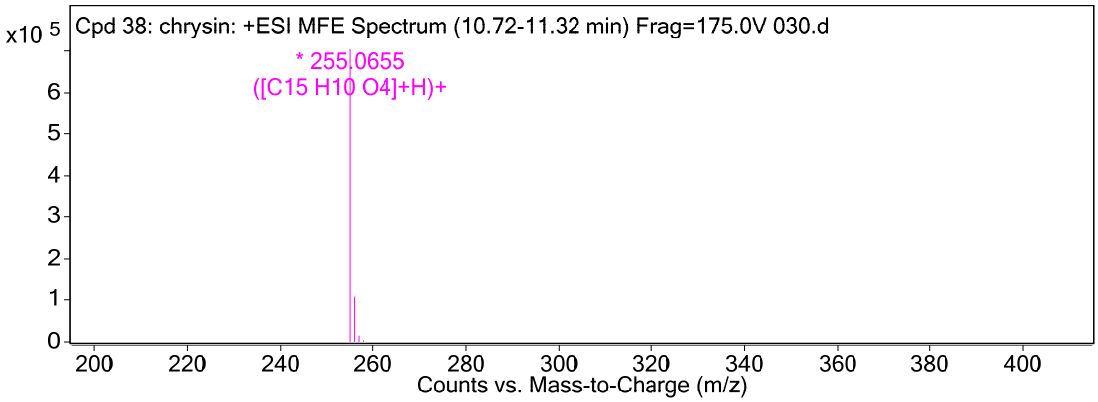


Compound Label	RT	Mass	Name	DB Formula	DB Diff (ppm)
Cpd 15: chrysin	10,95	254,0582	chrysin	C15 H10 O4	-1,27

Compound Label	Name	*m/z*	RT	Algorithm	Mass
Cpd 15: chrysin	**chrysin**	255,0655	10,95	Find by Molecular Feature	254,0582

Slika 38c. Kromatogram izdvojenog iona i spektar masa supstrata (krizin) u inkubacijskoj smjesi s HLM-om bez dodanog NADPH-generirajućeg sustava.

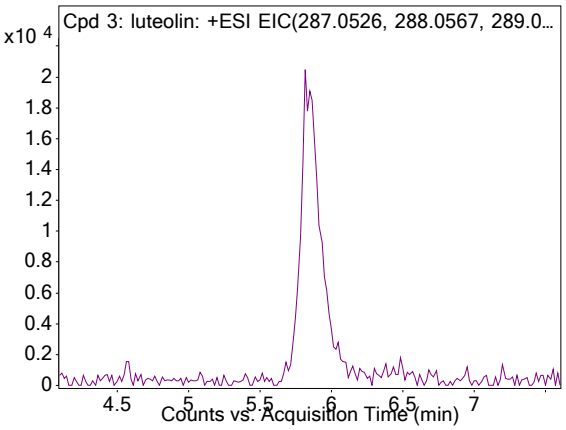


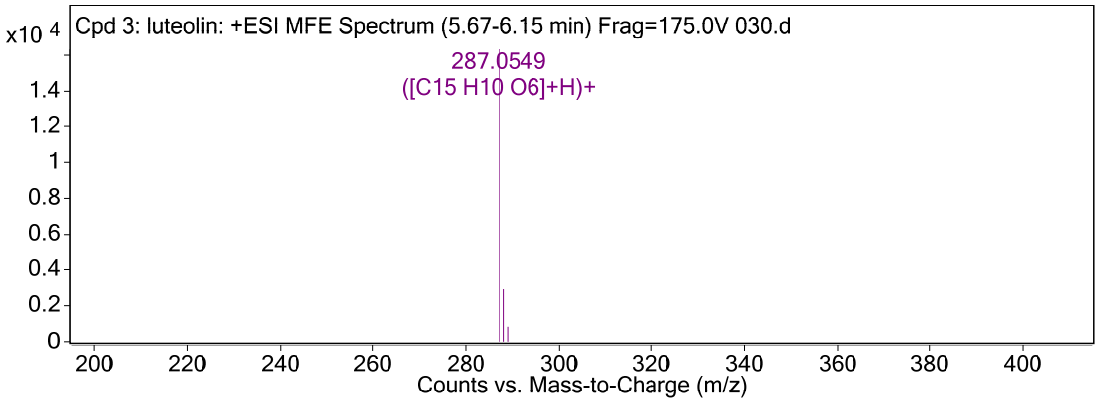


Compound Label	RT	Mass	Name	DB Formula	DB Diff (ppm)
Cpd 38: chrysin	10,94	254,0584	chrysin	C15 H10 O4	-2,09

Compound Label	Name	*m/z*	RT	Algorithm	Mass
Cpd 38: chrysin	**chrysin**	255,0655	10,94	Find by Molecular Feature	254,0584

Slika 38d. Kromatogram izdvojenog iona i spektar masa supstrata (krizin) u inkubacijskoj smjesi s HLM-om s dodanim NADPH-generirajućim sustavom.

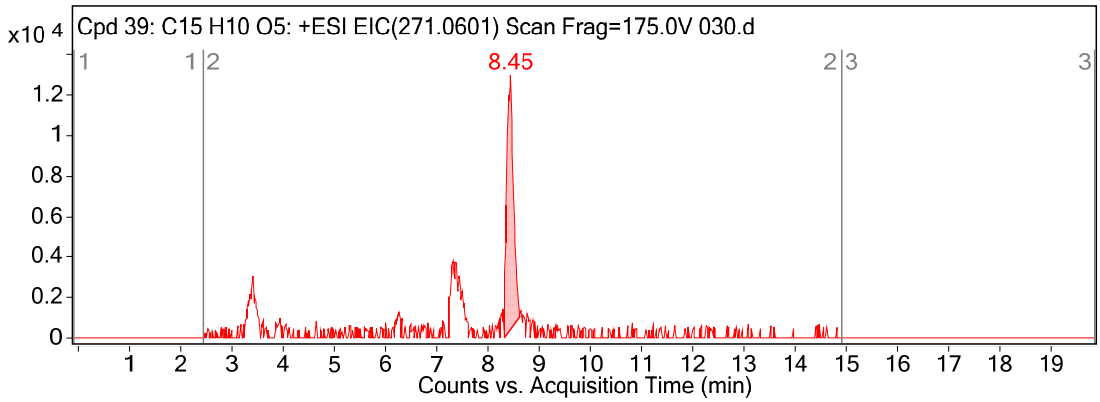




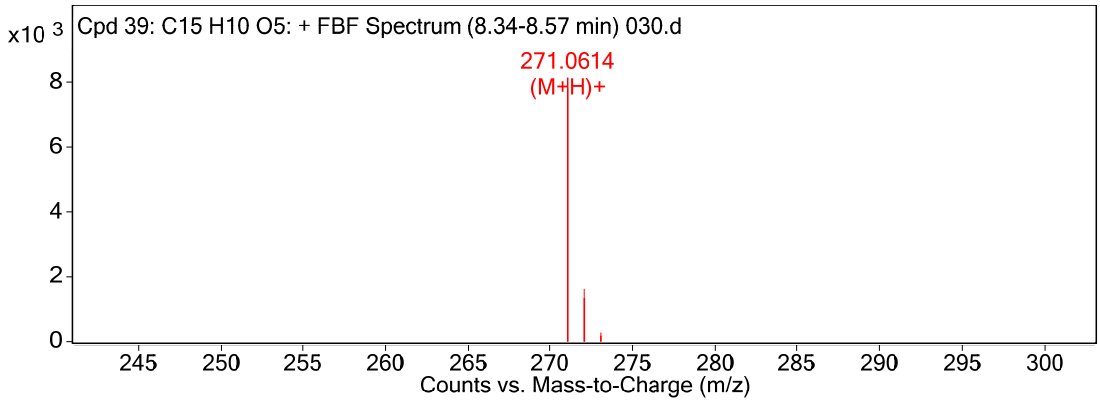
Compound Label	RT	Mass	Name	DB Formula	DB Diff (ppm)
Cpd 3: luteolin	5,85	286,0475	luteolin	C15 H10 O6	0,96

Compound Label	Name	*m/z*	RT	Algorithm	Mass
Cpd 3: luteolin	**luteolin**	287,0549	5,85	Find by Molecular Feature	286,0475

Slika 38e. Kromatogram izdvojenog iona i spektar masa detektiranog metabolita (luteolin) u inkubacijskoj smjesi krizina s HLM-om s dodanim NADPH-generirajućim sustavom.



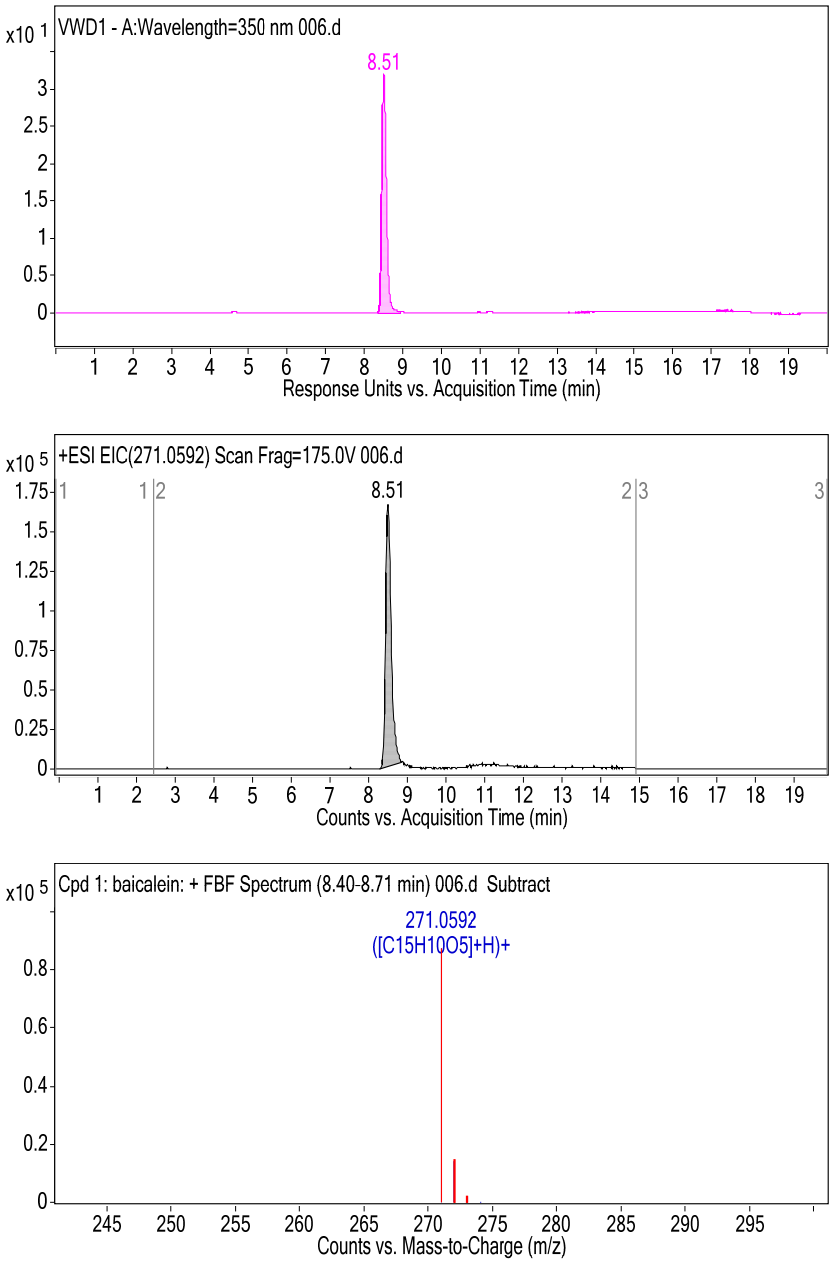
Slika 38f. Kromatogram izdvojenog iona *m/z* 271,0601 na RT = 8,45 min u inkubacijskoj smjesi krizina s HLM-om s dodanim NADPH-generirajućim sustavom.



Compound Label	RT	Mass	Formula	Tgt Mass	Diff (ppm)
Cpd 39: C15 H10 O5	8,45	270,0542	C15 H10 O5	270,0528	5,16

Compound Label	*m/z*	RT	Algorithm	Mass
Cpd 39: C15 H10 O5	271,0614	8,45	Find By Formula	270,0542

Slika 38g. Spektar masa detektiranog metabolita na RT = 8,45 min u inkubacijskoj smjesi krizina s HLM-om s dodanim NADPH-generirajućim sustavom.

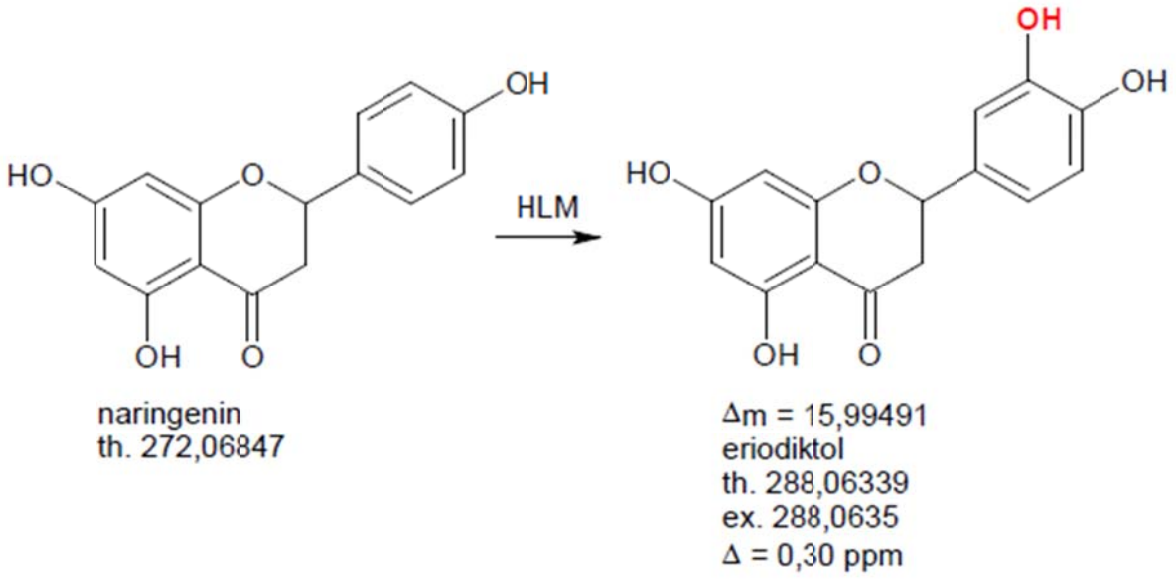


Compound Label	RT	Mass	Name	MFG Formula	Diff (ppm)
Cpd 1: baicalein	8,51	270,052	baicalein	C15 H10 O5	-3,15

Slika 38h. UV kromatogram, kromatogram izdvojenog iona i spektar masa poredbene otopine bajkaleina.

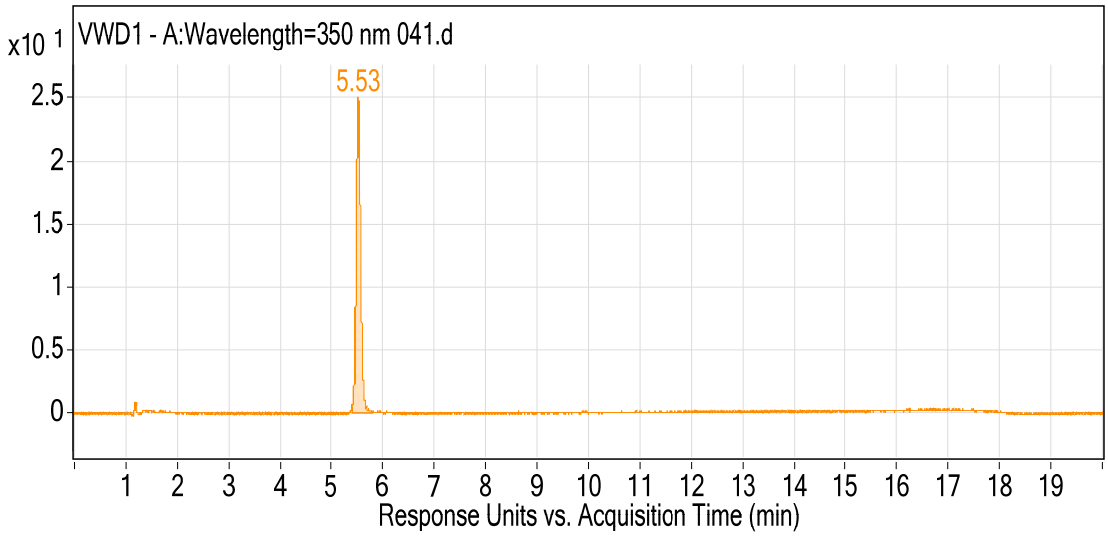
4.3.12 Naringenin

U inkubacijama naringenina s humanim jetrenim mikrosomima detektirano je formiranje jednog metabolita koji je identificiran kao eriodiktiol. Pronalazak eriodiktiola kao produkta metabolizma upućuje na aromatsku hidroksilacijum supstrata naringenina na položaju 3' prstena B (slika 39).

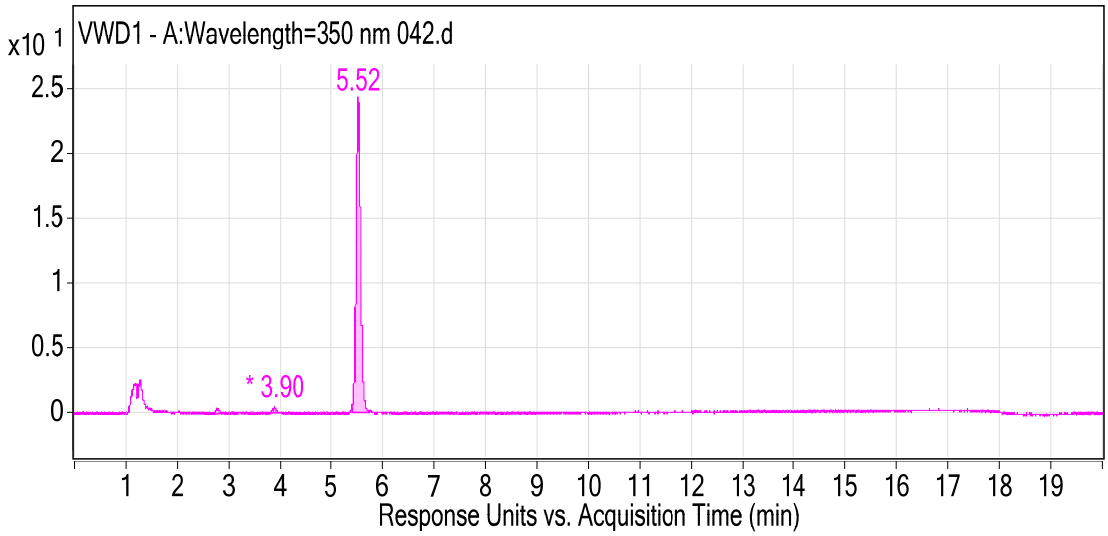


Slika 39. Metabolizam naringenina posredovan HLM-om. Jedini metabolit eriodiktiol nastaje aromatskom hidroksilacijom naringenina na položaju 3' prstena B. Th = teoretska masa, ex = eksperimentalno određena masa.

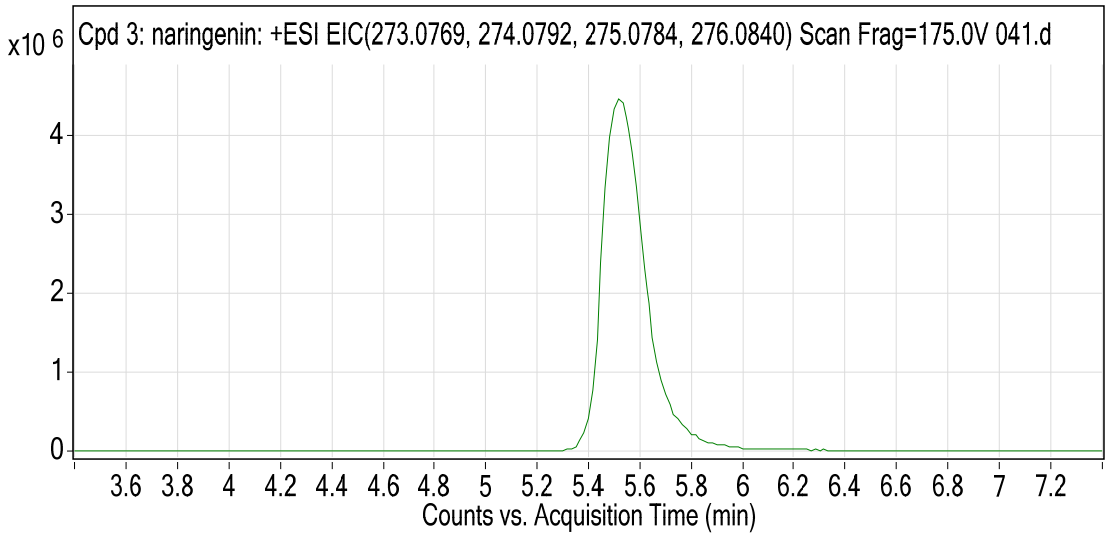
Na slikama 40a-f prikazani su LC/MS podaci na temelju kojih je karakteriziran metabolizam naringenina posredovan HLM-om.

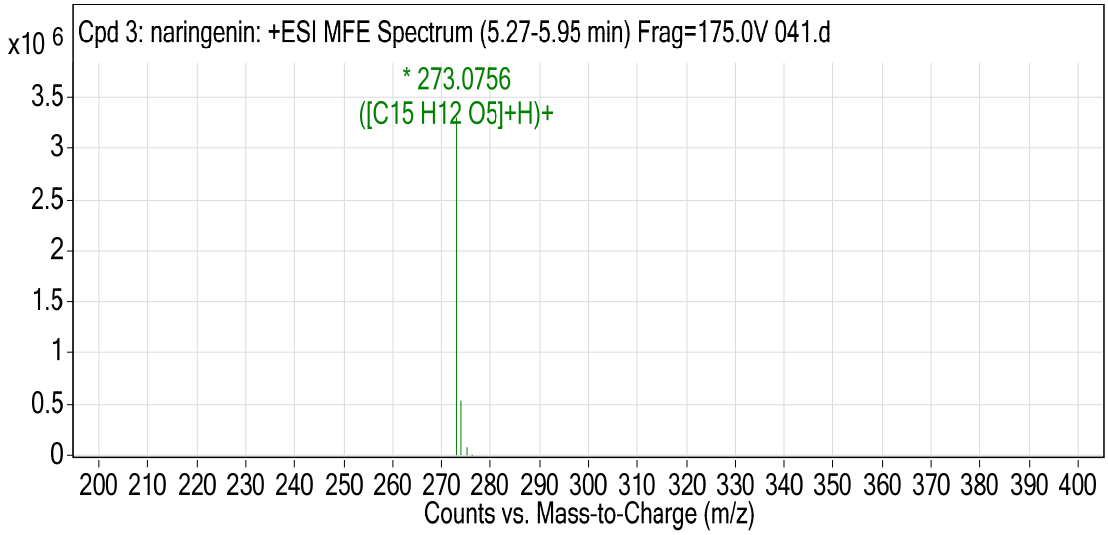


Slika 40a. UV kromatogram inkubacijske smjese naringenina s HLM-om bez dodanog NADPH-generirajućeg sustava.



Slika 40b. UV kromatogram inkubacijske smjese naringenina s HLM-om s dodanim NADPH-generirajućim sustavom.

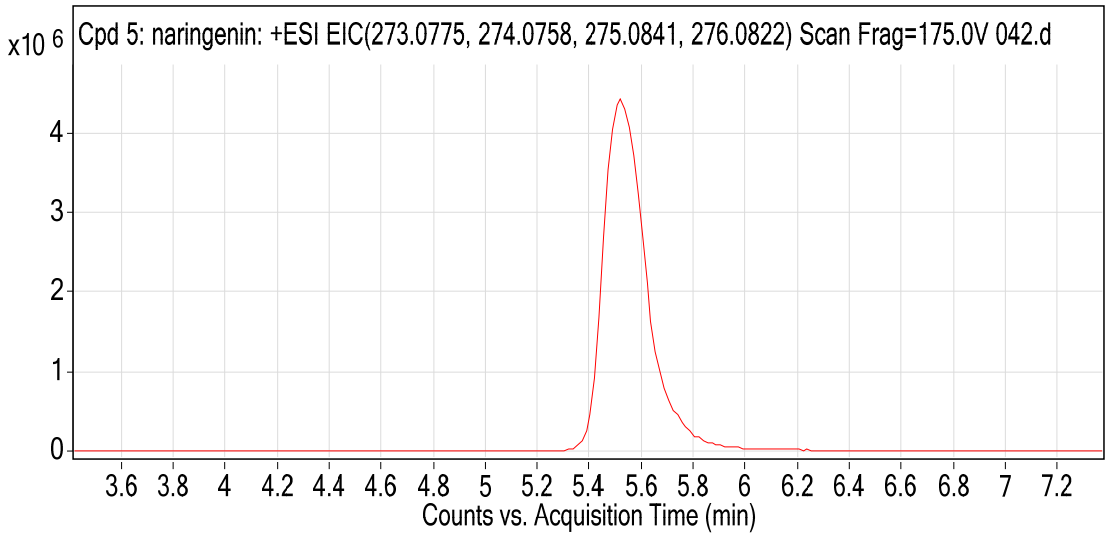


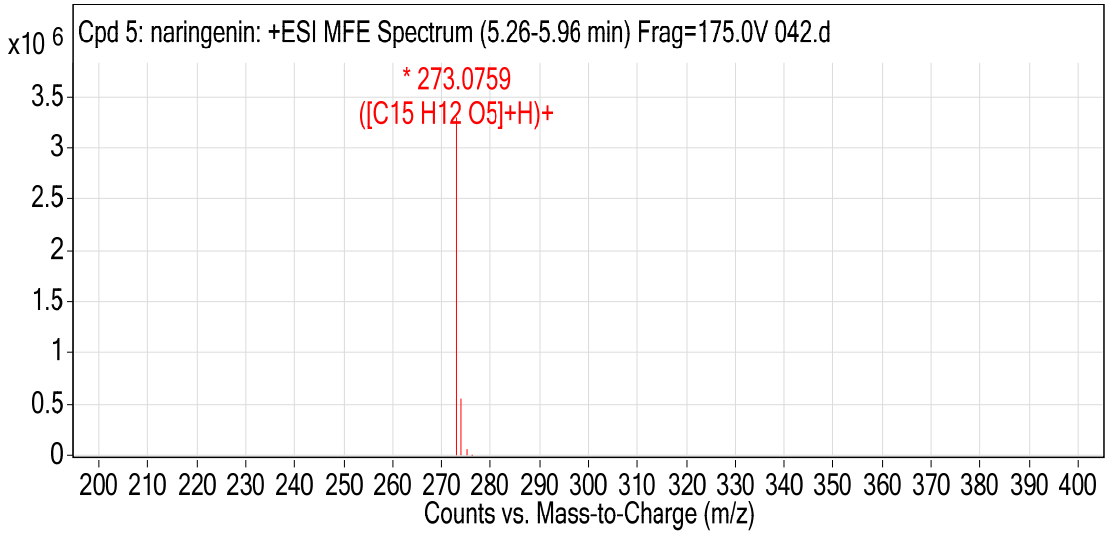


Compound Label	RT	Mass	Name	DB Formula	DB Diff (ppm)
Cpd 3: naringenin	5,53	272,0684	naringenin	C15 H12 O5	0,27

Compound Label	Name	*m/z*	RT	Algorithm	Mass
Cpd 3: naringenin	**naringenin**	273,0756	5,53	Find by Molecular Feature	272,0684

Slika 40c. Kromatogram izdvojenog iona i spektar masa supstrata (naringenin) u inkubacijskoj smjesi s HLM-om bez dodanog NADPH-generirajućeg sustava.

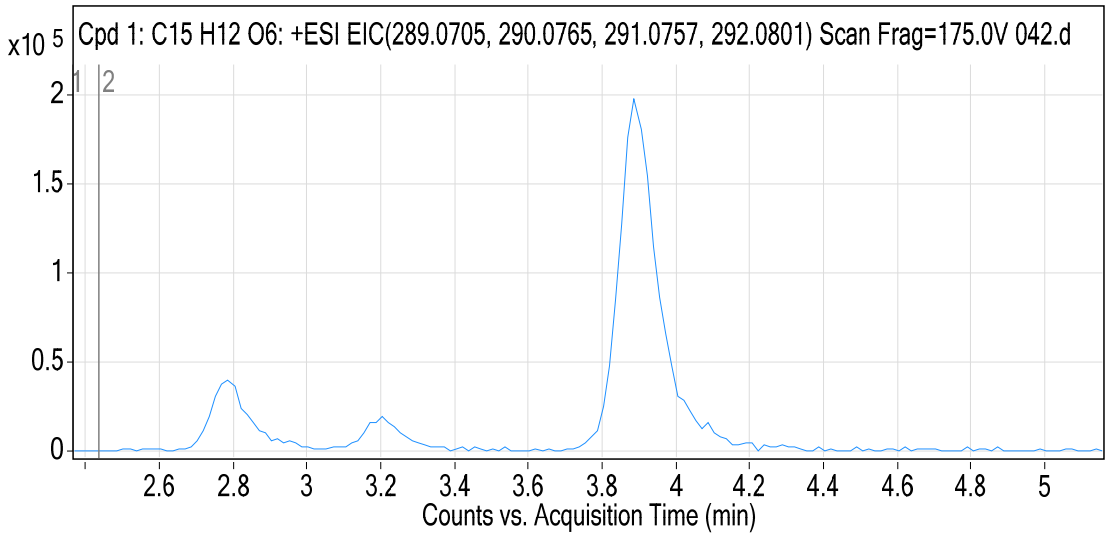


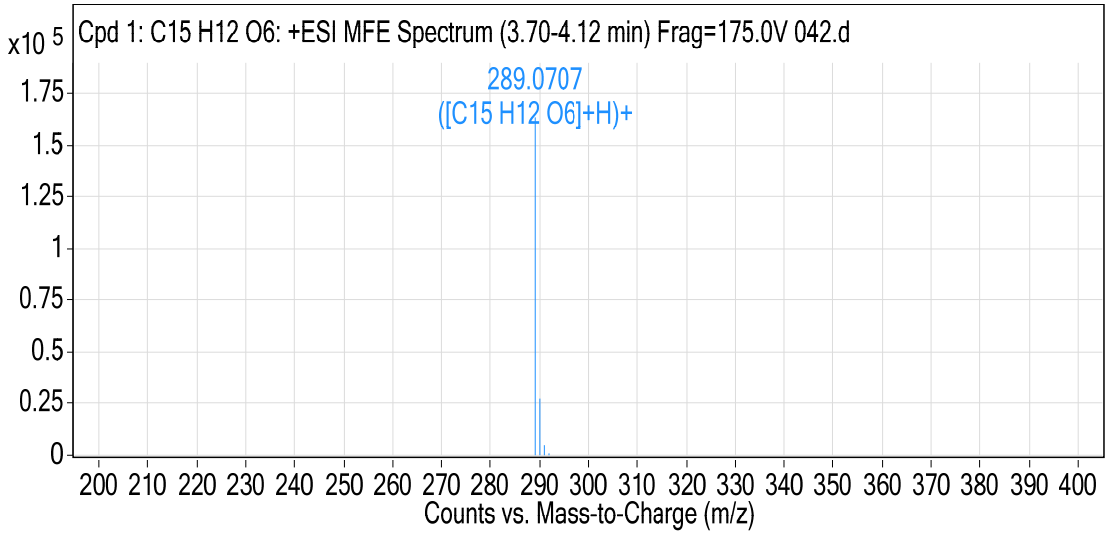


Compound Label	RT	Mass	Name	DB Formula	DB Diff (ppm)
Cpd 5: naringenin	5,53	272,0686	naringenin	C15 H12 O5	-0,55

Compound Label	Name	*m/z*	RT	Algorithm	Mass
Cpd 5: naringenin	**naringenin**	273,0759	5,53	Find by Molecular Feature	272,0686

Slika 40d. Kromatogram izdvojenog iona i spektar masa supstrata (naringenin) u inkubacijskoj smjesi s HLM-om s dodanim NADPH-generirajućim sustavom.

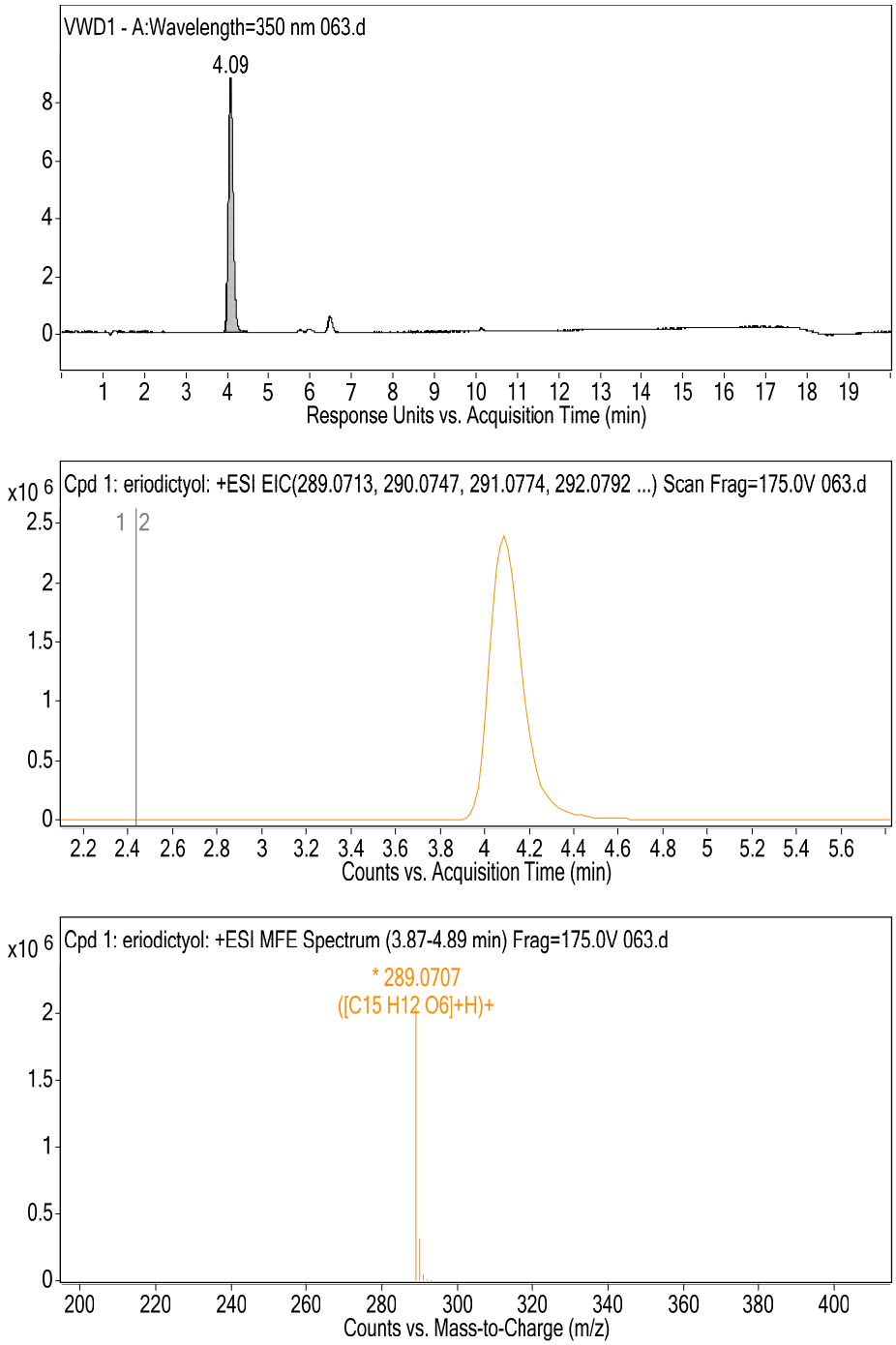




Compound Label	RT	Mass	MFG Formula	MFG Diff (ppm)
Cpd 1: C15 H12 O6	3,89	288,0635	C15 H12 O6	-0,3

Compound Label	*m/z*	RT	Algorithm	Mass
Cpd 1: C15 H12 O6	289,0707	3,89	Find by Molecular Feature	288,0635

Slika 40e. Kromatogram izdvojenog iona i spektar masa detektiranog metabolita na RT = 3,89 min u inkubacijskoj smjesi naringenina s HLM-om s dodanim NADPH-generirajućim sustavom.



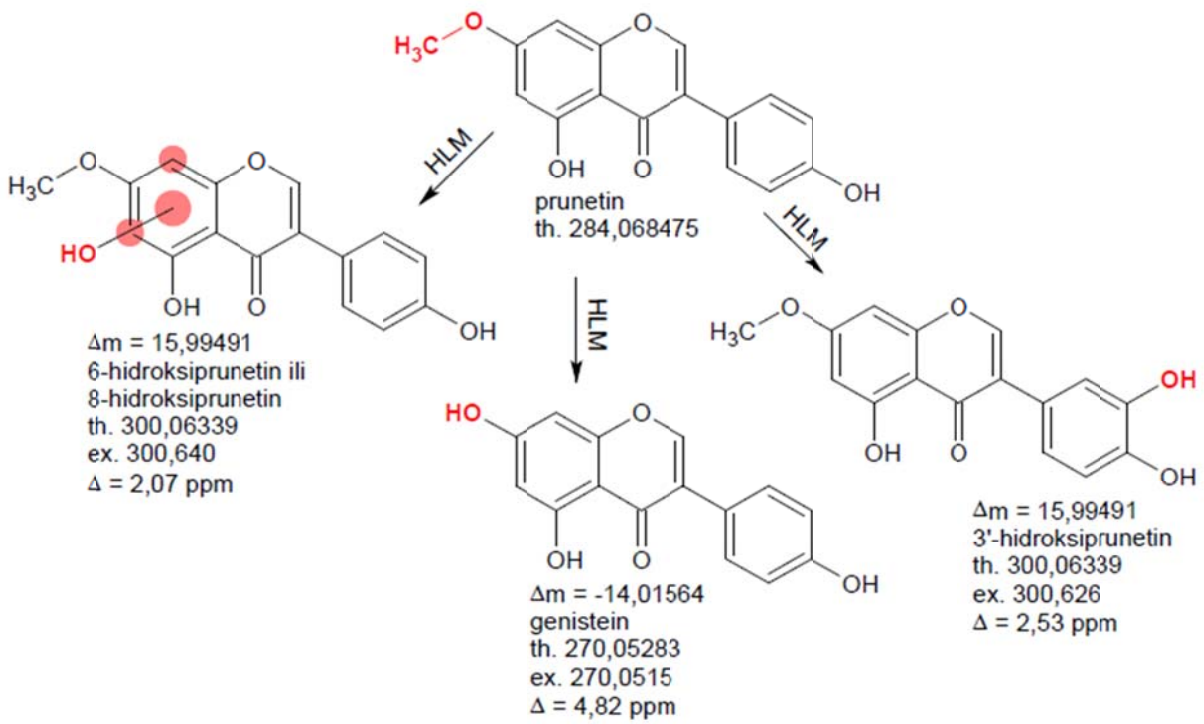
Compound Label	RT	Mass	Name	DB Formula	DB Diff (ppm)
Cpd 1: eriodictyol	4,09	288,0635	eriodictyol	C15 H12 O6	-0,24

Compound Label	Name	*m/z*	RT	Algorithm	Mass
Cpd 1: eriodictyol	**eriodictyol**	289,0707	4,09	Find by Molecular Feature	288,0635

Slika 40f. UV kromatogram, kromatogram izdvojenog iona i spektar masa poredbene otopine eriodiktiola.

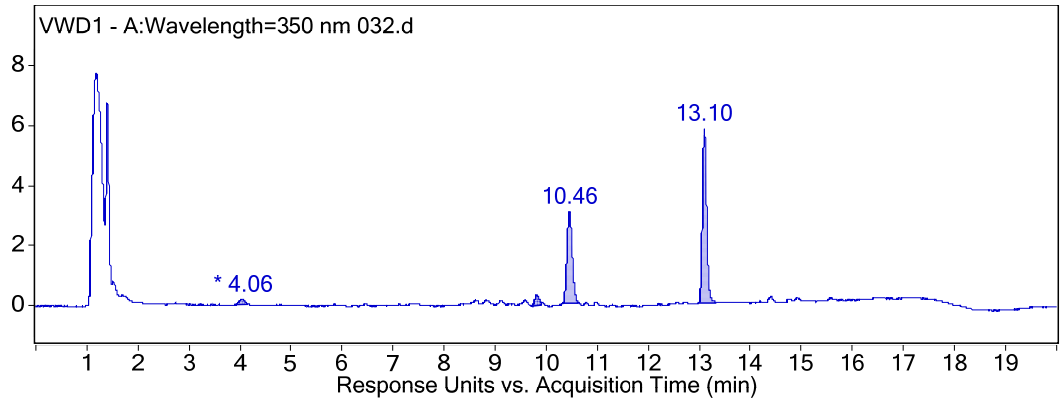
4.3.13 Prunetin

U inkubacijama prunetina s humanim jetrenim mikrosomima detektirano je formiranje tri metabolita, shematski prikazano na slici 41. Količinski najzastupljeniji metabolit identificiran je kao genistein, što upućuje na to da je *O*-demetilacija donekle preferirani metabolički put pretvorbe prunetina djelovanjem citokroma P450 u uvjetima eksperimenta. U približno jednakim i tek u nešto manjim količinama u odnosu na genistein, detektirana su dva produkta aromatske hidroksilacije nastala odvojenim putevima, jedan hidroksilacijom na položaju 3' prstena B (poznat pod nazivom santal), a drugi na položaju 6 ili 8 prstena A.

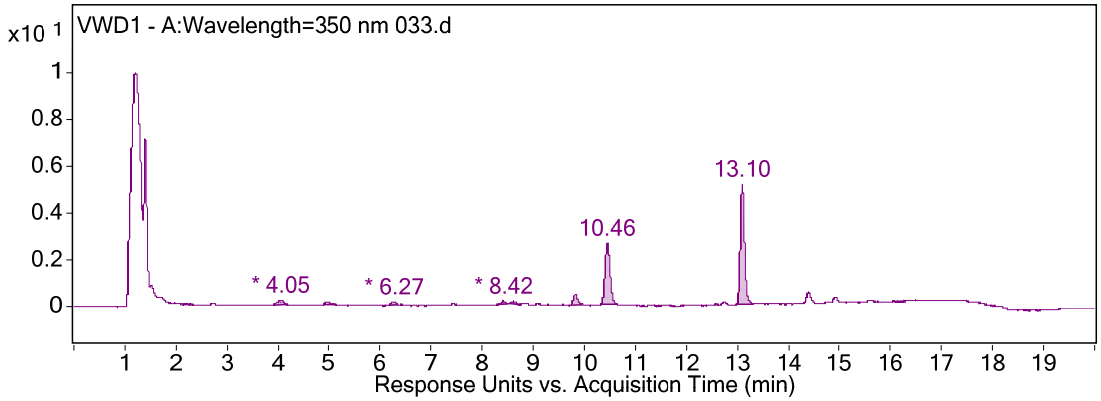


Slika 41. Metabolizam prunetina posredovan HLM-om. Količinski najzastupljeniji metabolit genistein nastao je *O*-demetilacijom prunetina na položaju 7 prstena A. Nastali odvojenim metaboličkim putevima, zastupljeni u podjednakim i tek u nešto manjim količinama u odnosu na genistein, detektirana su dva produkta aromatske hidroksilacije prunetina: na položaju 6 ili 8 prstena A te na položaju 3' prstena B (santal). Th = teoretska masa, ex = eksperimentalno određena masa.

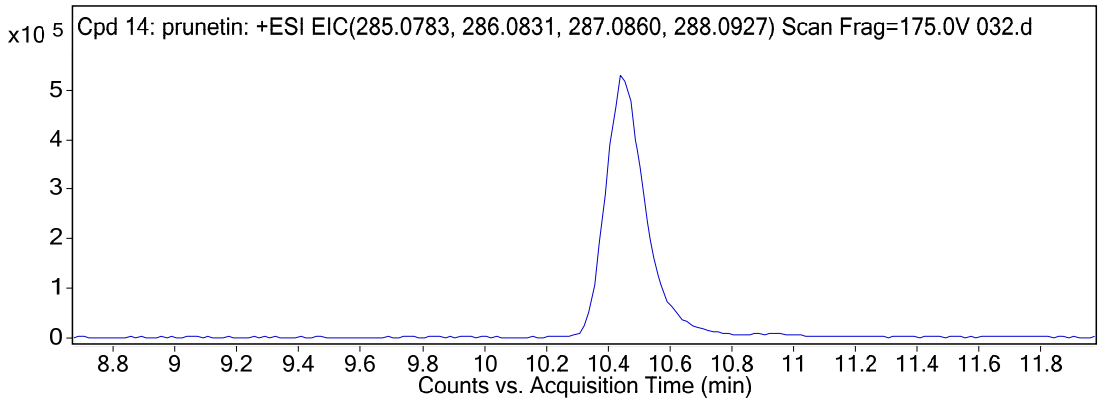
Na slikama 42a-h prikazani su LC/MS podaci na temelju kojih je karakteriziran metabolizam prunetina posredovan HLM-om.

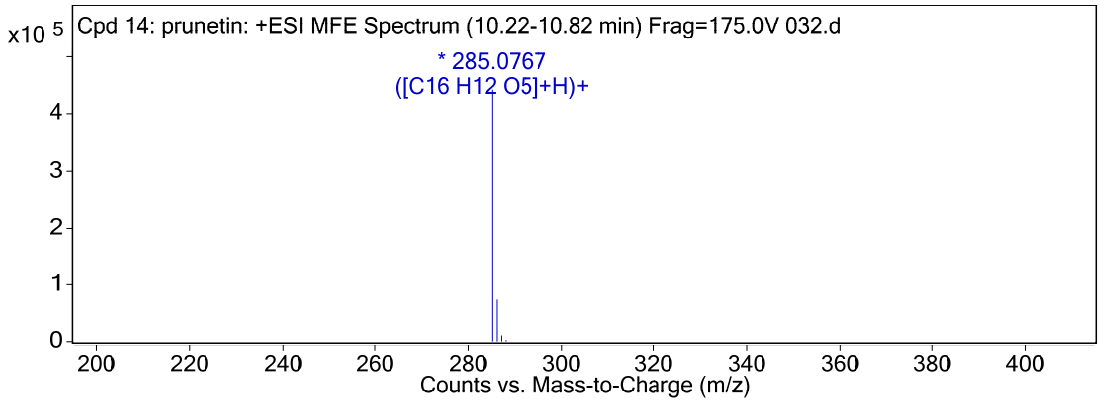


Slika 42a. UV kromatogram inkubacijske smjese prunetina s HLM-om bez dodanog NADPH-generirajućeg sustava.



Slika 42b. UV kromatogram inkubacijske smjese prunetina s HLM-om s dodanim NADPH-generirajućim sustavom.

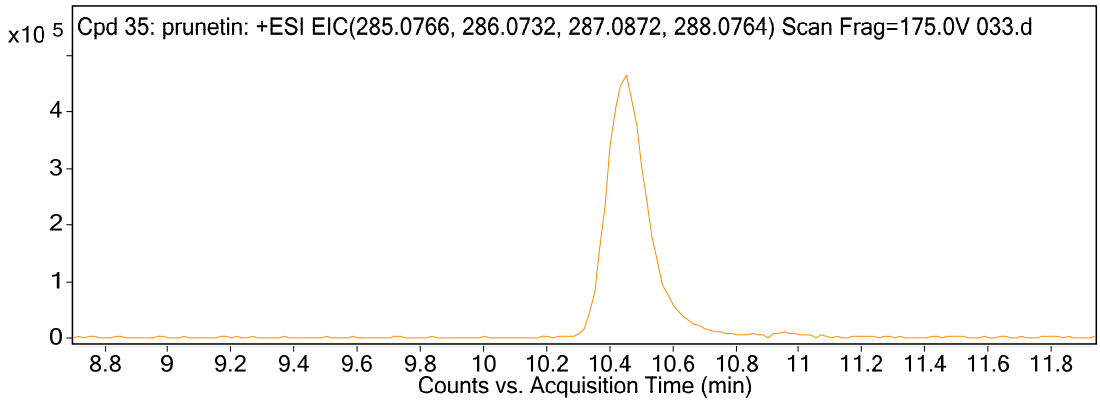


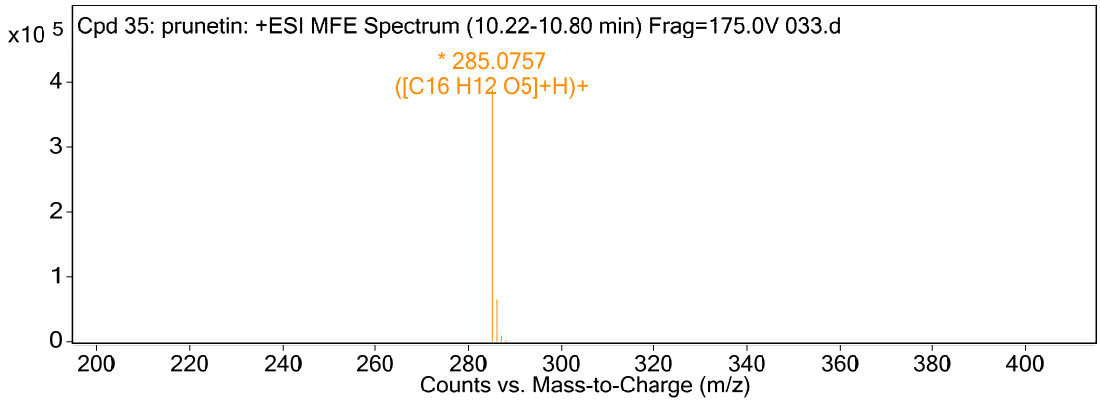


Compound Label	RT	Mass	Name	DB Formula	DB Diff (ppm)
Cpd 14: prunetin	10,45	284,0694	prunetin	C16 H12 O5	-3,18

Compound Label	Name	*m/z*	RT	Algorithm	Mass
Cpd 14: prunetin	**prunetin**	285,0767	10,45	Find by Molecular Feature	284,0694

Slika 42c. Kromatogram izdvojenog iona i spektar masa supstrata (prunetin) u inkubacijskoj smjesi s HLM-om bez dodanog NADPH-generirajućeg sustava.

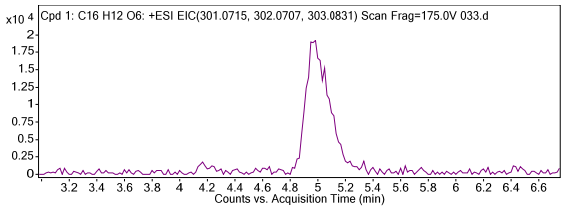


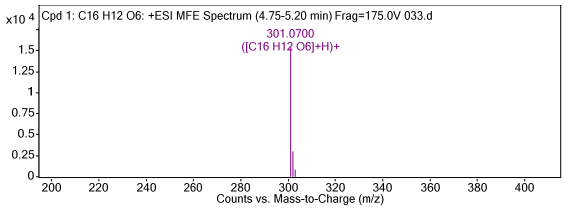


Compound Label	RT	Mass	Name	DB Formula	DB Diff (ppm)
Cpd 35: prunetin	10,45	284,0683	prunetin	C16 H12 O5	0,46

Compound Label	Name	*m/z*	RT	Algorithm	Mass
Cpd 35: prunetin	**prunetin**	285,0757	10,45	Find by Molecular Feature	284,0683

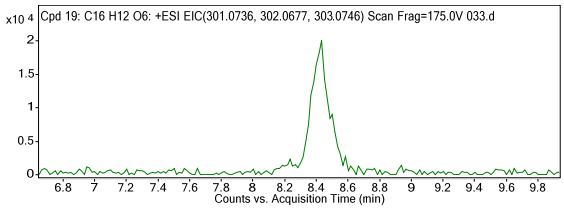
Slika 42d. Kromatogram izdvojenog iona i spektar masa supstrata (prunetin) u inkubacijskoj smjesi s HLM-om s dodanim NADPH-generirajućim sustavom.

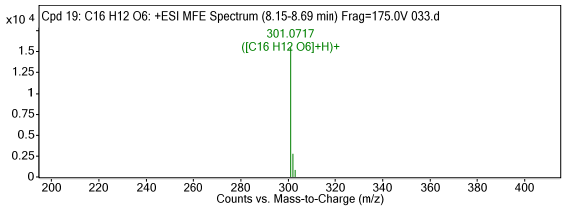




Compound Label	RT	Mass	MFG Formula	MFG Diff (ppm)
Cpd 1: C16 H12 O6	4,99	300,0626	C16 H12 O6	2,53

Compound Label	*m/z*	RT	Algorithm	Mass
Cpd 1: C16 H12 O6	301,07	4,99	Find by Molecular Feature	300,0626

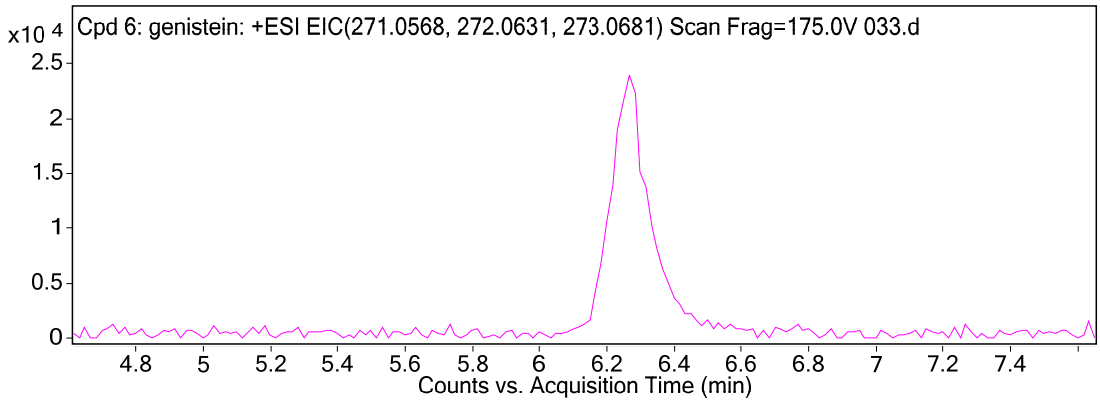


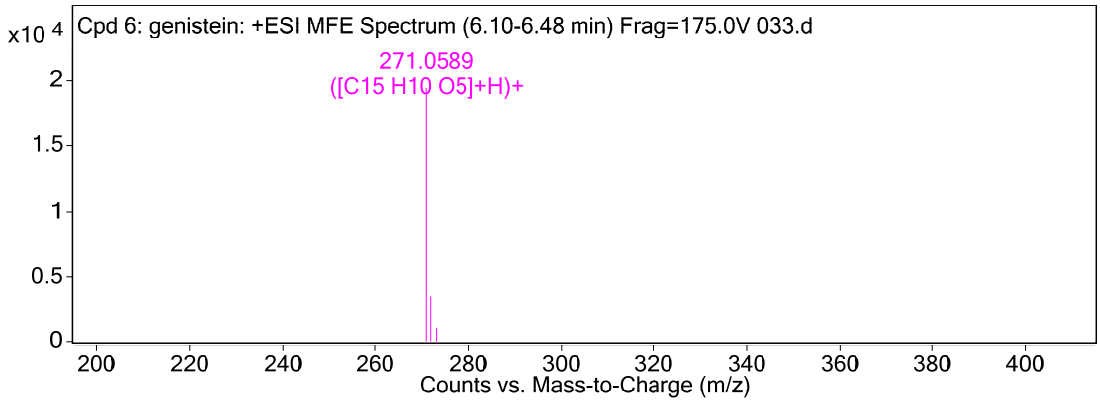


Compound Label	RT	Mass	MFG Formula	MFG Diff (ppm)
Cpd 19: C16 H12 O6	8,42	300,064	C16 H12 O6	-2,07

Compound Label	*m/z*	RT	Algorithm	Mass
Cpd 19: C16 H12 O6	301,0717	8,42	Find by Molecular Feature	300,064

Slika 42e. Kromatogram izdvojenog iona i spektar masa detektiranih metabolita na RT = 4,99 min i RT = 8,42 min u inkubacijskoj smjesi prunetina s HLM-om s dodanim NADPH-generirajućim sustavom.

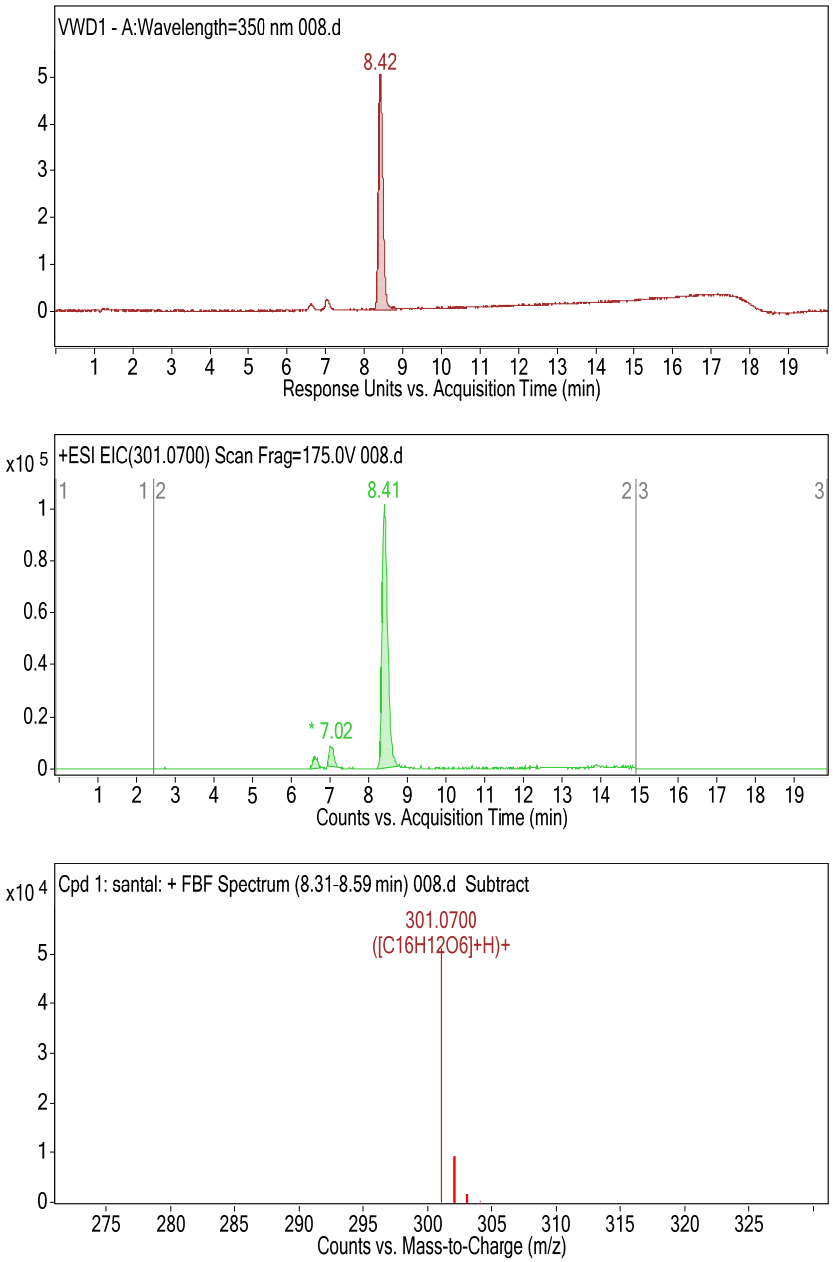




Compound Label	RT	Mass	Name	DB Formula	DB Diff (ppm)
Cpd 6: genistein	6,27	270,0515	genistein	C15 H10 O5	4,82

Compound Label	Name	*m/z*	RT	Algorithm	Mass
Cpd 6: genistein	**genistein**	271,0589	6,27	Find by Molecular Feature	270,0515

Slika 42f. Kromatogram izdvojenog iona i spektar masa detektiranog metabolita na RT = 6,27 min (genistein) u inkubacijskoj smjesi prunetina s HLM-om s dodanim NADPH-generirajućim sustavom.

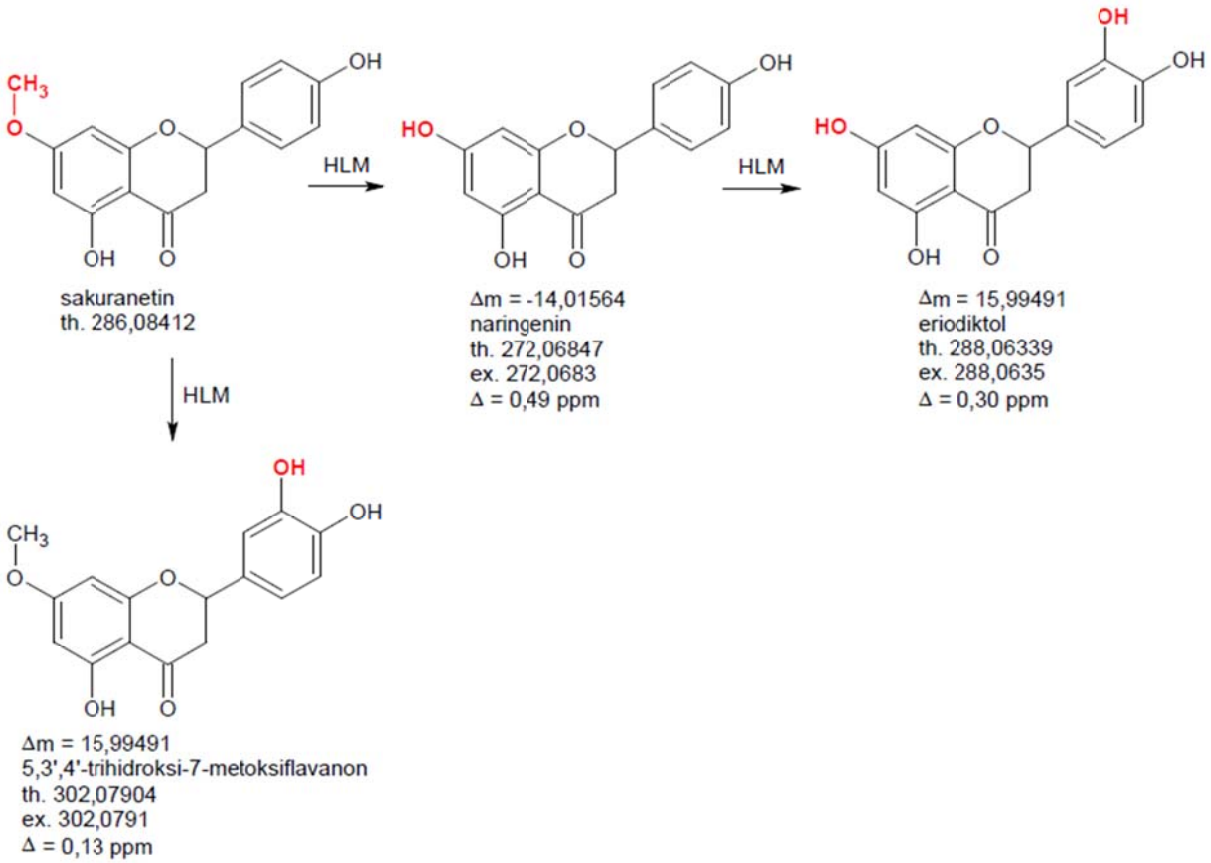


Compound Label	RT	Mass	Name	MFG Formula	Diff (ppm)
Cpd 1: santal	8,42	300,0627	santal	C16 H12 O6	-2,14

Slika 42g. UV kromatogram, kromatogram izdvojenog iona (engl. *extracted ion chromatogram*, EIC) i spektar masa poredbene otopine santala (3'-hidroksiprunetin).

4.3.14 Sakuranetin

U inkubacijama sakuranetina s humanim jetrenim mikrosomima detektirano je formiranje tri metabolita, shematski prikazano na slici 43.

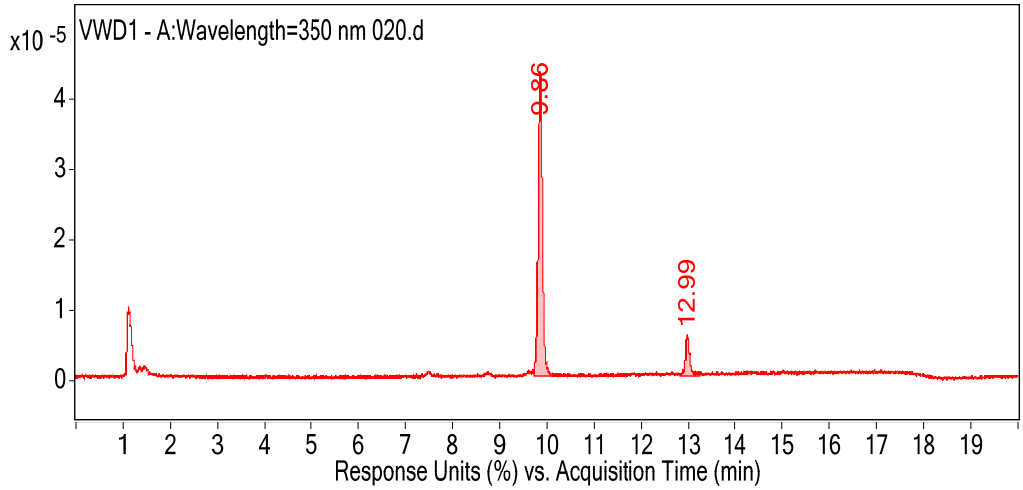


Slika 43. Metabolizam sakuranetina posredovan HLM-om. Demetilacijom na položaju 7 prstena A nastaje naringenin. Distributivnom aromatskom hidroksilacijom naringenina na položaju 3' prstena B nastaje eriodiktiol – drugi produkt ovog metaboličkog puta. Treći produkt metabolizma sakuranetina nastao je aromatskom hidroksilacijom na položaju 3' prstena B pri čemu je nastao 5,3',4'-trihidroksi-7-metoksiflavanon. Th = teoretska masa, ex = eksperimentalno određena masa.

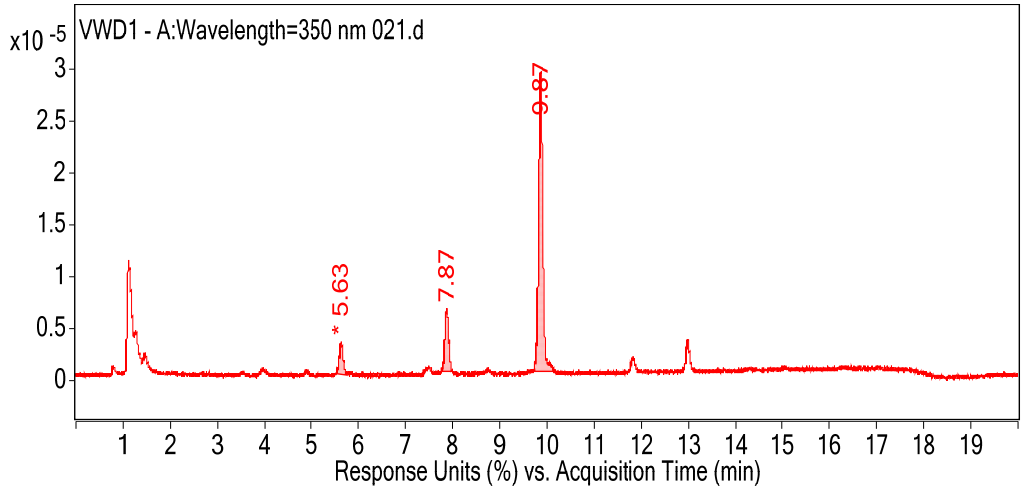
Pronalazak naringenina i eriodiktiola kao produkata metabolizma upućuje na distributivno formiranje metabolita djelovanjem citokroma P450. Najprije se ishodišni susptrat sakuranetin demetilira na položaju 7 prstena A pri čemu nastaje naringenin, a potom se naringenin hidroksilira na položaju 3' prstena B pri čemu nastaje eriodiktiol. Treći produkt metabolizma sakuranetina nastao je aromatskom hidroksilacijom na položaju 3' prstena B pri čemu je nastao 5,3',4'-trihidroksi-7-metoksiflavanon. Količine nastalih produkata varirale su

ponavljanjem eksperimenta u duljim vremenskim razmacima. Ipak na temelju rezultata eksperimenta provedenog u svrhu određivanja kinetičkih parametara (vidi poglavlje 4.6.9) može se zaključiti da je *O*-demetilacija sakuranetina preferirani put metabolizma posredovanog humanim jetrenim citokromima P450.

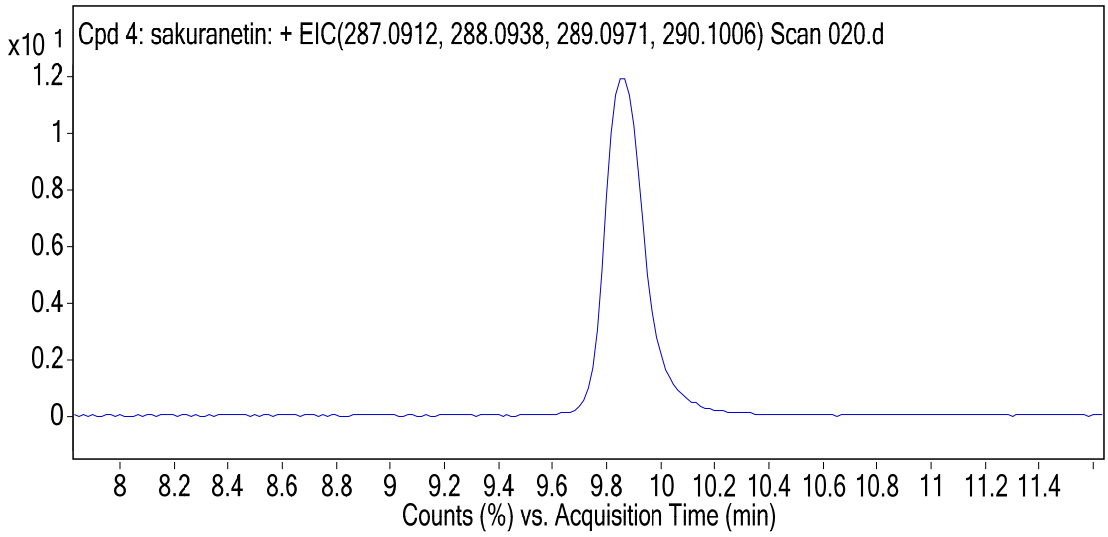
Na slikama 44a-g prikazani su LC/MS podaci na temelju kojih je karakteriziran metabolizam sakuranetina posredovan HLM-om.

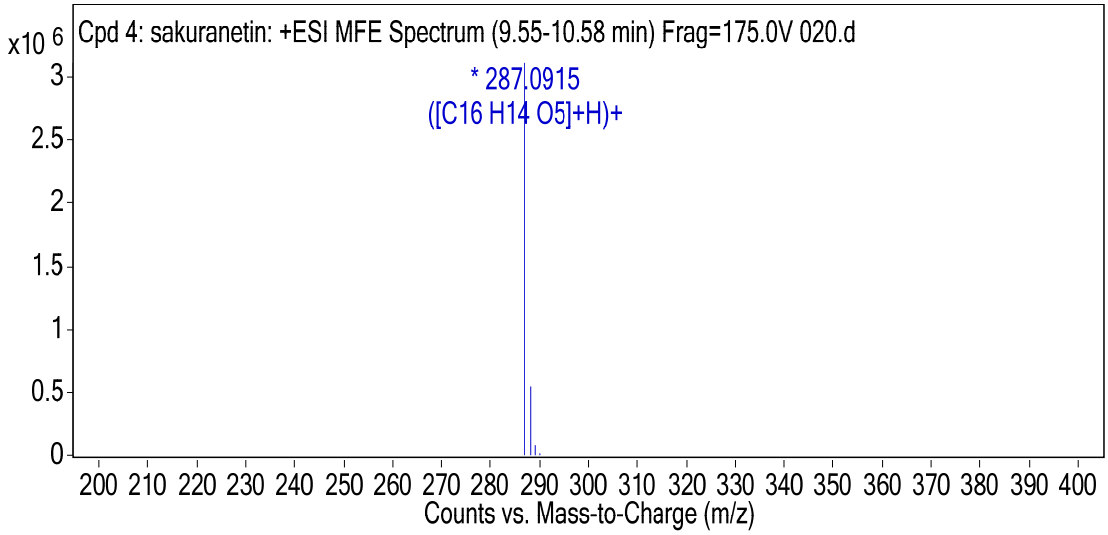


Slika 44a. UV kromatogram inkubacijske smjese sakuranetina s HLM-om bez dodanog NADPH-generirajućeg sustava.



Slika 44b. UV kromatogram inkubacijske smjese sakuranetina s HLM-om s dodanim NADPH-generirajućim sustavom.

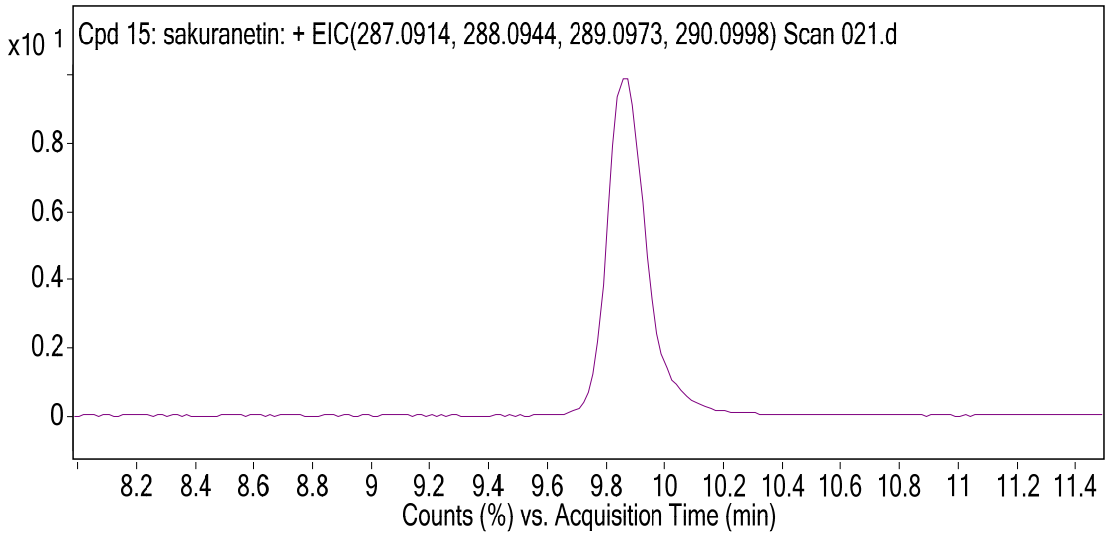


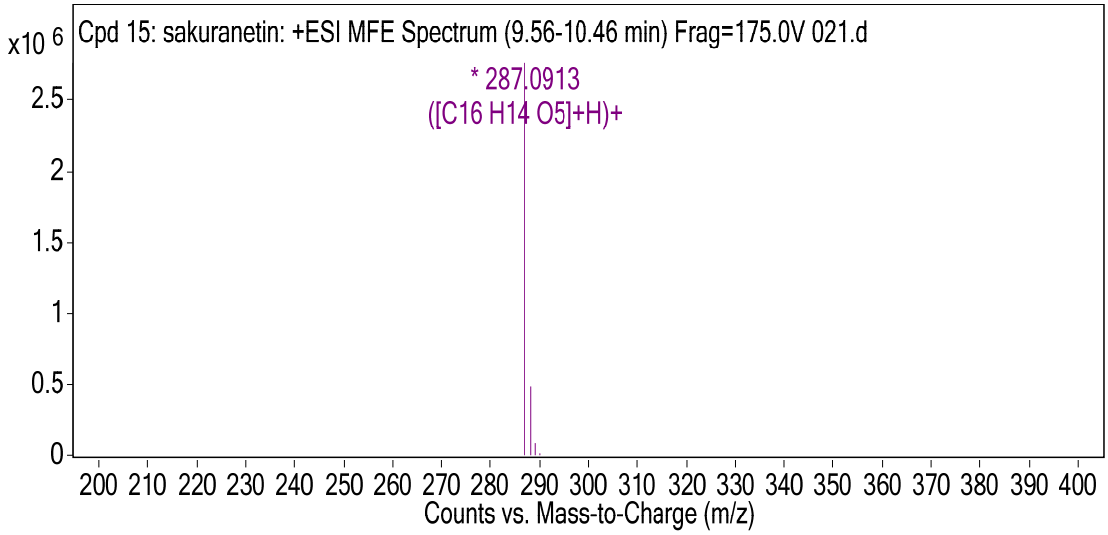


Compound Label	RT	Mass	Name	DB Formula	DB Diff (ppm)
Cpd 4: sakuranetin	9,86	286,0842	sakuranetin	C16 H14 O5	-0,18

Compound Label	Name	*m/z*	RT	Algorithm	Mass
Cpd 4: sakuranetin	**sakuranetin**	287,0915	9,86	Find by Molecular Feature	286,0842

Slika 44c. Kromatogram izdvojenog iona i spektar masa supstrata (sakuranetin) u inkubacijskoj smjesi s HLM-om bez dodanog NADPH-generirajućeg sustava.

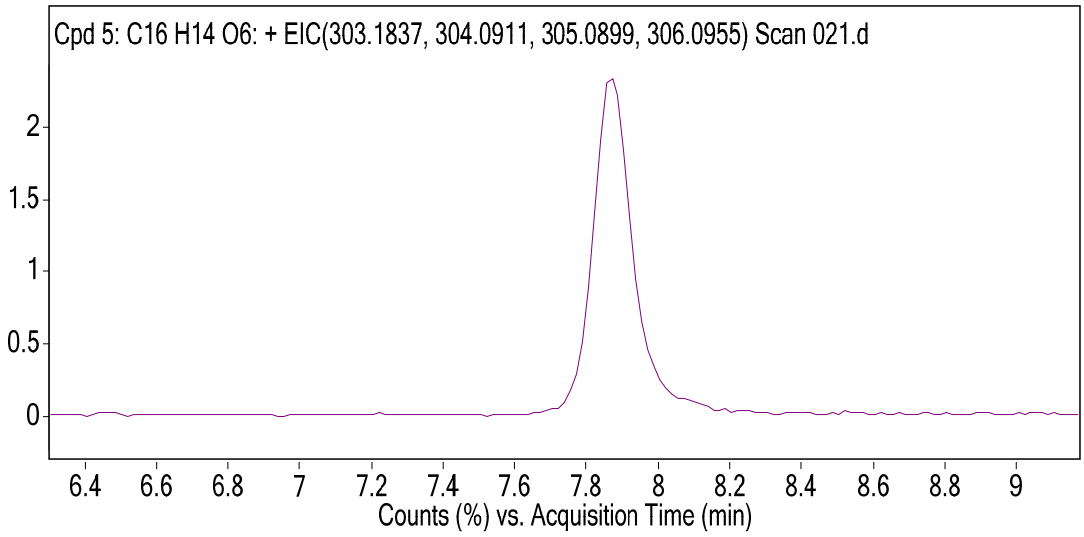


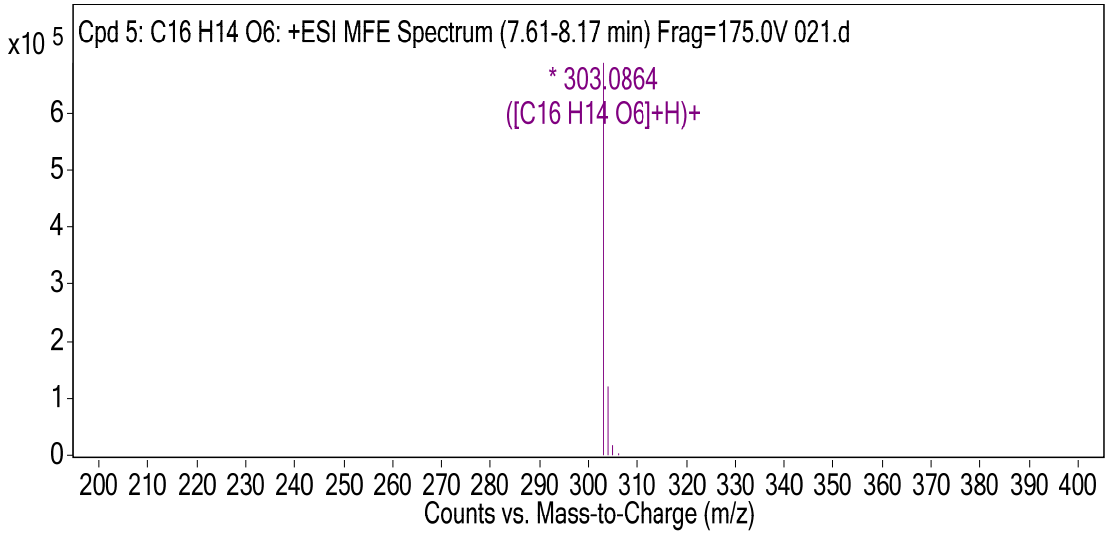


Compound Label	RT	Mass	Name	DB Formula	DB Diff (ppm)
Cpd 15: sakuranetin	9,87	286,0841	sakuranetin	C16 H14 O5	0,15

Compound Label	Name	*m/z*	RT	Algorithm	Mass
Cpd 15: sakuranetin	**sakuranetin**	287,0913	9,87	Find by Molecular Feature	286,0841

Slika 44d. Kromatogram izdvojenog iona i spektar masa supstrata (sakuranetin) u inkubacijskoj smjesi s HLM-om s dodanim NADPH-generirajućim sustavom.

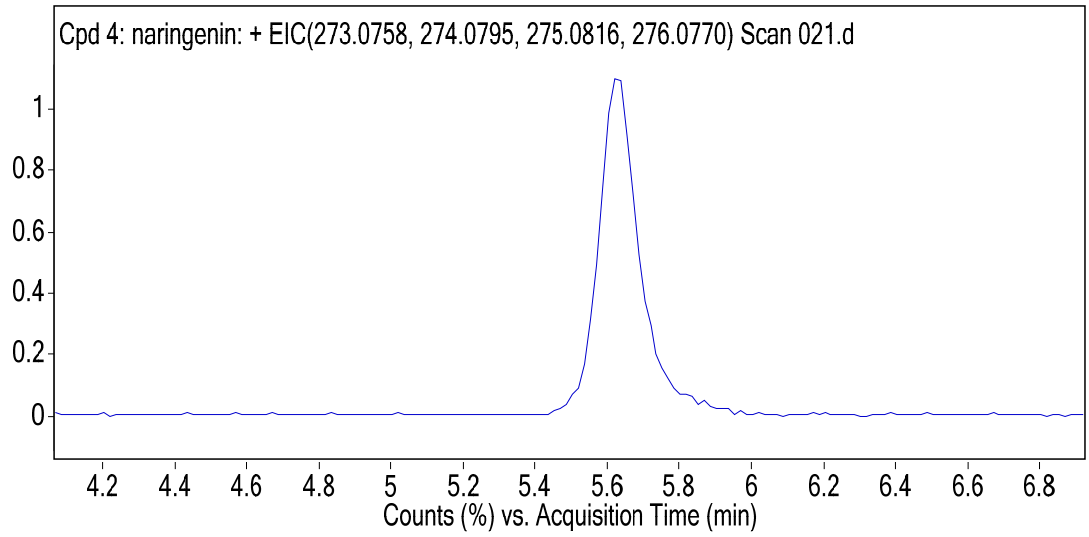


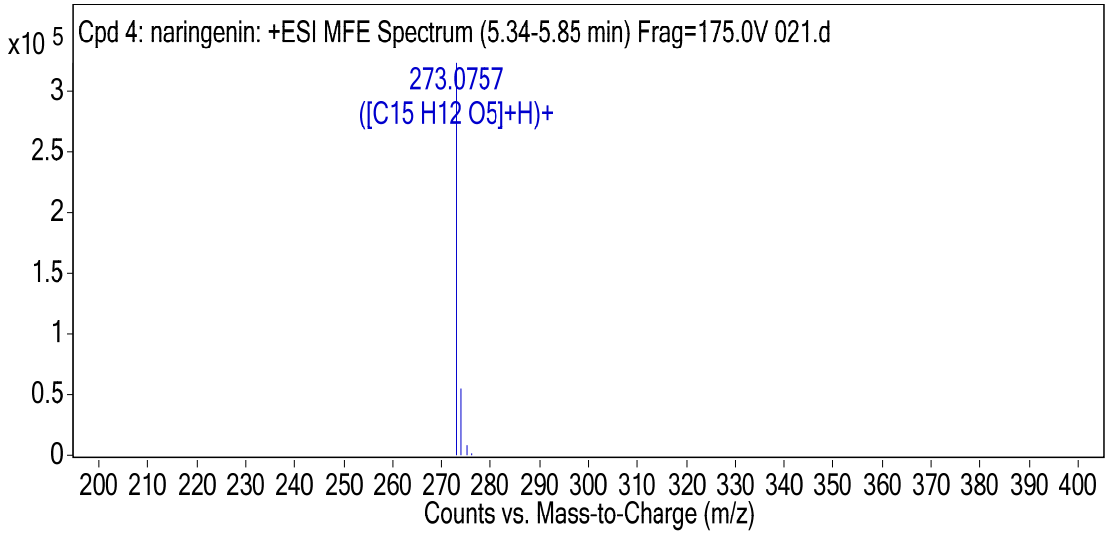


Compound Label	RT	Mass	MFG Formula	MFG Diff (ppm)
Cpd 5: C16 H14 O6	7,87	302,0791	C16 H14 O6	-0,13

Compound Label	*m/z*	RT	Algorithm	Mass
Cpd 5: C16 H14 O6	303,0864	7,87	Find by Molecular Feature	302,0791

Slika 44e. Kromatogram izdvojenog iona i spektar masa detektiranog metabolita na RT = 7,87 min u inkubacijskoj smjesi sakuranetina s HLM-om s dodanim NADPH-generirajućim sustavom.

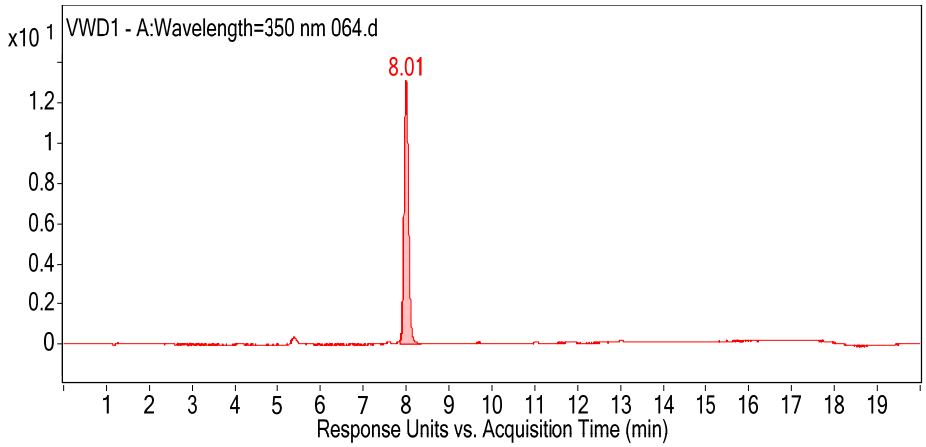


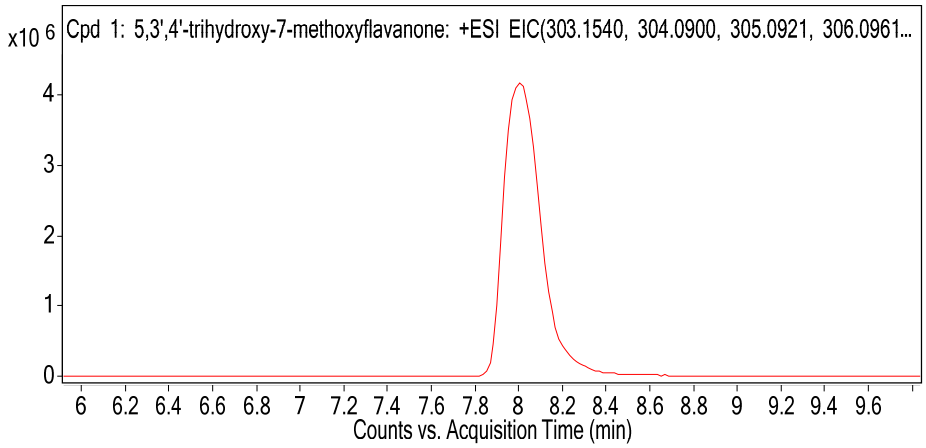


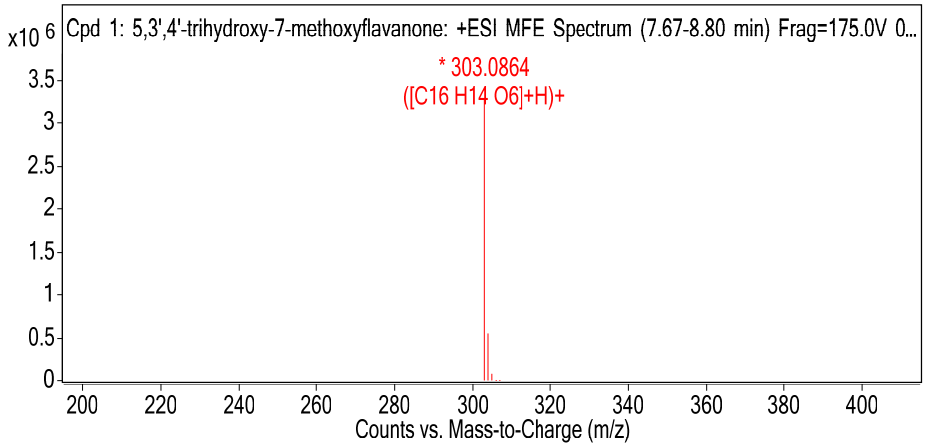
Compound Label	RT	Mass	Name	DB Formula	DB Diff (ppm)
Cpd 4: naringenin	5,63	272,0683	naringenin	C15 H12 O5	0,49

Compound Label	Name	*m/z*	RT	Algorithm	Mass
Cpd 4: naringenin	**naringenin**	273,0757	5,63	Find by Molecular Feature	272,0683

Slika 44f. Kromatogram izdvojenog iona i spektar masa detektiranog metabolita na RT = 5,63 min (naringenin) u inkubacijskoj smjesi sakuranetina s HLM-om s dodanim NADPH-generirajućim sustavom.







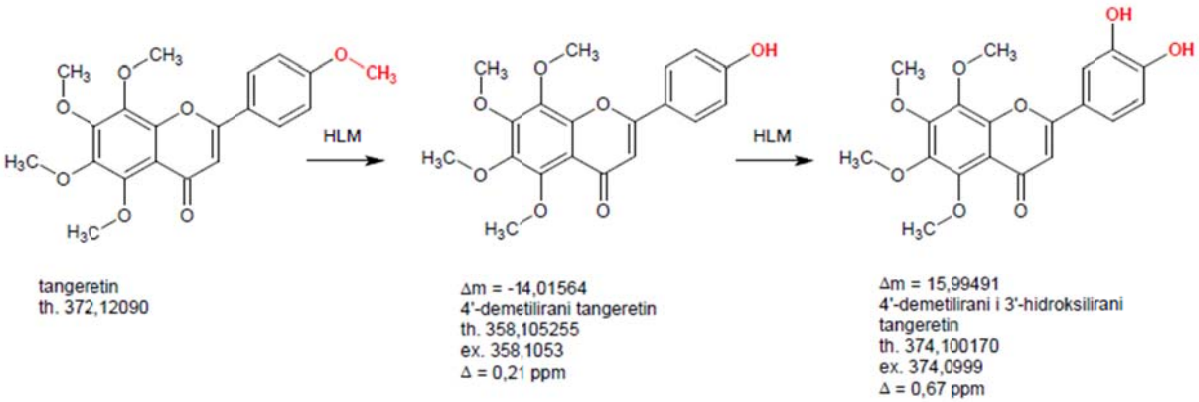
Compound Label	RT	Mass	Name	DB Formula	DB Diff (ppm)
Cpd 1: 5,3',4'-trihydroxy-7-methoxyflavanone	8,01	302,0791	5,3',4'-trihydroxy-7-methoxyflavanone	C16 H14 O6	-0,32

Compound Label	Name	*m/z*	RT	Algorithm	Mass
Cpd 1: 5,3',4'-trihydroxy-7-methoxyflavanone	**5,3',4'-trihydroxy-7-methoxyflavanone**	303,0864	8,01	Find by Molecular Feature	302,0791

Slika 44g. UV kromatogram, kromatogram izdvojenog iona i spektar masa poredbene otopine 5,3',4'-trihidroksi-7-metoksiflavanona.

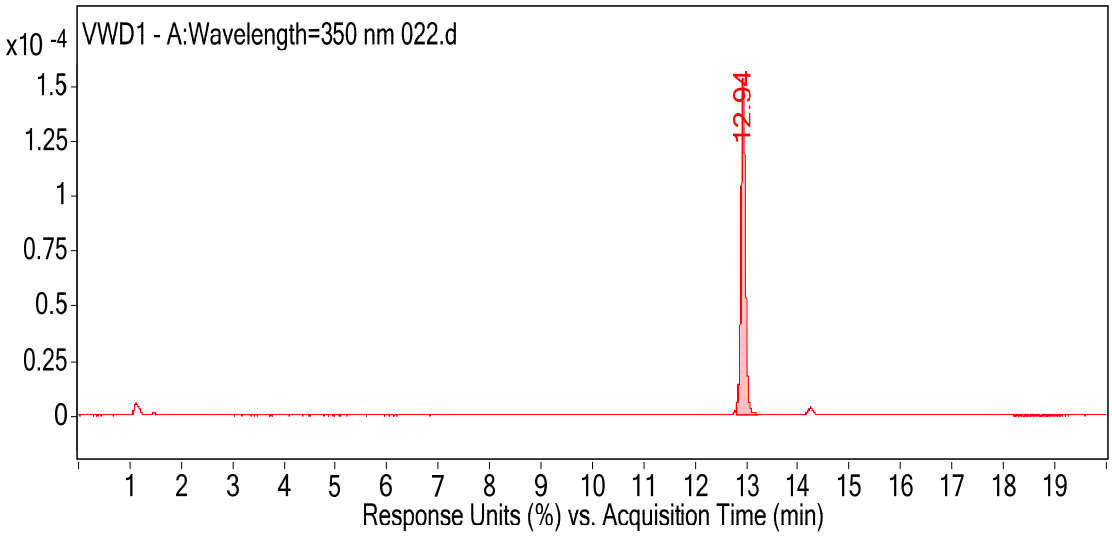
4.3.15 Tangeretin

U inkubacijama tangeretina s humanim jetrenim mikrosomima detektirano je formiranje više od deset produkata metabolizma posredovanog humanim jetrenim citokromima P450. Najveći broj detektiranih metabolita odnosi se na jednostruko i dvostruko demetilirane derivate tangeretina u različitim kombinacijama i na različitim položajima na prstenu A i prstenu B, koji su nađeni u malim količinama. Većina tih metabolita nije mogla biti identificirana zbog toga što nisu bili komercijalno dostupni standardi potencijalnih metabolita. Nijedna jednostruka demetilacija koja se dogodila na prstenu A, te nijedna dvostruka demetilacija nije mogla biti jednoznačno određena samo na temelju provedenih LC-MS i LC-MS/MS analiza. Stoga su ovi produkti karakterizirani do razine vrste reakcije koju su citokromi P450 katalizirali u uvjetima eksperimenta. Ipak, dva glavna metabolita, količinski najzastupljenija u inkubacijama tangeretina s HLM-om, posredno su identificirana na temelju podataka dobivenih LC-MS/MS analizom. MS/MS spektri pokazali su gubitak od –14,01564 Da na prstenu B za glavni metabolit na RT = 9,52 min (slika 46b). Budući da je u strukturi tangeretina na prstenu B prisutna samo jedna metoksilna skupina na položaju 4', ovaj metabolit karakteriziran je kao 4'-demetilirani derivat tangeretina tj. 4'-hidroksi-5,6,7,8-tetrametoksiflavon. Na sličan je način pretpostavljena struktura drugog količinski najzastupljenijeg metabolita na RT = 7,83 min (slika 46b). Za ovaj su metabolit MS/MS spektri pokazali povećanje mase od 1,9799 Da na prstenu B, što upućuje na demetilaciju na položaju 4' i hidroksilaciju na položaju 2' ili 3'. Na temelju literaturnih podataka (vidi poglavlje 1.4) kao i ostalih vlastitih rezultata metabolizma flavonoida posredovanog humanim jetrenim citokromima P450 prezentiranih u ovom radu, preferirano mjesto aromatske hidroksilacije na prstenu B na kojem već postoji supstituent na položaju 4' je položaj 3'. Stoga je metabolit na RT = 7,83 karakteriziran kao najvjerojatniji 4'-demetilirani i 3'-hidroksilirani derivat tangeretina, tj. 3',4'-dihidroksi-5,6,7,8-tetrametoksiflavon. Ovaj metabolit nastao je najvjerojatnije distributivno aromatskom hidroksilacijom na položaju 3' prstena B nakon primarne *O*-demetilacije na položaju 4' prstena B. Ova pretpostavljena metabolička pretvorba glavni je put metabolizma tangeretina kataliziranog humanim jetrenim citokromima P450 koji je shematski prikazan na slici 45.

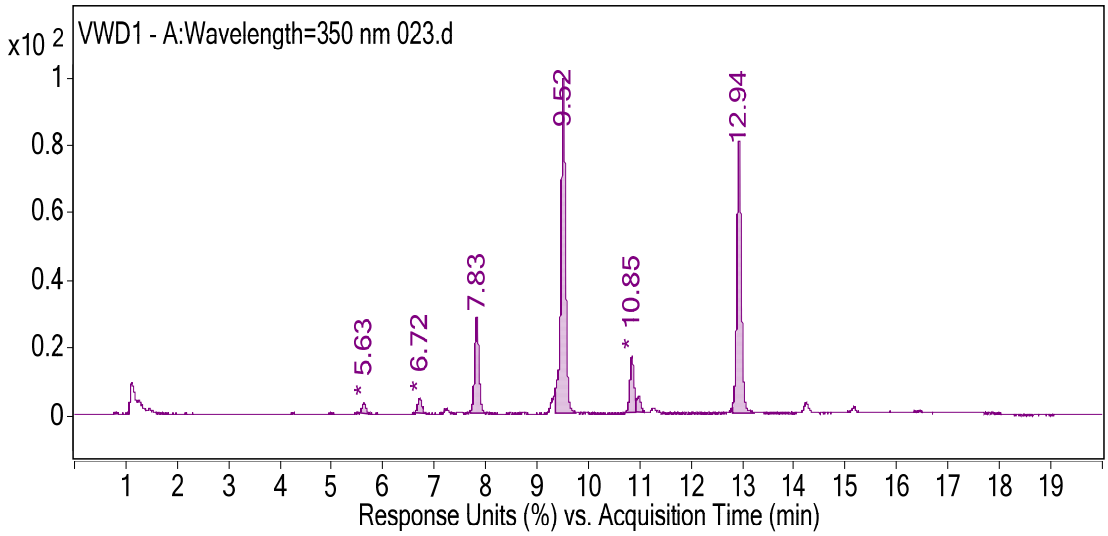


Slika 45. Pretpostavljena shema metaboličke pretvorbe tangeretina posredovane HLM-om. Demetilacijom na položaju 4' prstena B nastaje glavni metabolit 4'-hidroksi-5,6,7,8-tetrametoksiflavon. Distributivnom aromatskom hidroksilacijom 4'-hidroksi-5,6,7,8-tetrametoksiflavona na položaju 3' prstena B nastaje 3',4'-dihidroksi-5,6,7,8-tetrametoksiflavon – drugi količinski najzastupljeniji produkt ovog glavnog metaboličkog puta. Th = teoretska masa, ex = eksperimentalno određena masa.

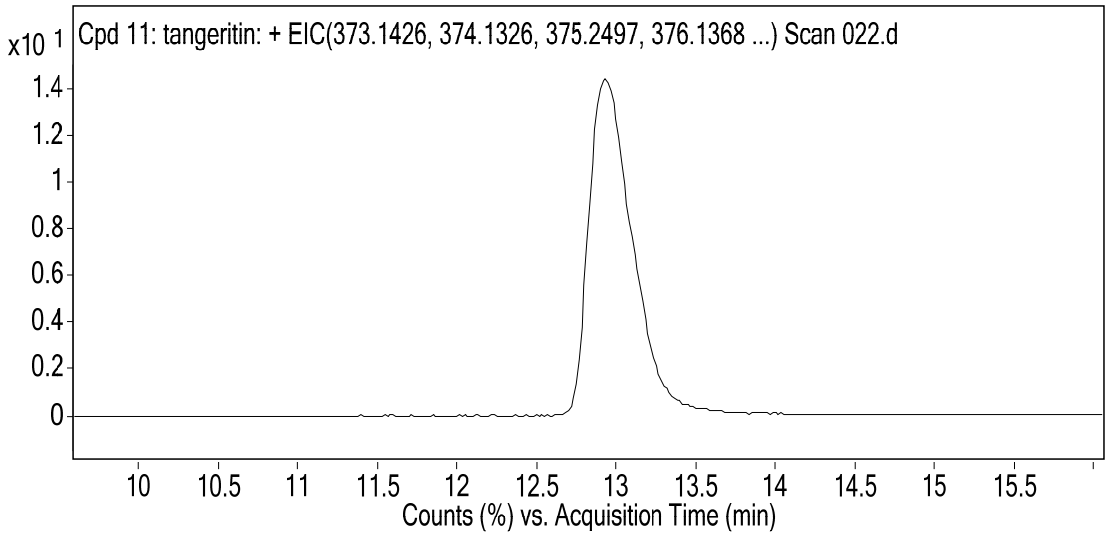
Na slikama 46a-e prikazani su LC/MS podaci na temelju kojih je karakteriziran metabolizam tangeretina posredovan HLM-om.

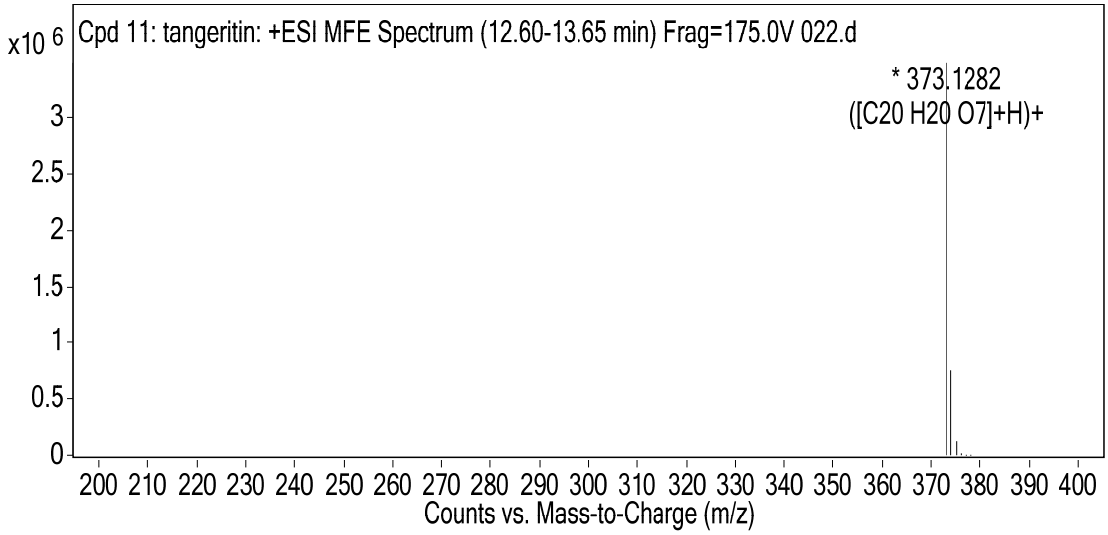


Slika 46a. UV kromatogram inkubacijske smjese tangeretina s HLM-om bez dodanog NADPH-generirajućeg sustava.



Slika 46b. UV kromatogram inkubacijske smjese tangeretina s HLM-om s dodanim NADPH-generirajućim sustavom.

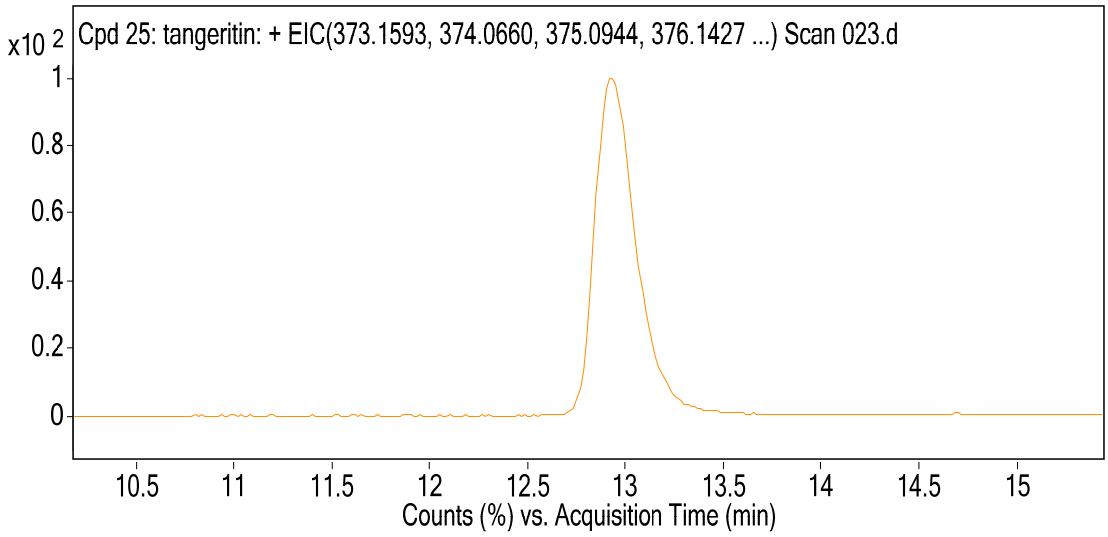


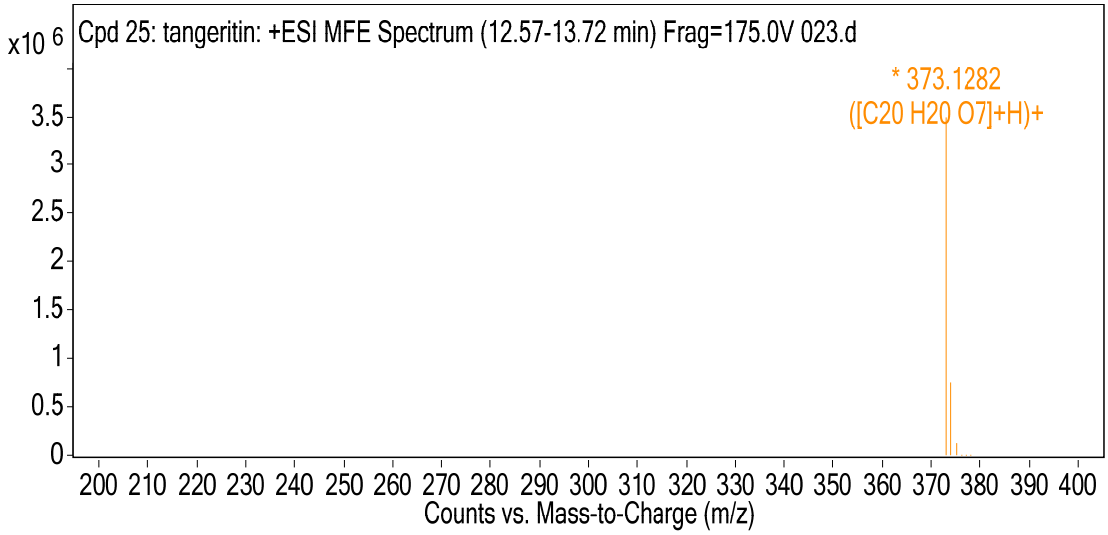


Compound Label	RT	Mass	Name	DB Formula	DB Diff (ppm)
Cpd 11: tangeritin	12,96	372,121	tangeritin	C20 H20 O7	-0,17

Compound Label	Name	*m/z*	RT	Algorithm	Mass
Cpd 11: tangeritin	**tangeritin**	373,1282	12,96	Find by Molecular Feature	372,121

Slika 46c. Kromatogram izdvojenog iona i spektar masa supstrata (tangeretin) u inkubacijskoj smjesi s HLM-om bez dodanog NADPH-generirajućeg sustava.

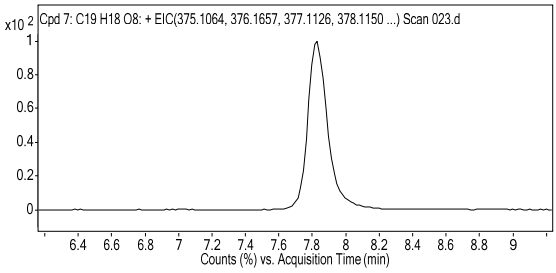


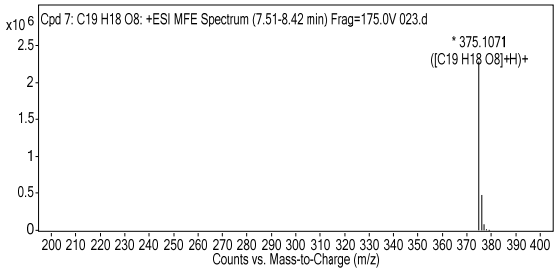


Compound Label	RT	Mass	Name	DB Formula	DB Diff (ppm)
Cpd 25: tangeritin	12,94	372,1209	tangeritin	C20 H20 O7	-0,01

Compound Label	Name	*m/z*	RT	Algorithm	Mass
Cpd 25: tangeritin	**tangeritin**	373,1282	12,94	Find by Molecular Feature	372,1209

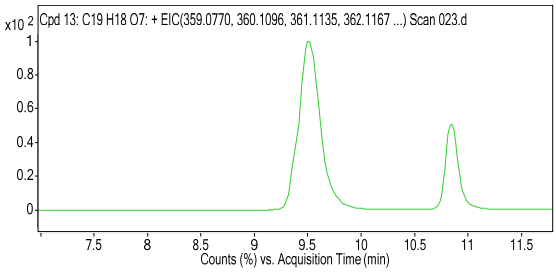
Slika 46d. Kromatogram izdvojenog iona i spektar masa supstrata (tangeretin) u inkubacijskoj smjesi s HLM-om s dodanim NADPH-generirajućim sustavom.

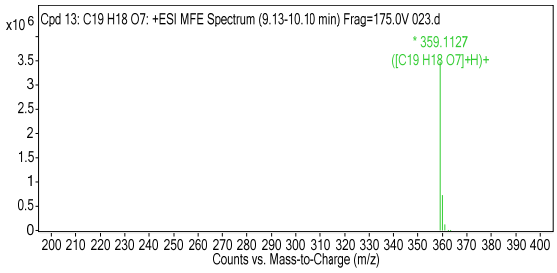




Compound Label	RT	Mass	MFG Formula	MFG Diff (ppm)
Cpd 7: C19 H18 O8	7,83	374,0999	C19 H18 O8	0,67

Compound Label	*m/z*	RT	Algorithm	Mass
Cpd 7: C19 H18 O8	375,1071	7,83	Find by Molecular Feature	374,0999





Compound Label	RT	Mass	MFG Formula	MFG Diff (ppm)
Cpd 13: C19 H18 O7	9,51	358,1053	C19 H18 O7	-0,21

Compound Label	*m/z*	RT	Algorithm	Mass
Cpd 13: C19 H18 O7	359,1127	9,51	Find by Molecular Feature	358,1053

Slika 46e. Kromatogram izdvojenog iona i spektar masa detektiranih metabolita na RT = 7,83 min i RT = 9,51 min u inkubacijskoj smjesi tangeretina s HLM-om s dodanim NADPH-generirajućim sustavom.

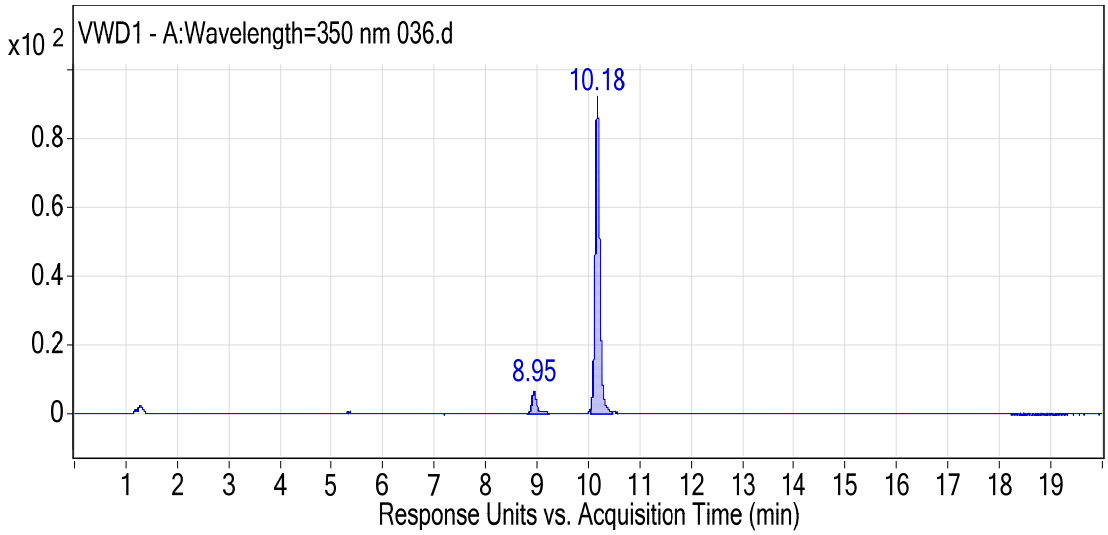
4.4 Određivanje specifičnih citokroma P450 odgovornih za metabolizam odabranih aglikona flavonoida

Flavonoidi koji su pokazali metabolizam u inkubacijama s humanim jetrenim mikrosomima, dalje su ispitivani u inkubacijama s pojedinačnim rekombinantnim citokromima P450 kako je opisano u poglavlju 3.5. Određivanje specifičnih citokroma P450 odgovornih za primijećene metaboličke reakcije provedeno je u ovom eksperimentu samo za one flavonoide koji su probirom u eksperimentu s HLM-om pokazali formiranje metabolita u količini od najmanje 10% (*m*/*m*) u odnosu na količinu supstrata. Stoga su u nastavku prikazani rezultati metabolizma s pojedinačnim rekombinantnim citokromima P450 za sljedećih 10 flavonoidnih aglikona: 3,7-dihidroksiflavon, 7-hidroksiflavon, akacetin, apigenin, flavon, galangin, kemferol, naringenin, sakuranetin i tangeretin.

U ovom poglavlju nije prikazan kompletan set LC-MS podataka za inkubacije s pojedinačnim rekombinantnim citokromima P450, budući da je metabolizam praćen na isti način kao i u eksperimentu s HLM-om i generirana je ista vrsta podataka na temelju kojih je napravljena identifikacija metabolita. Kompletni podaci za iste metabolite već su prikazani u poglavlju 4.3, a ovdje je za svaki flavonoid prikazan samo UV-kromatogram onih inkubacijskih smjesa u kojima su detektirani produkti metabolizma.

4.4.1 3,7-Dihidroksiflavon

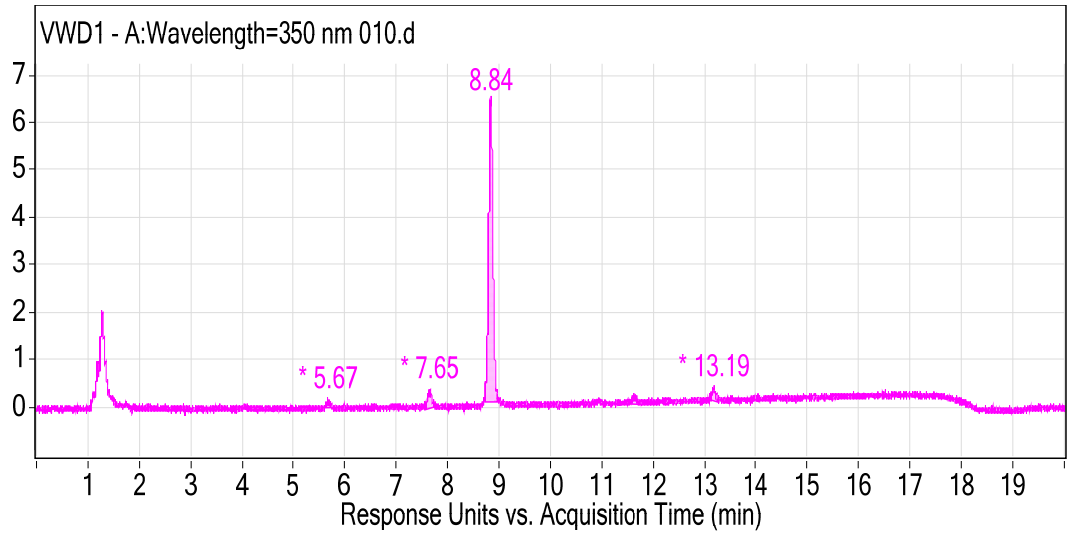
Inkubacijama s pojedinačnim rekombinantnim citokromima P450 utvrđeno je da je za metabolizam 3,7-dihiroksiflavona odgovoran enzim CYP1A2. Taj enzim jedini je od ispitanih djelovao na metaboličku pretvorbu 3,7-dihidroksiflavona, ali nije katalizirao glavnu metaboličku reakciju aromatske hidroksilacije na položaju 4' prstena B primijećenu u eksperimentu s HLM-om (slika 17), nego sekundarnu reakciju hidroksilacije na prstenu A na položaju 6 ili 8, pri čemu je nastao kao jedini metabolit 3,6,7-trihidroksiflavon ili 3,7,8-trihidroksiflavon (RT = 8,95 min, slika 47). Glavnu metaboličku pretvorbu 3,7-dihiroksiflavona u 3,7,4'-trihidroksiflavon nije katalizirao nijedan od ispitanih enzima.



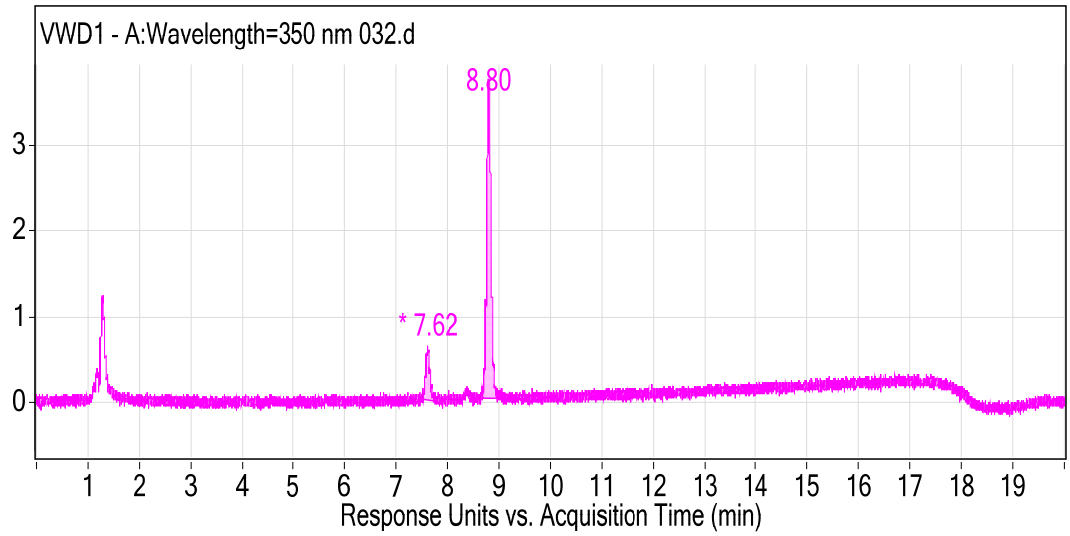
Slika 47. UV kromatogram inkubacijske smjese 3,7-dihidroksiflavona s CYP1A2 s dodanim NADPH-generirajućim sustavom. Vrh na RT = 8,95 min karakteriziran je kao 3,6,7-trihidroksiflavon ili 3,7,8-trihidroksiflavon i jedini je nastali metabolit u ovom eksperimentu.

4.4.2 7-Hidroksiflavon

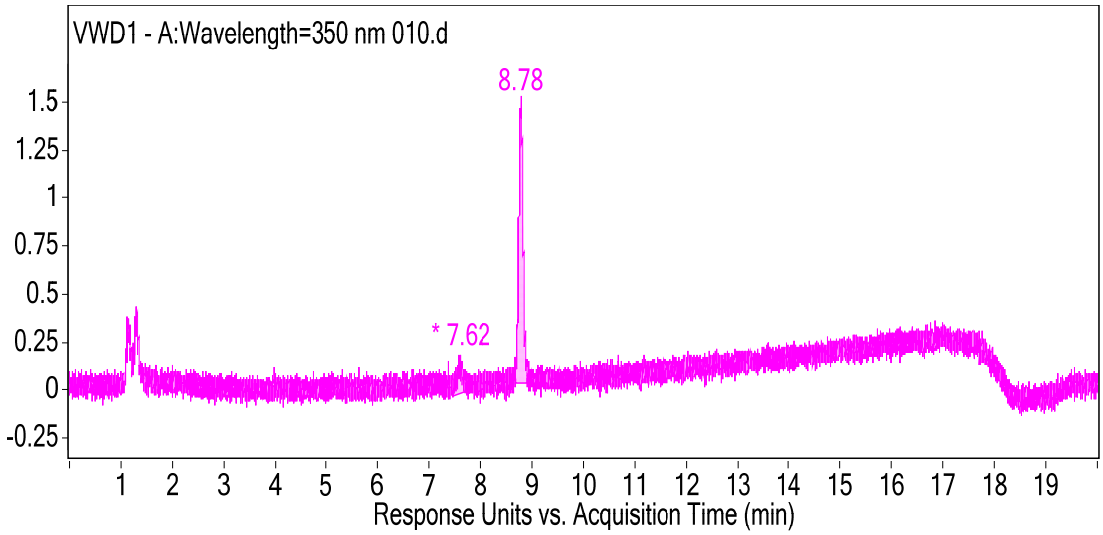
Inkubacijama s pojedinačnim rekombinantnim citokromima P450 utvrđeno je da su za metabolizam 7-hiroksiflavona odgovorni enzimi CYP1A2, CYP2D6 i CYP3A4. Dva hidroksilirana metabolita (6,7-dihidroksiflavon i 7,8-dihidroksiflavon), primijećena u eksperimentu s HLM-om, nastala su samo u inkubacijama s CYP3A4 (slika 48). U inkubacijama s CYP1A2 i CYP2D6 detektiran je jedino 6,7-dihidroksiflavon (slike 49 i 50), glavni metabolit iz eksperimenta s HLM-om. Iako je CYP3A4 katalizirao oba metabolička puta primijećena u eksperimentu s HLM-om (slika 19), ukupni obim metabolizma nešto je manji u odnosu CYP1A2 i CYP2D6. Na temelju rezultata može se zaključiti da su sva tri enzima citokroma P450 podjednako važna za oksidativni metabolizam 7-hidroksiflavona. Reakciju u kojoj nastaje 7,4'-dihidroksiflavon nije katalizirao nijedan od ispitanih enzima.



Slika 48. UV kromatogram inkubacijske smjese 7-hidroksiflavona s CYP3A4 s dodanim NADPH-generirajućim sustavom. Vrh na RT = 7,65 min identificiran je kao 6,7-dihidroksiflavon i glavni je metabolit nastao u ovom eksperimentu. Vrh na RT = 5,67 min identificiran je kao 7,8-dihidroksiflavon.



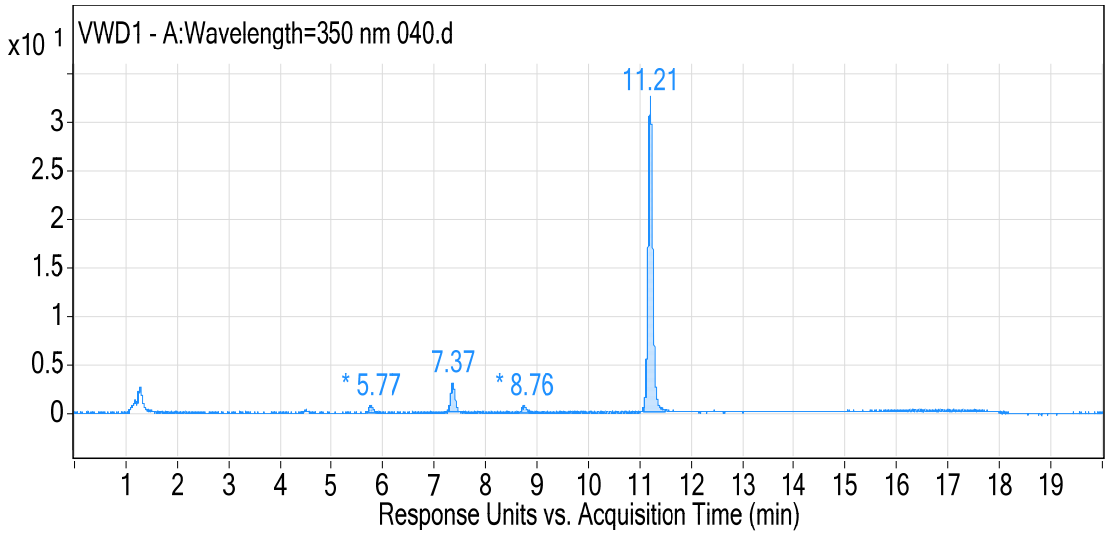
Slika 49. UV kromatogram inkubacijske smjese 7-hidroksiflavona s CYP1A2 s dodanim NADPH-generirajućim sustavom. Vrh na RT = 7,62 min identificiran je kao 6,7-dihidroksiflavon i jedini je metabolit nastao u ovom eksperimentu.



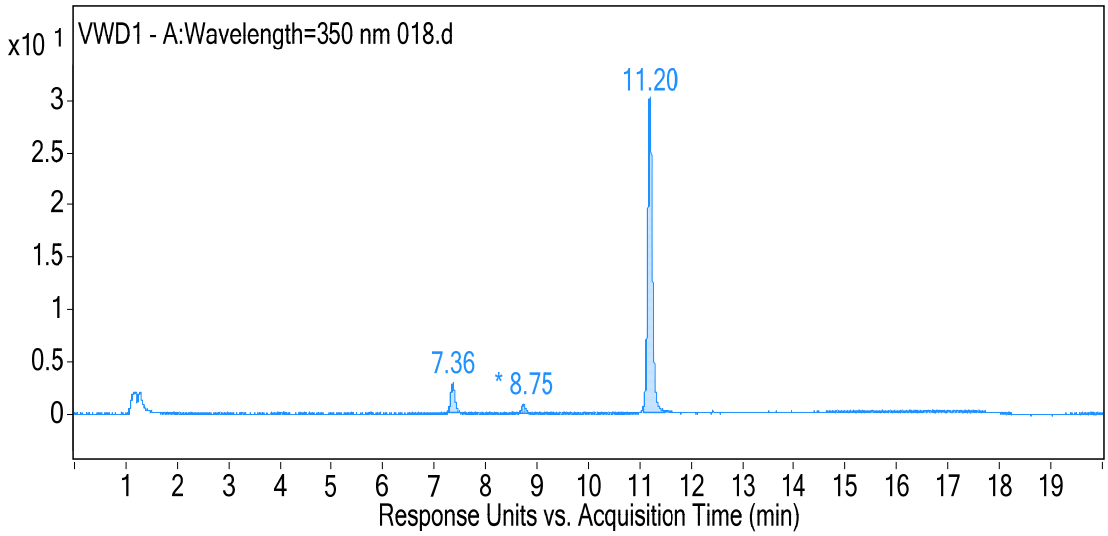
Slika 50. UV kromatogram inkubacijske smjese 7-hidroksiflavona s CYP2D6 s dodanim NADPH-generirajućim sustavom. Vrh na RT = 7,62 min identificiran je kao 6,7-dihidroksiflavon i jedini je metabolit nastao u ovom eksperimentu.

4.4.3 Akacetin

Inkubacijama s pojedinačnim rekombinantnim citokromima P450 utvrđeno je da su za metabolizam akacetina odgovorni enzimi CYP1A2 i CYP2D6. U eksperimentu s CYP1A2 nastala su oba produkta metabolizma primijećena u inkubacijama s HLM-om (slika 21), apigenin i luteolin (slika 51), dok je CYP2D6 katalizirao samo demetilaciju akacetina pri čemu je nastao jedini produkt metabolizma apigenin (slika 52). U oba eksperimenta, glavni je produkt apigenin nastao u približno jednakim količinama.



Slika 51. UV kromatogram inkubacijske smjese akacetina s CYP1A2 s dodanim NADPH-generirajućim sustavom. Vrh na RT = 7,37 min identificiran je kao apigenin i glavni je metabolit nastao u ovom eksperimentu. Vrh na RT = 5,77 min identificiran je kao luteolin.

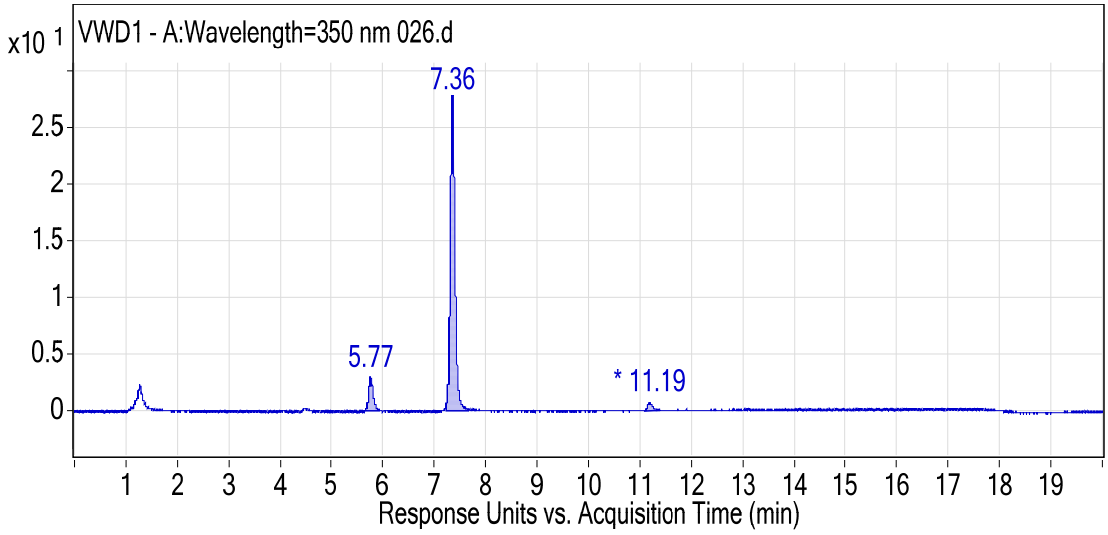


Slika 52. UV kromatogram inkubacijske smjese akacetina s CYP2D6 s dodanim NADPH-generirajućim sustavom. Vrh na RT = 7,36 min identificiran je kao apigenin i jedini je metabolit nastao u ovom eksperimentu.

4.4.4 Apigenin

Inkubacijama s pojedinačnim rekombinantnim citokromima P450 utvrđeno je da je za metabolizam apigenina odgovoran enzim CYP1A2. Jednako kao u eksperimentu s HLM-om, u inkubacijama s CYP1A2 primijećen je nastanak jedinog metabolita luteolina (slika 53), što

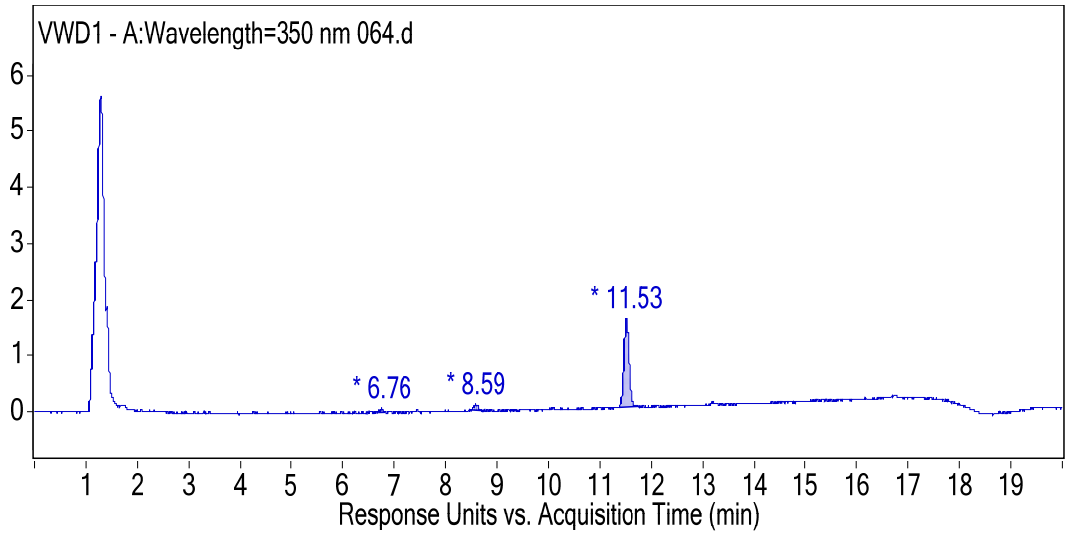
upućuje na zaključak da ovaj enzim katalizira aromatsku hidroksilaciju supstrata apigenina na položaju 3' prstena B (slika 23).



Slika 53. UV kromatogram inkubacijske smjese apigenina s CYP1A2 s dodanim NADPH-generirajućim sustavom. Vrh na RT = 5,77 min identificiran je kao luteolin i jedini je metabolit nastao u ovom eksperimentu.

4.4.5 Flavon

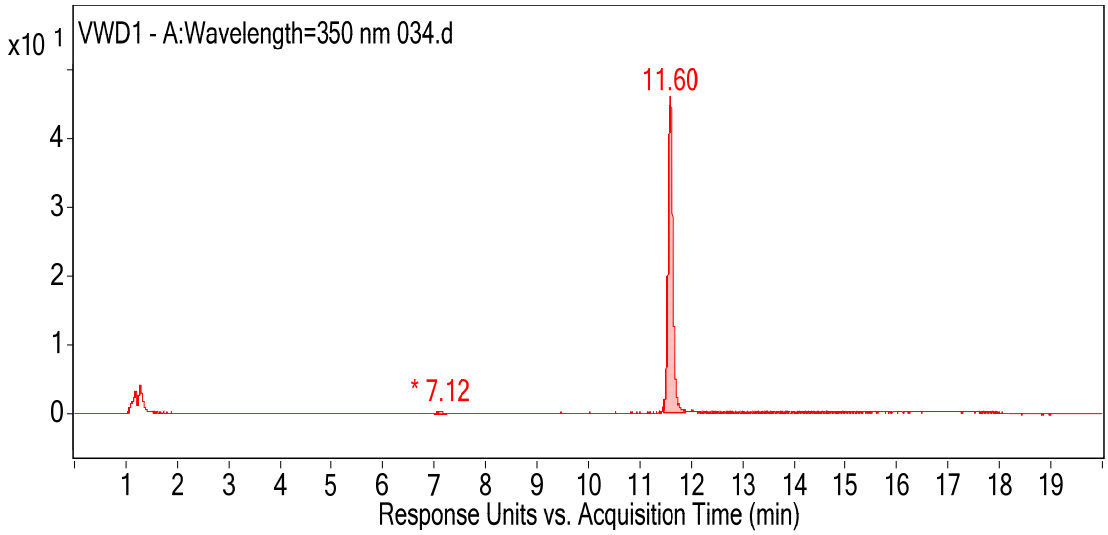
Inkubacijama s pojedinačnim rekombinantnim citokromima P450 utvrđeno je da je za metabolizam flavona odgovoran enzim CYP1A2. U inkubacijama s CYP1A2, slično kao i u eksperimentu s HLM-om (slika 27), nastao je kao dominantni metabolit 4'-hidroksiflavon (RT = 8,59, slika 54). MS-detektorom primijećen je nastanak još nekoliko hidroksiliranih produkata s različitim vremenima elucije, ali u praktički zanemarivim količinama. Ovo se odnosi i na vrh na RT = 6,76 min na kromatogramu na slici 54 koji je karakteriziran kao dvostruko hidroksilirani derivat flavona nastao u zanemarivo maloj količini. Pronalazak 4'-hidroksiflavona kao glavnog produkta metabolizma u inkubacijama s CYP1A2 upućuje na zaključak da je aromatska hidroksilacija supstrata flavona na položaju 4' prstena B katalizirana pomoću ovog enzima.



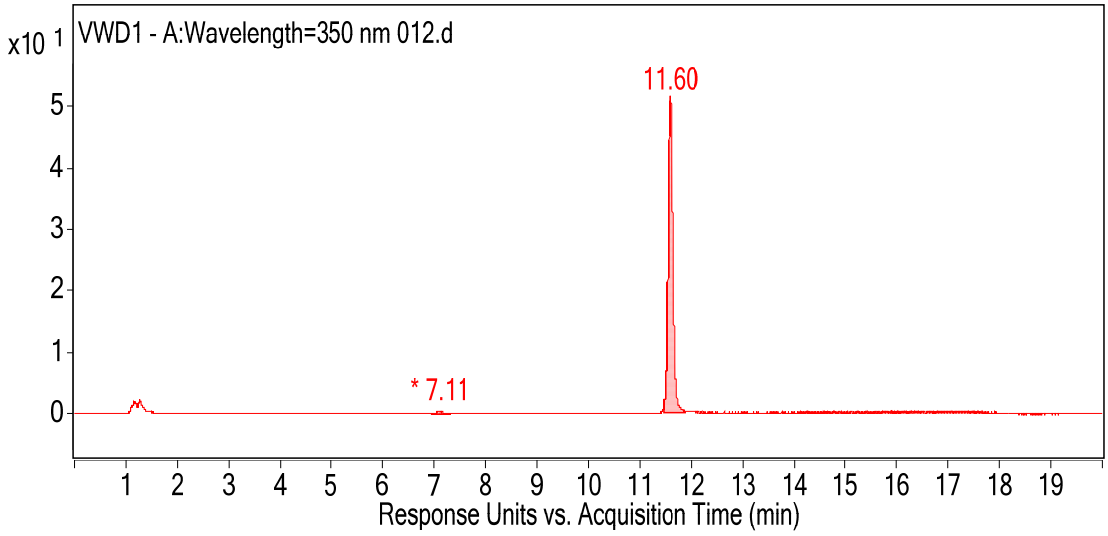
Slika 54. UV kromatogram inkubacijske smjese flavona s CYP1A2 s dodanim NADPH-generirajućim sustavom. Vrh na RT = 8,59 min identificiran je kao 4'-hidroksiflavon i glavni je metabolit nastao u ovom eksperimentu. Vrh na RT = 6,76 min karakteriziran je kao dvostruko hidroksilirani produkt metabolizma flavona nastao u zanemarivim količinama.

4.4.6 Galangin

Inkubacijama s pojedinačnim rekombinantnim citokromima P450 utvrđeno je da su za metabolizam galangina odgovorni enzimi CYP2C19 i CYP2D6. Jednako kao u eksperimentu s HLM-om, u inkubacijama s CYP2C19 i CYP2D6 primijećen je nastanak jedinog metabolita kemferola (slike 55 i 56), što upućuje na zaključak da ovi enzimi kataliziraju aromatsku hidroksilaciju supstrata galangina na položaju 4' prstena B (slika 29). Ovdje treba istaknuti da su u uvjetima eksperimenta u oba slučaja nastale male količine kemferola, znatno manje u odnosu na eksperiment s HLM-om.



Slika 55. UV kromatogram inkubacijske smjese apigenina s CYP2C19 s dodanim NADPH-generirajućim sustavom. Vrh na RT = 7,12 min identificiran je kao kemferol i jedini je metabolit nastao u ovom eksperimentu.

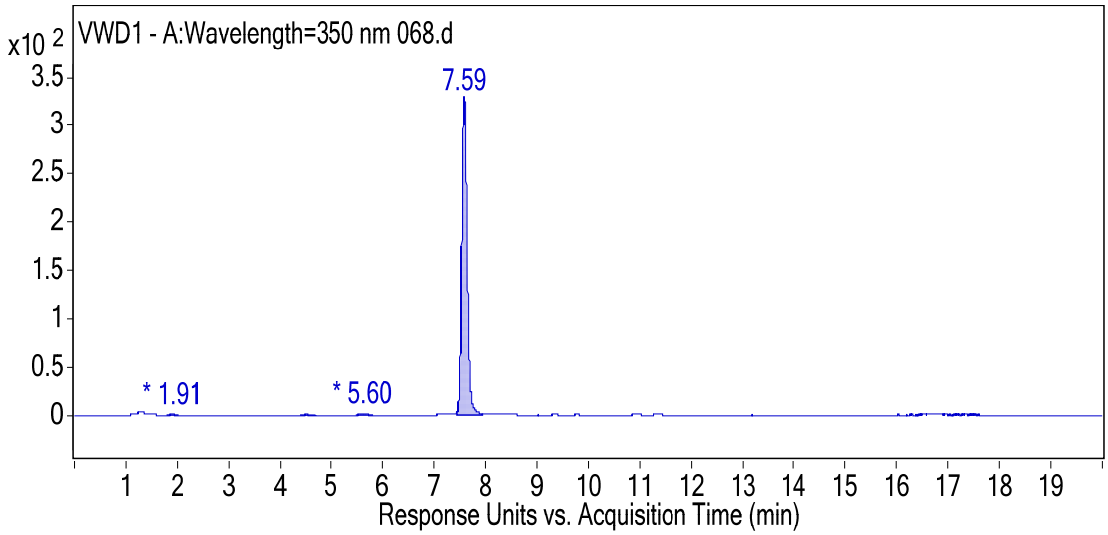


Slika 56. UV kromatogram inkubacijske smjese apigenina s CYP2D6 s dodanim NADPH-generirajućim sustavom. Vrh na RT = 7,11 min identificiran je kao kemferol i jedini je metabolit nastao u ovom eksperimentu.

4.4.7 Kemferol

Inkubacijama s pojedinačnim rekombinantnim citokromima P450 utvrđeno je da je za metabolizam kemferola odgovoran enzim CYP1A2. U inkubacijama s CYP1A2, slično kao i u eksperimentu s HLM-om, jedini detektirani metabolit bio je kvercetin (RT = 5,60 min, slika 57). Pronalazak kvercetina kao jedinog produkta metabolizma u inkubacijama s CYP1A2 upućuje na zaključak da je aromatska hidroksilacija supstrata kemferola na položaju 3' prstena

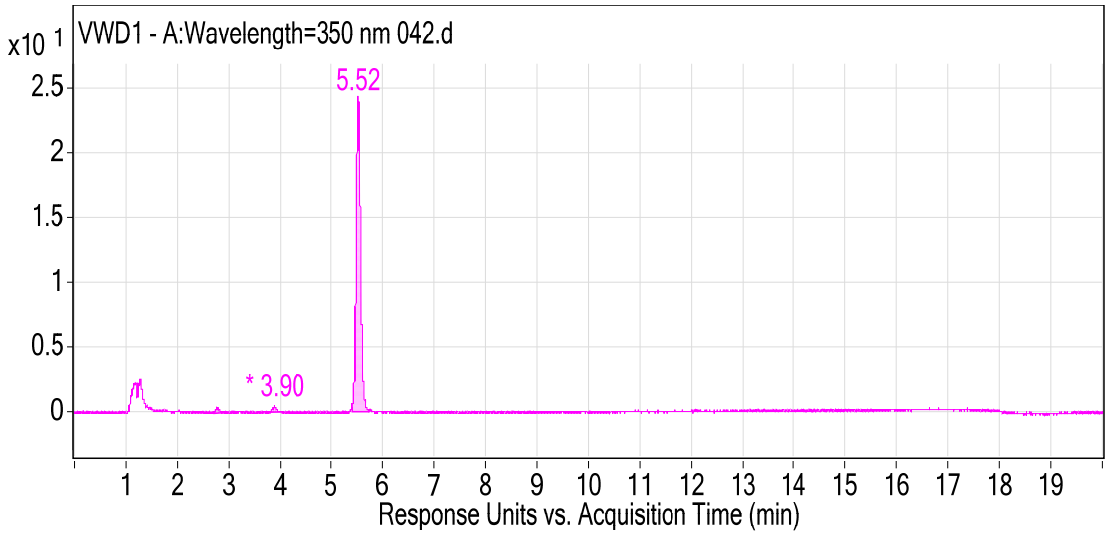
B katalizirana pomoću ovog enzima (slika 35). Slično kao i kod galangina, ovdje treba istaknuti da je u uvjetima eksperimenta nastala mala količina kemferola, znatno manja u odnosu na eksperiment s HLM-om.



Slika 57. UV kromatogram inkubacijske smjese kemferola s CYP1A2 s dodanim NADPH-generirajućim sustavom. Vrh na RT = 5,60 min identificiran je kao kvercetin i jedini je metabolit nastao u ovom eksperimentu.

4.4.8 Naringenin

Inkubacijama s pojedinačnim rekombinantnim citokromima P450 utvrđeno je da je za metabolizam naringenina odgovoran enzim CYP1A2. U inkubacijama s CYP1A2, slično kao i u eksperimentu s HLM-om, jedini detektirani metabolit bio je eriodiktiol (RT = 3,90 min, slika 58). Pronalazak eriodiktiola kao jedinog produkta metabolizma u inkubacijama s CYP1A2 upućuje na zaključak da je aromatska hidroksilacija supstrata naringenina na položaju 3' prstena B katalizirana pomoću ovog enzima (slika 39).

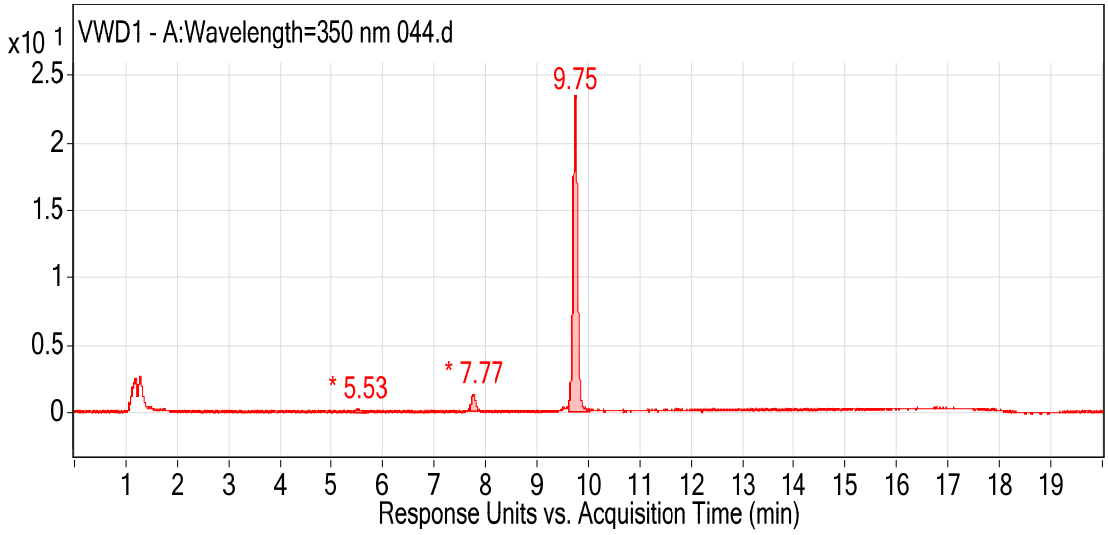


Slika 58. UV kromatogram inkubacijske smjese naringenina s CYP1A2 s dodanim NADPH-generirajućim sustavom. Vrh na RT = 5,60 min identificiran je kao kvercetin i jedini je metabolit nastao u ovom eksperimentu.

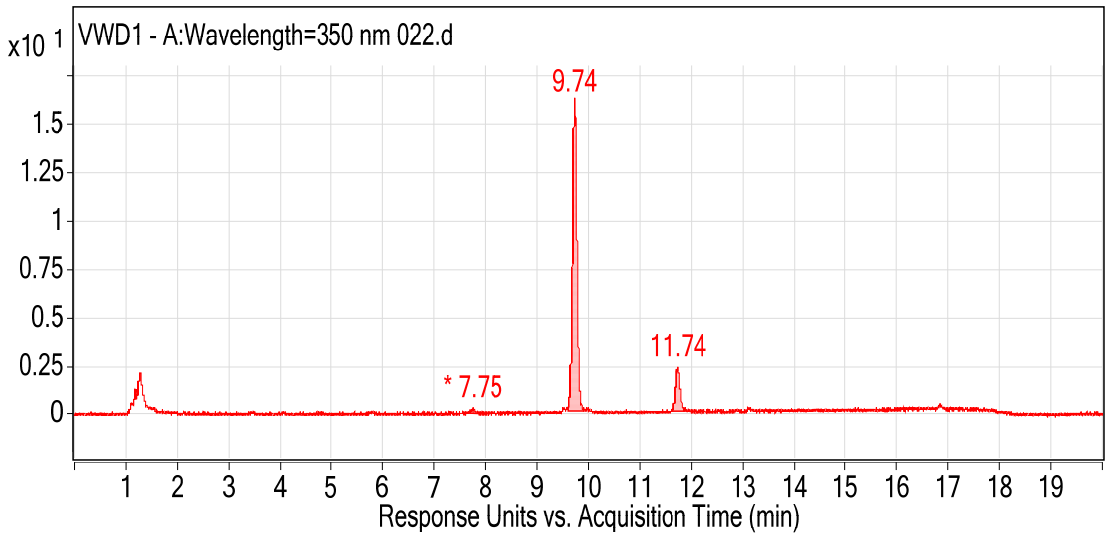
4.4.9 Sakuranetin

Inkubacijama s pojedinačnim rekombinantnim citokromima P450 utvrđeno je da su za metabolizam sakuranetina odgovorni enzimi CYP1A2 i CYP3A4. U inkubacijama s CYP1A2 detektirana su dva metabolita: 5,3',4'-trihidroksi-7-metoksiflavanon (RT = 7,77 min, slika 59) i naringenin (RT = 5,53 min, slika 59). Pronalazak ta dva metabolita upućuje na zaključak da CYP1A2 katalizira pretvorbu sakuranetina i putem *O*-demetilacije i putem aromatske hidroksilacije kako je utvrđeno eksperimentom s HLM-om (slika 43), no njihovi omjeri sugeriraju da je za razliku od eksperimenta s HLM-om, uz čisti enzim CYP1A2 preferirana aromatska hidroksilacija sakuranetina na položaju 3' prstena B u odnosu na *O*-demetilaciju na položaju 7 prstena A. U inkubacijama s CYP3A4 također su detektirana dva metabolita: opet 5,3',4'-trihidroksi-7-metoksiflavanon (RT = 7,75 min, slika 60) i nepoznati spoj razlike u masi od –2,0155 Da u odnosu na supstrat sakuranetin i molekulske formule $C_{16}H_{12}O_5$ (RT = 11,74 min, slika 60). Štoviše, ovo je bio dominantan produkt metabolizma u inkubacijama s CYP3A4, dok je 3'-hidroksilirani derivat sakuranetina nastao u nešto manjoj količini. Ovakav rezultat upućuje na zaključak da je uz CYP3A4 slično kao i uz CYP1A2 preferirana aromatska hidroksilacija sakuranetina na položaju 3' prstena B u odnosu na *O*-demetilaciju na položaju 7 prstena A, koja uz CYP3A4 nije uopće katalizirana. Ipak glavni put metaboličke pretvorbe sakuranetina uz CYP3A4 ostaje nerazjašnjen zbog nemogućnosti identifikacije metabolita na RT = 11,74 min. Distributivnu aromatsku hidroksilaciju naringenina, primarnog

metabolita iz eksperimenta s HLM-om, i njegovu pretvorbu u eriodiktiol nije katalizirao nijedan od ispitanih enzima.



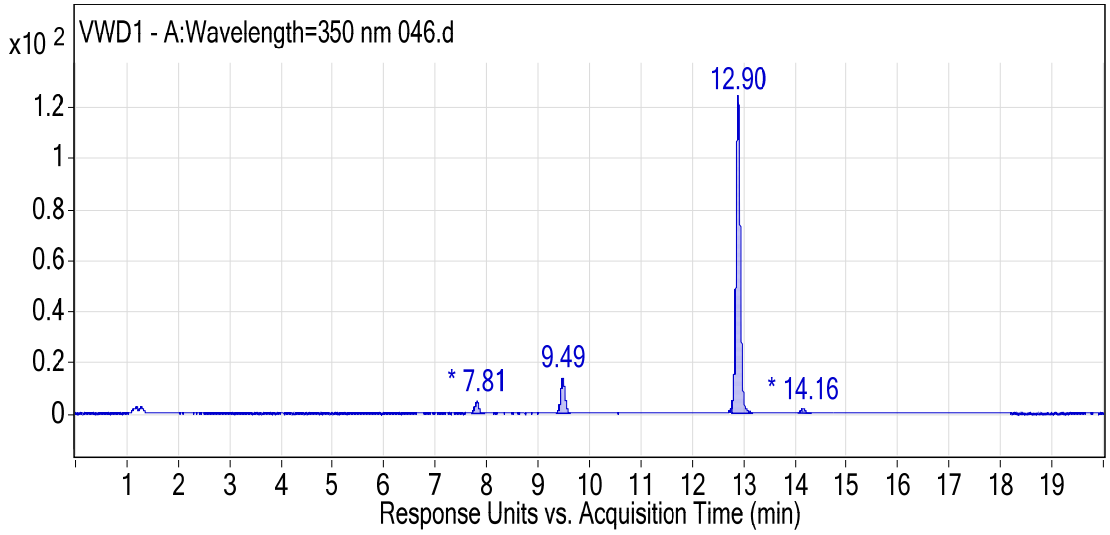
Slika 59. UV kromatogram inkubacijske smjese sakuranetina s CYP1A2 s dodanim NADPH-generirajućim sustavom. Vrh na RT = 7,77 min identificiran je kao 5,3',4'-trihidroksi-7-metoksiflavanon i glavni je metabolit detektiran u ovom eksperimentu. Vrh na RT = 5,53 min identificiran je kao naringenin.



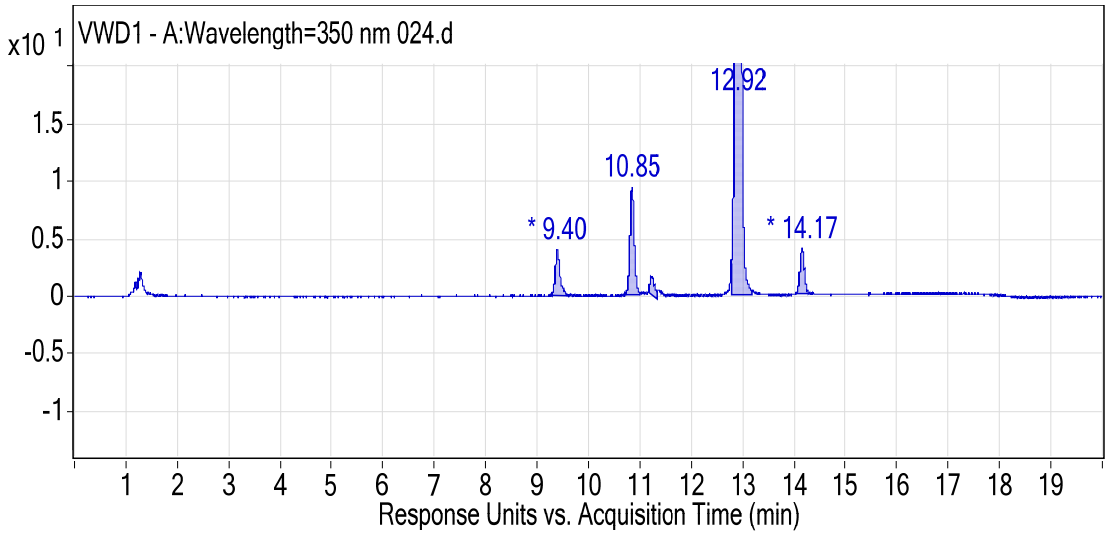
Slika 60. UV kromatogram inkubacijske smjese sakuranetina s CYP3A4 s dodanim NADPH-generirajućim sustavom. Primarni metabolit detektiran u ovom eksperimentu je vrh na RT = 11,74 min, nepoznati spoj razlike u masi od –2,0155 Da u odnosu na supstrat sakuranetin i molekulske formule $C_{16}H_{12}O_5$. Vrh na RT = 7,75 min identificiran je kao 5,3',4'-trihidroksi-7-metoksiflavanon i sekundarni je metabolit detektiran u ovom eksperimentu.

4.4.10 Tangeretin

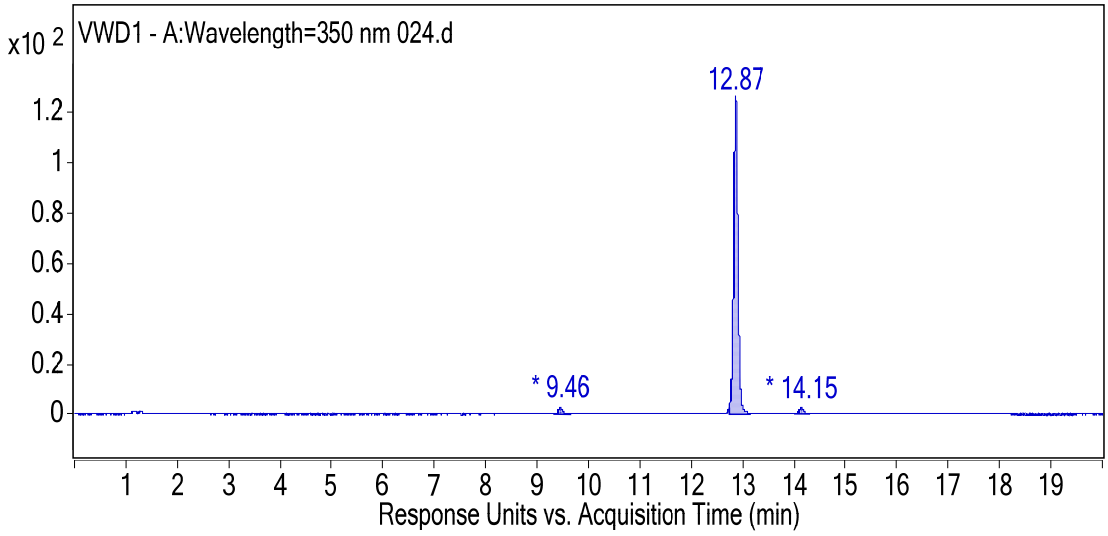
Inkubacijama s pojedinačnim rekombinantnim citokromima P450 utvrđeno je da su za metabolizam tangeretina odgovorni enzimi CYP1A2, CYP2D6 i CYP3A4. Prema količini nastalih produkata metabolizma, može se zaključiti da najvažniju ulogu imaju CYP1A2 i CYP3A4. Ipak, može se zaključiti da je CYP1A2 najvažniji enzim za oksidativni metabolizam tangeretina budući da je katalizirao njegovu glavnu metaboličku reakciju primijećenu u eksperimentu s HLM-om (slika 45), odnosno 4'-demetilaciju (RT = 9,49 min, slika 61), nakon čega slijedi hidroksilacija na položaju 3' prstena B (RT = 7,81 min, slika 61) , i to u najvećem obimu. CYP3A4 katalizirao je samo reakciju 4'-demetilacije tangeretina (RT = 9,40 min, slika 62), bez daljnje pretvorbe u 3'-hidroksilirani produkt. Međutim, 4'-demetilirani derivat bio je tek drugi količinski najzastupljeniji metabolit uz CYP3A4, dok je glavni metabolit bio derivat tangeretina jednostruko demetiliran na prstenu A (RT = 10,85 min, slika 62). CYP2D6 katalizirao je tek pretvorbu tangeretina u 4'-demetilirani derivat (RT = 9,46 min, slika 63) i to u manjoj količini.



Slika 61. UV kromatogram inkubacijske smjese tangeretina s CYP1A2 s dodanim NADPH-generirajućim sustavom. Vrh na RT = 9,49 min karakteriziran je kao 4'-hidroksi-5,6,7,8-tetrametoksiflavon i glavni je metabolit u ovom eksperimentu. Vrh na RT = 7,81 min karakteriziran je kao 3',4'-dihidroksi-5,6,7,8-tetrametoksiflavon.



Slika 62. UV kromatogram inkubacijske smjese tangeretina s CYP3A4 s dodanim NADPH-generirajućim sustavom. Vrh na RT = 10,85 min karakteriziran je kao derivat tangeretina jednostruko demetiliran na prstenu A i glavni je metabolit u ovom eksperimentu. Vrh na RT = 9,40 min karakteriziran je kao 4'-hidroksi-5,6,7,8-tetrametoksiflavon.



Slika 63. UV kromatogram inkubacijske smjese tangeretina s CYP2D6 s dodanim NADPH-generirajućim sustavom. Vrh na RT = 9,46 min karakteriziran je kao 4'-hidroksi-5,6,7,8-tetrametoksiflavon i jedini je metabolit detektiran u ovom eksperimentu.

4.5 Inhibicije metabolizma specifičnim inhibitorima citokroma P450

Eksperiment s inhibicijama metabolizma specifičnim inhibitorima citorkoma P450 proveden je na način kako je opisano u poglavlju 3.6. U nastavku su prezentirani rezultati za ispitane odgovarajuće metaboličke reakcije primijećene kod 3,7-dihidroksiflavona i sakuranetina, a koje nisu mogle biti pripisane djelovanju nijednog od ispitanih rekombinantnih citokroma P450.

4.5.1 3,7-Dihidroksiflavon

U eksperimentu s 3,7-dihidroksiflavonom praćena je inhibicija reakcije aromatske hidroksilacije susptrata na položaju 4' prstena B, tj. reakcija 3,7-dihidroksiflavon → 3,7,4'-trihidroksiflavon (slika 17). Praćena je količina nastalog metabolita određenog preko UV signala izražena masenim udjelom. Izračunata je ostatna aktivnost (eng. *recovery*) kao postotni omjer prosječne količine metabolita u inkubacijama s dodanim inhibitorom i prosječne količine metabolita u inkubacijama bez dodanog inhibitora prema sljedećoj formuli (2):

$$Ostatna\ aktivnost\ [\%] = \frac{\overline{P_{\mathrm{i}}}}{\overline{P}} \times 100\% \qquad (2)$$

gdje je $\overline{P_{\mathrm{i}}}$ prosječna količina metabolita nastalog u inkubacijama s dodanim inhibitorom, a $\overline{P}$ prosječna količina metabolita nastalog u inkubacijama bez dodanog inhibitora.

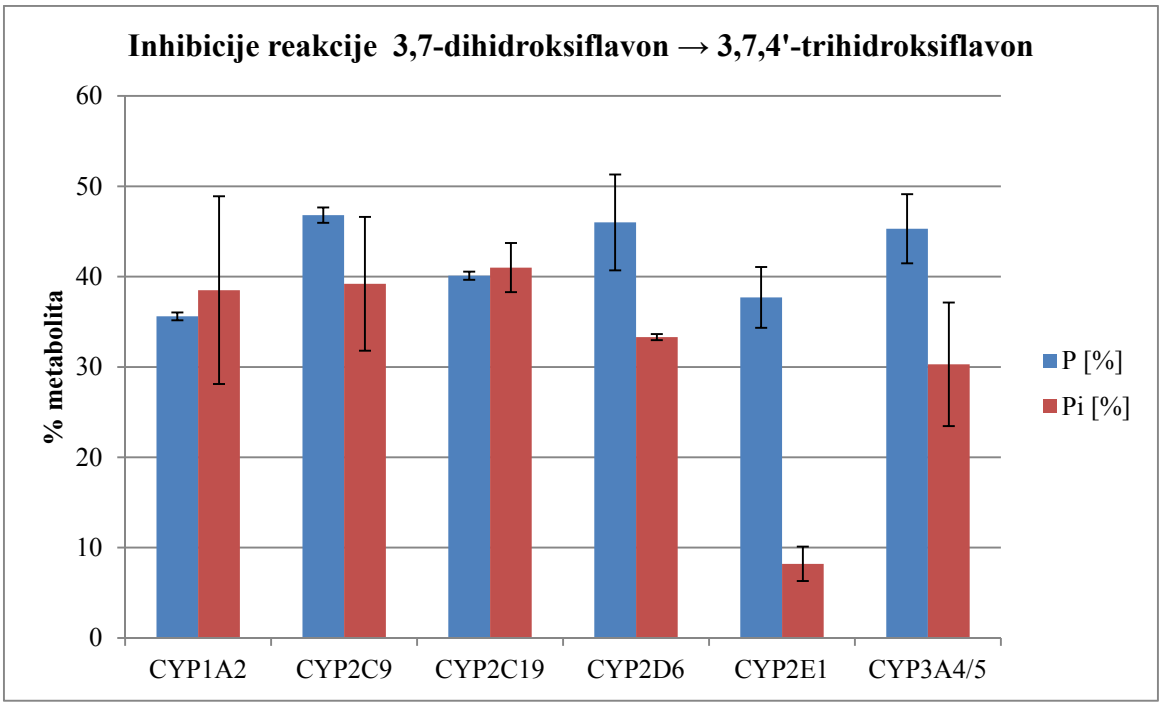
Pojedinačni rezultati iskorištenja statistički su obrađeni primjenom Studentovog *t*-testa s jednim krakom za dva uzorka jednakih varijanci korištenjem statističke funkcije T.TEST u programu Microsoft Excel 2010.

Ukupni rezultati prikazani su u tablici 6 i grafički na slici 64.

Tablica 6. Rezultati inhibicija reakcije 3,7-dihidroksiflavon → 3,7,4'-trihidroksiflavon. Simbolika znakova u tablici i način izračuna iskorištenja objašnjena je u tekstu iznad.

Inhibitor*	Metabolit	$\overline{P}$ [%]	$\overline{P_i}$ [%]	Studentova *t*-vrijednost	Ostatna aktivnost [%]
CYP1A2	3,7,4'-trihidroksiflavon	35,6 ± 0,9	38,5± 20,8	0,431	108
CYP2C9	3,7,4'-trihidroksiflavon	46,8± 1,7	39,2± 14,8	0,272	84
CYP2C19	3,7,4'-trihidroksiflavon	40,1± 0,9	41,0 ± 5,5	0,420	102
CYP2D6	3,7,4'-trihidroksiflavon	46,0 ± 10,6	33,3 ± 0,7	0,117	72
CYP2E1	3,7,4'-trihidroksiflavon	37,7 ± 6,7	8,2 ± 3,8	0,016	22
CYP3A4/5	3,7,4'-trihidroksiflavon	45,3 ± 7,7	30,3 ± 13,7	0,154	67

* U eksperimentu s CYP2C8 inhibitor je ko-eluirao zajedno s metabolitom te zbog interferencije na UV signalu nije bilo moguće odrediti količinu nastalog metabolita u inkubacijama s dodanim inhibitorom.



Slika 64. Grafički prikaz rezultata inhibicije reakcije 3,7-dihidroksiflavon → 3,7,4'-trihidroksiflavon. Plavi stupci označeni kao „P [%]“ predstavljaju količine metabolita nastalog u inkubacijama bez dodanog inhibitora, a crveni stupci označeni kao „Pi [%]“ predstavljaju količine metabolita nastalog u inkubacijama s dodanim inhibitorom. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrijednost ± standardna pogreška (n = 3).

Dobiveni rezultati ukazuju na nisku ostatnu aktivnost i statistički značajnu ($P < 0,05$) inhibiciju promatrane metaboličke reakcije u inkubacijama s dodanim specifičnim inhibitorom CYP2E1. Na temelju rezultata može se zaključiti da među ispitanim citokromima P450 enzim CYP2E1 ima značajnu ulogu u kataliziranju promatrane reakcije 3,7-dihidroksiflavon → 3,7,4'-trihidroksiflavon, a prema opsegu inhibicije od 80% proizlazi da je ujedno i najznačajniji za ovu metaboličku pretvorbu.

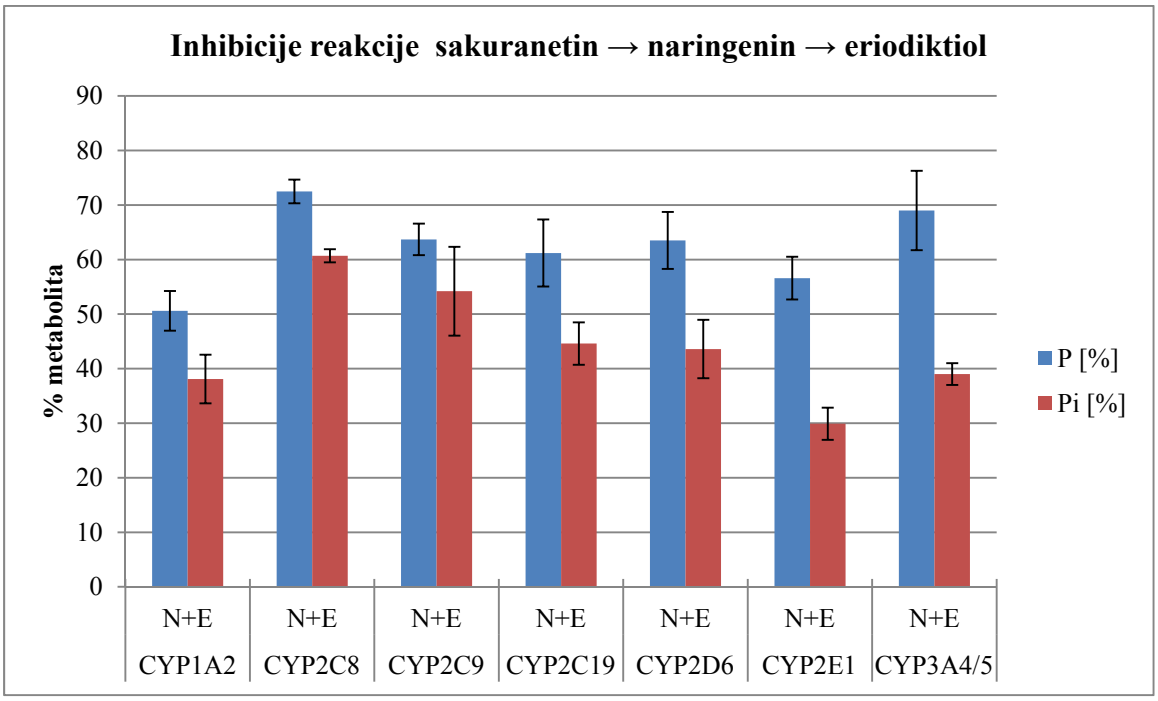
4.5.2 Sakuranetin

U eksperimentu sa sakuranetinom praćena je inhibicija kombinirane reakcije *O*-demetilacije sakuranetina na položaju 7 prstena A te skevencijalne aromatske hidroksilacije nastalog naringenina na položaju 3' prstena B. Reakcija se može shematski napisati ovako: sakuranetin → naringenin → eriodiktiol (slika 43). Praćena je količina nastalih metabolita određena preko UV signala i izražena masenim udjelom. Izračunata je ostatna aktivnost (eng. *recovery*) kao postotni omjer prosječne količine metabolita u inkubacijama s dodanim inhibitorom i prosječne količine inhibitora u inkubacijama bez dodanog inhibitora prema formuli navedenoj u poglavlju 4.5.1 (2), te su dobivene pojedinačne vrijednosti statistički obrađene.

Ukupni rezultati prikazani su u tablici 7 i grafički na slici 65.

Tablica 7. Rezultati inhibicija reakcije sakuranetin → naringenin → eriodiktiol. Simbolika znakova u tablici i način izračuna iskorištenja objašnjena je u tekstu iznad.

Inhibitor	**Metabolit**	$\overline{P}$ **[%]**	$\overline{P_i}$ **[%]**	**Studentova *t*-vrijednost**	**Ostatna aktivnost [%]**
CYP1A2	eriodiktiol	29,9 ± 4,9	22,5 ± 4,7	0,132	75
	naringenin	20,7 ± 2,4	15,7 ± 4,2	0,139	76
	naringenin + eriodiktiol	50,6 ± 7,3	38,1 ± 8,9	0,133	75
CYP2C8	eriodiktiol	38,3 ± 1,3	22,3 ± 2,8	0,009	58
	naringenin	34,2 ± 3,0	38,3 ± 0,4	0,098	112
	naringenin + eriodiktiol	72,5 ± 4,4	60,7 ± 2,4	0,039	84
CYP2C9	eriodiktiol	34,0 ± 3,3	30,8 ± 7,2	0,310	91
	naringenin	29,7 ± 2,5	23,4 ± 9,1	0,224	79
	naringenin + eriodiktiol	63,7 ± 5,8	54,2 ± 16,3	0,259	85
CYP2C19	eriodiktiol	33,7 ± 5,6	22,5 ± 3,3	0,068	67
	naringenin	27,5 ± 6,7	22,1 ± 4,5	0,222	81
	naringenin + eriodiktiol	61,2 ± 12,3	44,6 ± 7,8	0,124	73
CYP2D6	eriodiktiol	32,4 ± 8,8	25,0 ± 4,1	0,199	77
	naringenin	31,1 ± 1,6	18,5 ± 6,6	0,060	60
	naringenin + eriodiktiol	63,5 ± 10,5	43,6 ± 10,7	0,100	69
CYP2E1	eriodiktiol	31,6 ± 3,4	18,2 ± 3,1	0,027	58
	naringenin	25,0 ± 4,4	11,7 ± 2,7	0,034	47
	naringenin + eriodiktiol	56,6 ± 7,8	29,9 ± 5,9	0,030	53
CYP3A4/5	eriodiktiol	36,8 ± 5,0	20,8 ± 1,4	0,024	57
	naringenin	32,2 ± 9,6	18,2 ± 2,6	0,093	57
	naringenin + eriodiktiol	69,0 ± 14,6	39,0 ± 4,0	0,054	57



Slika 65. Grafički prikaz rezultata inhibicije reakcije sakuranetin → naringenin → eriodiktiol. Plavi stupci označeni kao „P [%]“ predstavljaju količine metabolita nastalih u inkubacijama bez dodanog inhibitora, a crveni stupci označeni kao „Pi [%]“ predstavljaju količine metabolita nastalih u inkubacijama s dodanim inhibitorom. Oznaka „N+E“ označava zbroj količine metabolita naringenina i eriodiktiola. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrijednost ± standardna pogreška (n = 3).

Dobiveni rezultati ukazuju na umjerenu ostatnu aktivnost i statistički značajnu ($P < 0,05$) inhibiciju promatrane metaboličke reakcije u inkubacijama s dodanim specifičnim inhibitorom CYP2E1. Blaga inhibicija u iznosu od 15% u inkubacijama s dodanim specifičnim inhibitorom CYP2C8 pokazala se statistički značajnom ($P < 0,05$) za ukupnu količinu nastalih metabolita, ali ne i za pojedinačne metabolite. Obzirom na vrlo blagu inhibiciju na koju ukazuju rezultati za CYP2C8 i na činjenicu da u inkubacijama s rekombinantnim enzimom nije zabilježen metabolizam sakuranetina, ovaj enzim ne može se povezati s kataliziranjem promatrane reakcije. Na temelju rezultata može se zaključiti da je među ispitanim citokromima P450 enzim CYP2E1 jedini značajan za kataliziranje promatrane reakcije sakuranetin → naringenin → eriodiktiol, iako opseg inhibicije od 50% ostavlja mogućnost da postoje i drugi citokromi P450 koji bi mogli biti u određenoj mjeri odgovorni za ovu metaboličku pretvorbu.

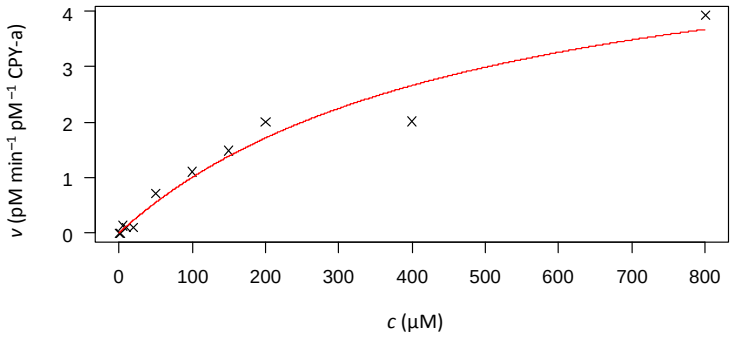
4.6 Rezultati enzimske kinetike

Eksperiment enzimske kinetike proveden je na način kako je opisano u poglavlju 3.7 u svrhu određivanja brzina primijećenih metaboličkih reakcija i ostalih kinetičkih parametara kako je objašnjeno u poglavlju 3.7.3. Kinetički parametri primijećenih metaboličkih reakcija određeni su samo za one flavonoide koji su probirom u eksperimentu s HLM-om pokazali formiranje metabolita u količini od najmanje 10% (*m*/*m*) u odnosu na količinu supstrata. Stoga su u nastavku su prezentirani rezultati enzimske kinetike primijećenih metaboličkih reakcija za sljedećih 10 flavonoidnih aglikona: 3,7-dihidroksiflavon, 7-hidroksiflavon, akacetin, apigenin, flavon, galangin, kemferol, naringenin, sakuranetin i tangeretin.

U ovom poglavlju nisu prikazani pojedinačni rezultati LC-MS analiza za inkubacije iz eksperimenta enzimske kinetike, budući da je metabolizam praćen na isti način kao i u eksperimentu s HLM-om i generirana je ista vrsta podataka na temelju kojih je napravljena identifikacija i određivanje metabolita. Kompletni podaci za iste metabolite već su prikazani u poglavlju 4.3, a ovdje je za svaki flavonoid prikazan samo graf ovisnosti brzine reakcije o koncentraciji supstrata s ucrtanom krivuljom koja najbolje opisuje Michaelis-Menteničinu kinetiku kako je objašnjeno u poglavlju 3.7.3.

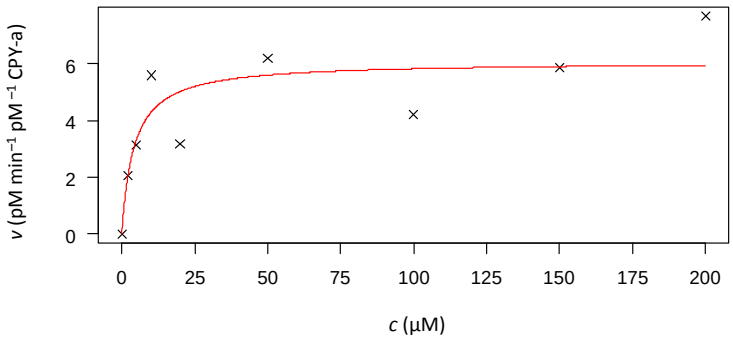
4.6.1 3,7-Dihidroksiflavon

Kinetički parametri određeni su za reakciju 3,7-dihidroksiflavon → 3,7,4'-trihidroksiflavon koju su katalizirali citokromi P450 HLM-a u odgovarajućim inkubacijama. Izračunata je konstanta brzine katalize (k_{cat}) koja je iznosila 5,9 ± 1,1 pM min^{-1} pM^{-1} CYP-a i K_m vrijednost koja je iznosila 492 ± 163 μM. Konstanta specifičnosti (k_{cat}/K_m) za ovu reakciju iznosila je (0,012 ± 0,005) × 10^6 M^{-1} min^{-1}. Na slici 66 prikazan je graf ovisnosti brzine reakcije o koncentraciji supstrata s ucrtanom krivuljom koja najbolje opisuje Michaelis-Menteničinu kinetiku ove reakcije.



Slika 66. Graf ovisnosti brzine reakcije 3,7-dihidroksiflavon → 3,7,4'-trihidroksiflavon o koncentraciji supstrata 3,7-dihidroksiflavona u inkubacijama s HLM-om. Na grafu je ucrtana krivulja koja najbolje opisuje Michaelis-Menteničinu kinetiku ove reakcije.

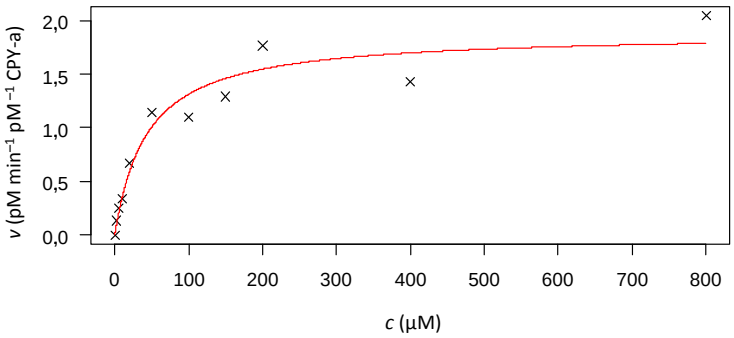
Kinetički parametri određeni su i za reakciju 3,7-dihidroksiflavon → 3,6,7-trihidroksiflavon ili 3,7,8-trihidroksiflavon koju je katalizirao CYP1A2 u odgovarajućim inkubacijama. Izračunata je konstanta brzine katalize (k_{cat}) koja je iznosila 6,1 ± 0,7 pM min^{-1} pM^{-1} CYP-a i K_m vrijednost koja je iznosila 4,2 ± 2,6 μM. Konstanta specifičnosti (k_{cat}/K_m) za ovu reakciju iznosila je (1,5 ± 0,9) × 10^6 M^{-1} min^{-1}. Na slici 67 prikazan je graf ovisnosti brzine reakcije o koncentraciji supstrata s ucrtanom krivuljom koja najbolje opisuje Michaelis-Menteničinu kinetiku ove reakcije.



Slika 67. Graf ovisnosti brzine reakcije 3,7-dihidroksiflavon → 3,6,7-trihidroksiflavon ili 3,7,8-trihidroksiflavon o koncentraciji supstrata 3,7-dihidroksiflavona u inkubacijama s CYP1A2. Na grafu je ucrtana krivulja koja najbolje opisuje Michaelis-Menteničinu kinetiku ove reakcije.

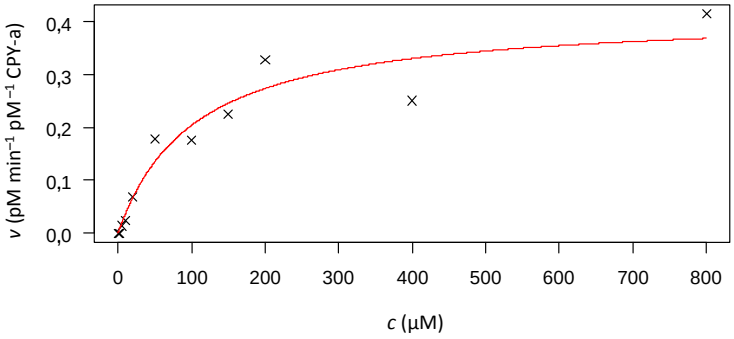
4.6.2 7-Hidroksiflavon

Kinetički parametri određeni su za reakciju 7-hidroksiflavon → 6,7-dihidroksiflavon koju su katalizirali citokromi P450 HLM-a u odgovarajućim inkubacijama. Izračunata je konstanta brzine katalize (k_{cat}) koja je iznosila 1,9 ± 0,1 pM min^{-1} pM^{-1} CYP-a i K_m vrijednost koja je iznosila 43,5 ± 13,3 μM. Konstanta specifičnosti (k_{cat}/K_m) za ovu reakciju iznosila je (0,043 ± 0,014) × 10^6 M^{-1} min^{-1}. Na slici 68 prikazan je graf ovisnosti brzine reakcije o koncentraciji supstrata s ucrtanom krivuljom koja najbolje opisuje Michaelis-Menteničinu kinetiku ove reakcije.



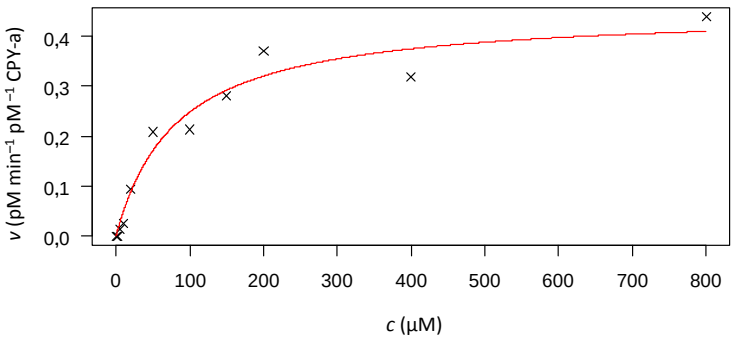
Slika 68. Graf ovisnosti brzine reakcije 7-hidroksiflavon → 6,7-dihidroksiflavon o koncentraciji supstrata 7-hidroksiflavona u inkubacijama s HLM-om. Na grafu je ucrtana krivulja koja najbolje opisuje Michaelis-Menteničinu kinetiku ove reakcije.

Kinetički parametri određeni su i za reakciju 7-hidroksiflavon → 7,8-dihidroksiflavon koju su katalizirali citokromi P450 HLM-a u odgovarajućim inkubacijama. Izračunata je konstanta brzine katalize (k_{cat}) koja je iznosila 0,42 ± 0,05 pM min^{-1} pM^{-1} CYP-a i K_m vrijednost koja je iznosila 104 ± 37 μM. Konstanta specifičnosti (k_{cat}/K_m) za ovu reakciju iznosila je (0,004 ± 0,002) × 10^6 M^{-1} min^{-1}. Na slici 69 prikazan je graf ovisnosti brzine reakcije o koncentraciji supstrata s ucrtanom krivuljom koja najbolje opisuje Michaelis-Menteničinu kinetiku ove reakcije.



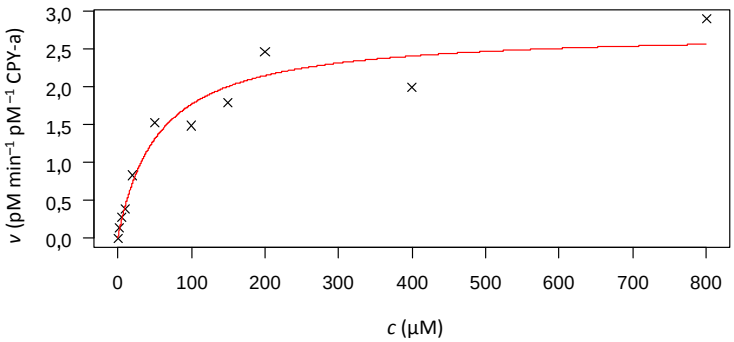
Slika 69. Graf ovisnosti brzine reakcije 7-hidroksiflavon → 7,8-dihidroksiflavon o koncentraciji supstrata 7-hidroksiflavona u inkubacijama s HLM-om. Na grafu je ucrtana krivulja koja najbolje opisuje Michaelis-Menteničinu kinetiku ove reakcije.

Kinetički parametri određeni su i za reakciju 7-hidroksiflavon → 7,4'-dihidroksiflavon koju su katalizirali citokromi P450 HLM-a u odgovarajućim inkubacijama. Izračunata je konstanta brzine katalize (k_{cat}) koja je iznosila 0,45 ± 0,04 pM min^{-1} pM^{-1} CYP-a i K_m vrijednost koja je iznosila 82 ± 22 μM. Konstanta specifičnosti (k_{cat}/K_m) za ovu reakciju iznosila je (0,006 ± 0,002) × 10^6 M^{-1} min^{-1}. Na slici 70 prikazan je graf ovisnosti brzine reakcije o koncentraciji supstrata s ucrtanom krivuljom koja najbolje opisuje Michaelis-Menteničinu kinetiku ove reakcije.



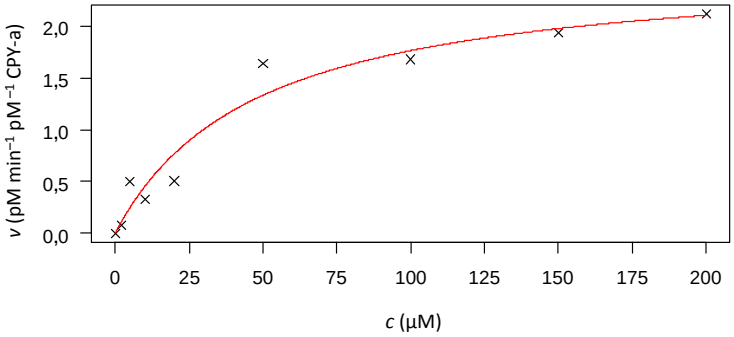
Slika 70. Graf ovisnosti brzine reakcije 7-hidroksiflavon → 7,4'-dihidroksiflavon o koncentraciji supstrata 7-hidroksiflavona u inkubacijama s HLM-om. Na grafu je ucrtana krivulja koja najbolje opisuje Michaelis-Menteničinu kinetiku ove reakcije.

Kinetički parametri određeni su i za ukupnu metaboličku reakciju 7-hidroksiflavon → 6,7-dihidroksiflavon + 7,8-dihidroksiflavon + 7,4'-dihidroksiflavon koju su katalizirali citokromi P450 HLM-a u odgovarajućim inkubacijama. Izračunata je konstanta brzine katalize (k_{cat}) koja je iznosila 2,7 ± 0,2 pM min^{-1} pM^{-1} CYP-a i K_m vrijednost koja je iznosila 54,9 ± 16,7 μM. Konstanta specifičnosti (k_{cat}/K_m) za ovu reakciju iznosila je (0,050 ± 0,016) × 10^6 M^{-1} min^{-1}. Na slici 71 prikazan je graf ovisnosti brzine reakcije o koncentraciji supstrata s ucrtanom krivuljom koja najbolje opisuje Michaelis-Menteničinu kinetiku ove reakcije.



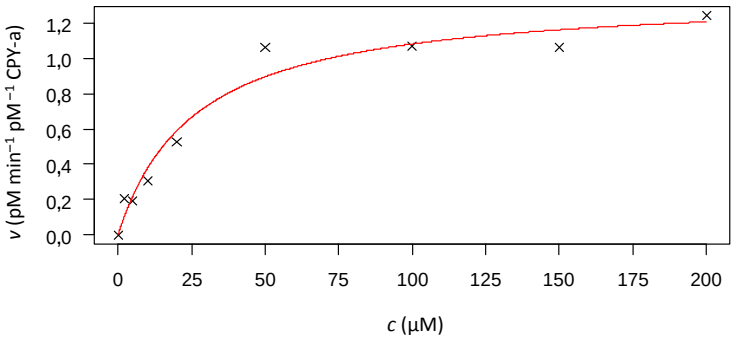
Slika 71. Graf ovisnosti brzine ukupne metaboličke reakcije 7-hidroksiflavon → 6,7-dihidroksiflavon + 7,8-dihidroksiflavon + 7,4'-dihidroksiflavon o koncentraciji supstrata 7-hidroksiflavona u inkubacijama s HLM-om. Na grafu je ucrtana krivulja koja najbolje opisuje Michaelis-Menteničinu kinetiku ove reakcije.

Kinetički parametri određeni su za reakciju 7-hidroksiflavon → 6,7-dihidroksiflavon koju je katalizirao CYP3A4 u odgovarajućim inkubacijama. Izračunata je konstanta brzine katalize (k_{cat}) koja je iznosila 2,6 ± 0,3 pM min^{-1} pM^{-1} CYP-a i K_m vrijednost koja je iznosila 47,9 ± 16,4 μM. Konstanta specifičnosti (k_{cat}/K_m) za ovu reakciju iznosila je (0,054 ± 0,020) × 10^6 M^{-1} min^{-1}. Na slici 72 prikazan je graf ovisnosti brzine reakcije o koncentraciji supstrata s ucrtanom krivuljom koja najbolje opisuje Michaelis-Menteničinu kinetiku ove reakcije.



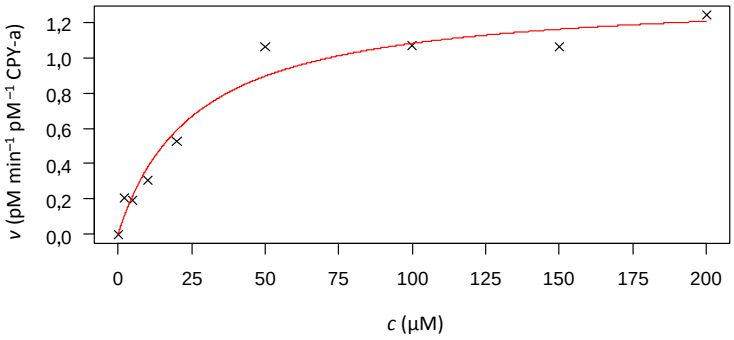
Slika 72. Graf ovisnosti brzine reakcije 7-hidroksiflavon → 6,7-dihidroksiflavon o koncentraciji supstrata 7-hidroksiflavona u inkubacijama s CYP3A4. Na grafu je ucrtana krivulja koja najbolje opisuje Michaelis-Menteničinu kinetiku ove reakcije.

Kinetički parametri određeni su i za reakciju 7-hidroksiflavon → 7,8-dihidroksiflavon koju je katalizirao CYP3A4 u odgovarajućim inkubacijama. Izračunata je konstanta brzine katalize (k_{cat}) koja je iznosila 1,4 ± 0,1 pM min^{-1} pM^{-1} CYP-a i K_m vrijednost koja je iznosila 26,2 ± 6,6 μM. Konstanta specifičnosti (k_{cat}/K_m) za ovu reakciju iznosila je (0,052 ± 0,014) × 10^6 M^{-1} min^{-1}. Na slici 73 prikazan je graf ovisnosti brzine reakcije o koncentraciji supstrata s ucrtanom krivuljom koja najbolje opisuje Michaelis-Menteničinu kinetiku ove reakcije.



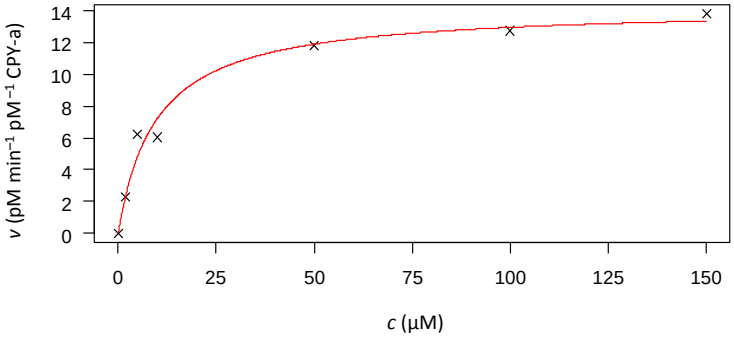
Slika 73. Graf ovisnosti brzine reakcije 7-hidroksiflavon → 7,8-dihidroksiflavon o koncentraciji supstrata 7-hidroksiflavona u inkubacijama s CYP3A4. Na grafu je ucrtana krivulja koja najbolje opisuje Michaelis-Menteničinu kinetiku ove reakcije.

Kinetički parametri određeni su i za ukupnu metaboličku reakciju 7-hidroksiflavon → 6,7-dihidroksiflavon + 7,8-dihidroksiflavon koju je katalizirao CYP3A4 u odgovarajućim inkubacijama. Izračunata je konstanta brzine katalize (k_{cat}) koja je iznosila 3,9 ± 0,3 pM min^{-1} pM^{-1} CYP-a i K_m vrijednost koja je iznosila 37,8 ± 10,3 μM. Konstanta specifičnosti (k_{cat}/K_m) za ovu reakciju iznosila je (0,10 ± 0,03) × 10^6 M^{-1} min^{-1}. Na slici 74 prikazan je graf ovisnosti brzine reakcije o koncentraciji supstrata s ucrtanom krivuljom koja najbolje opisuje Michaelis-Menteničinu kinetiku ove reakcije.



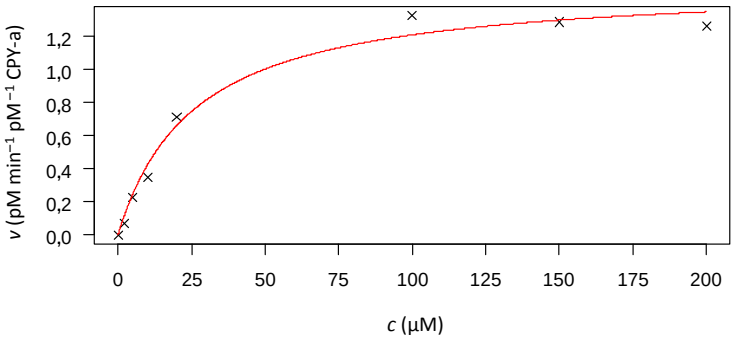
Slika 74. Graf ovisnosti brzine ukupne metaboličke reakcije 7-hidroksiflavon → 6,7-dihidroksiflavon + 7,8-dihidroksiflavon o koncentraciji supstrata 7-hidroksiflavona u inkubacijama s CYP3A4. Na grafu je ucrtana krivulja koja najbolje opisuje Michaelis-Menteničinu kinetiku ove reakcije.

Kinetički parametri određeni su i za reakciju 7-hidroksiflavon → 6,7-dihidroksiflavon koju je katalizirao CYP1A2 u odgovarajućim inkubacijama. Izračunata je konstanta brzine katalize (k_{cat}) koja je iznosila 14,2 ± 0,7 pM min^{-1} pM^{-1} CYP-a i K_m vrijednost koja je iznosila 9,7 ± 2,0 μM. Konstanta specifičnosti (k_{cat}/K_m) za ovu reakciju iznosila je (1,5 ± 0,3) × 10^6 M^{-1} min^{-1}. Na slici 75 prikazan je graf ovisnosti brzine reakcije o koncentraciji supstrata s ucrtanom krivuljom koja najbolje opisuje Michaelis-Menteničinu kinetiku ove reakcije.



Slika 75. Graf ovisnosti brzine reakcije 7-hidroksiflavon → 6,7-dihidroksiflavon o koncentraciji supstrata 7-hidroksiflavona u inkubacijama s CYP1A2. Na grafu je ucrtana krivulja koja najbolje opisuje Michaelis-Menteničinu kinetiku ove reakcije.

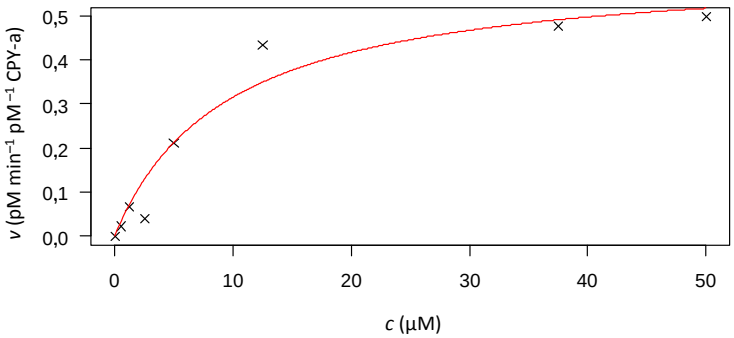
Kinetički parametri određeni su i za reakciju 7-hidroksiflavon → 6,7-dihidroksiflavon koju je katalizirao CYP2D6 u odgovarajućim inkubacijama. Izračunata je konstanta brzine katalize (k_{cat}) koja je iznosila 1,6 ± 0,1 pM min^{-1} pM^{-1} CYP-a i K_m vrijednost koja je iznosila 26,0 ± 4,8 μM. Konstanta specifičnosti (k_{cat}/K_m) za ovu reakciju iznosila je (0,06 ± 0,01) × 10^6 M^{-1} min^{-1}. Na slici 76 prikazan je graf ovisnosti brzine reakcije o koncentraciji supstrata s ucrtanom krivuljom koja najbolje opisuje Michaelis-Menteničinu kinetiku ove reakcije.



Slika 76. Graf ovisnosti brzine reakcije 7-hidroksiflavon → 6,7-dihidroksiflavon o koncentraciji supstrata 7-hidroksiflavona u inkubacijama s CYP2D6. Na grafu je ucrtana krivulja koja najbolje opisuje Michaelis-Menteničinu kinetiku ove reakcije.

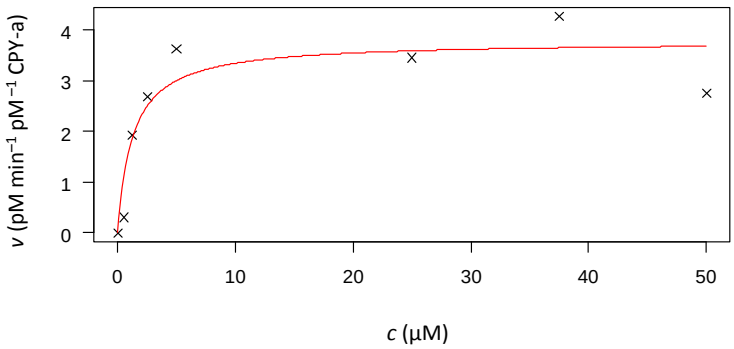
4.6.3 Akacetin

Kinetički parametri određeni su za kombiniranu reakciju akacetin → apigenin → luteolin koju su katalizirali citokromi P450 HLM-a u odgovarajućim inkubacijama. Izračunata je konstanta brzine katalize (k_{cat}) koja je iznosila 0,62 ± 0,07 pM min^{-1} pM^{-1} CYP-a i K_m vrijednost koja je iznosila 9,5 ± 3,3 μM. Konstanta specifičnosti (k_{cat}/K_m) za ovu reakciju iznosila je (0,06 ± 0,02) × 10^6 M^{-1} min^{-1}. Na slici 77 prikazan je graf ovisnosti brzine reakcije o koncentraciji supstrata s ucrtanom krivuljom koja najbolje opisuje Michaelis-Menteničinu kinetiku ove reakcije.



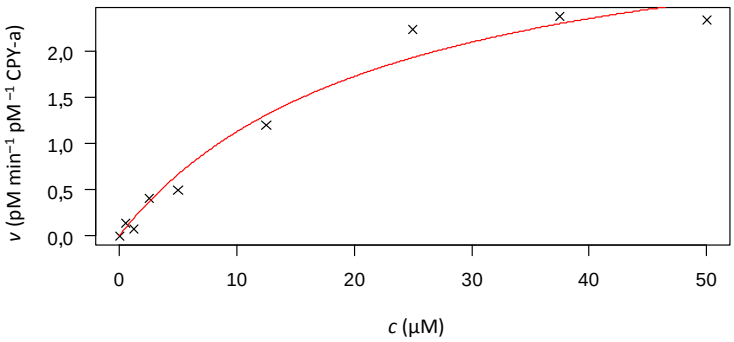
Slika 77. Graf ovisnosti brzine kombinirane reakcije akacetin → apigenin → luteolin o koncentraciji supstrata akacetina u inkubacijama s HLM-om. Na grafu je ucrtana krivulja koja najbolje opisuje Michaelis-Menteničinu kinetiku ove reakcije.

Kinetički parametri određeni su i za kombiniranu reakciju akacetin → apigenin → luteolin koju je katalizirao CYP1A2 u odgovarajućim inkubacijama. Izračunata je konstanta brzine katalize (k_{cat}) koja je iznosila 3,8 ± 0,4 pM min^{-1} pM^{-1} CYP-a i K_m vrijednost koja je iznosila 1,3 ± 0,6 μM. Konstanta specifičnosti (k_{cat}/K_m) za ovu reakciju iznosila je (2,9 ± 1,5) × 10^6 M^{-1} min^{-1}. Na slici 78 prikazan je graf ovisnosti brzine reakcije o koncentraciji supstrata s ucrtanom krivuljom koja najbolje opisuje Michaelis-Menteničinu kinetiku ove reakcije.



Slika 78. Graf ovisnosti brzine kombinirane reakcije akacetin → apigenin → luteolin o koncentraciji supstrata akacetina u inkubacijama s CYP1A2. Na grafu je ucrtana krivulja koja najbolje opisuje Michaelis-Menteničinu kinetiku ove reakcije.

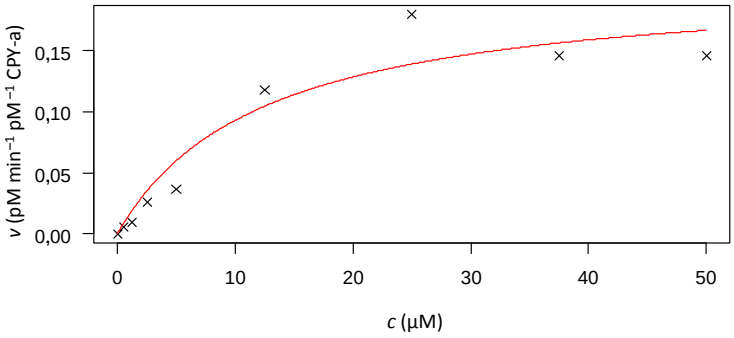
Kinetički parametri određeni su i za reakciju akacetin → apigenin koju je katalizirao CYP2D6 u odgovarajućim inkubacijama. Izračunata je konstanta brzine katalize (k_{cat}) koja je iznosila 3,7 ± 0,5 pM min^{-1} pM^{-1} CYP-a i K_m vrijednost koja je iznosila 22,7 ± 7,0 μM. Konstanta specifičnosti (k_{cat}/K_m) za ovu reakciju iznosila je (0,16 ± 0,05) × 10^6 M^{-1} min^{-1}. Na slici 79 prikazan je graf ovisnosti brzine reakcije o koncentraciji supstrata s ucrtanom krivuljom koja najbolje opisuje Michaelis-Menteničinu kinetiku ove reakcije.



Slika 79. Graf ovisnosti brzine reakcije akacetin → apigenin o koncentraciji supstrata akacetina u inkubacijama s CYP2D6. Na grafu je ucrtana krivulja koja najbolje opisuje Michaelis-Menteničinu kinetiku ove reakcije.

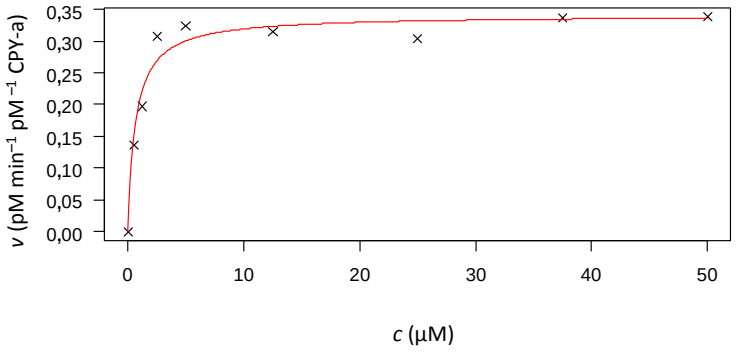
4.6.4 Apigenin

Kinetički parametri određeni su za reakciju apigenin → luteolin koju su katalizirali citokromi P450 HLM-a u odgovarajućim inkubacijama. Izračunata je konstanta brzine katalize (k_{cat}) koja je iznosila 0,20 ± 0,03 pM min^{-1} pM^{-1} CYP-a i K_m vrijednost koja je iznosila 12,4 ± 6,0 μM. Konstanta specifičnosti (k_{cat}/K_m) za ovu reakciju iznosila je (0,017 ± 0,009) × 10^6 M^{-1} min^{-1}. Na slici 80 prikazan je graf ovisnosti brzine reakcije o koncentraciji supstrata s ucrtanom krivuljom koja najbolje opisuje Michaelis-Menteničinu kinetiku ove reakcije.



Slika 80. Graf ovisnosti brzine reakcije apigenin → luteolin o koncentraciji supstrata apigenina u inkubacijama s HLM-om. Na grafu je ucrtana krivulja koja najbolje opisuje Michaelis-Menteničinu kinetiku ove reakcije.

Kinetički parametri određeni su i za reakciju apigenin → luteolin koju je katalizirao CYP1A2 u odgovarajućim inkubacijama. Izračunata je konstanta brzine katalize (k_{cat}) koja je iznosila 0,30 ± 0,01 pM min^{-1} pM^{-1} CYP-a i K_m vrijednost koja je iznosila 0,7 ± 0,1 μM. Konstanta specifičnosti (k_{cat}/K_m) za ovu reakciju iznosila je (0,5 ± 0,1) × 10^6 M^{-1} min^{-1}. Na slici 81 prikazan je graf ovisnosti brzine reakcije o koncentraciji supstrata s ucrtanom krivuljom koja najbolje opisuje Michaelis-Menteničinu kinetiku ove reakcije.



Slika 81. Graf ovisnosti brzine reakcije apigenin → luteolin o koncentraciji supstrata apigenina u inkubacijama s CYP1A2. Na grafu je ucrtana krivulja koja najbolje opisuje Michaelis-Menteničinu kinetiku ove reakcije.

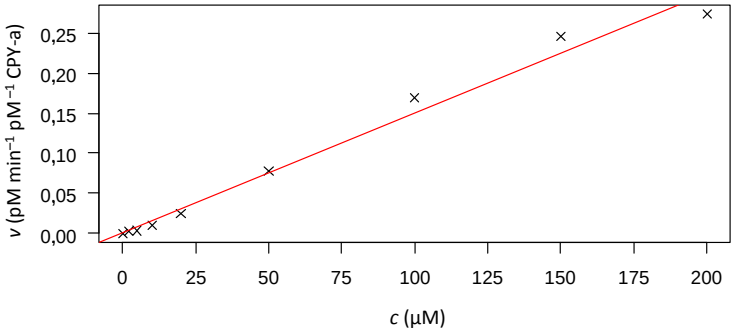
4.6.5 Flavon

U eksperimentu enzimske kinetike metaboličkih reakcija flavona nije bilo moguće odrediti kinetičke parametre kao kod ostalih flavonoida. U odabranom koncentracijskom rasponu nastajanje metabolita flavona još je bilo u linearnom području, a koncentracije nije bilo moguće dalje povećavati zbog njegove slabe topljivosti. Stoga je prema linearnom modelu enzimske kinetike na temelju eksperimentalnih podataka izračunat nagib pravca koji u ovom području odgovara konstanti specifičnosti (k_{cat}/K_m). Naime, kad je [S] ≪ K_m, ovisnost brzine rekacije o koncentraciji supstrata je linerana i jednadžba (1) (vidi poglavlje 3.7.3) postaje:

$$V = V_{max} \times \frac{[S]}{K_m} \qquad (3)$$

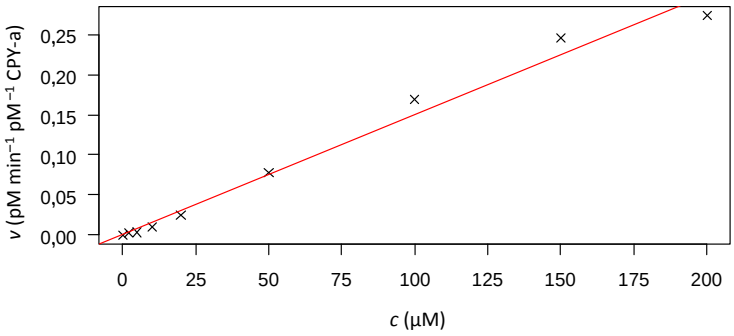
a omjer V_{max}/K_m predstavlja nagib pravca.

Za reakciju flavon → 4'-hidroksiflavon koju su katalizirali citokromi P450 HLM-a u odgovarajućim inkubacijama, prema linearnom modelu izračunata je konstanta specifičnosti (k_{cat}/K_m) koja je iznosila (0,0015 ± 0,0001) × 10^6 M^{-1} min^{-1}. Na slici 82 prikazan je graf ovisnosti brzine reakcije o koncentraciji supstrata s ucrtanim pravcem koji određen metodom najmanjih kvadrata najbolje opisuje eksperimentalne podatke.



Slika 82. Graf ovisnosti brzine reakcije flavon → 4'-hidroksiflavon o koncentraciji supstrata flavona u inkubacijama s HLM-om. Na grafu je ucrtan pravac koji određen metodom najmanjih kvadrata najbolje opisuje eksperimentalne podatke.

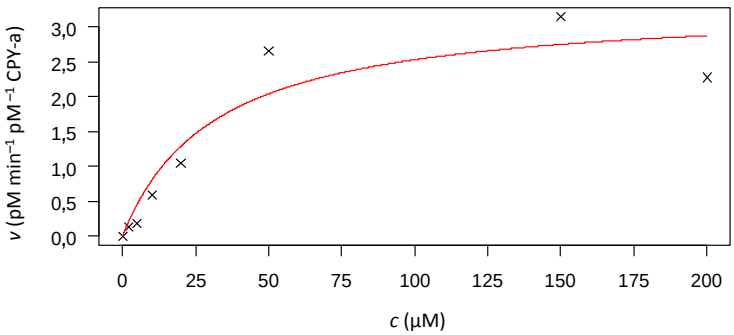
Za ukupnu metaboličku reakciju flavon → 4'-hidroksiflavon + 6-hidroksiflavon + 7-hidroksiflavon koju su katalizirali citokromi P450 HLM-a u odgovarajućim inkubacijama, prema linearnom modelu izračunata je konstanta specifičnosti (k_{cat}/K_m) koja je iznosila $(0{,}0028 \pm 0{,}0002) \times 10^6$ M^{-1} min^{-1}. Na slici 83 prikazan je graf ovisnosti brzine reakcije o koncentraciji supstrata s ucrtanom krivuljom koja najbolje opisuje Michaelis-Menteničinu kinetiku ove reakcije.



Slika 83. Graf ovisnosti brzine ukupne metaboličke reakcije flavon → 4'-hidroksiflavon + 6-hidroksiflavon + 7-hidroksiflavon o koncentraciji supstrata flavona u inkubacijama s HLM-om. Na grafu je ucrtan pravac koji određen metodom najmanjih kvadrata najbolje opisuje eksperimentalne podatke.

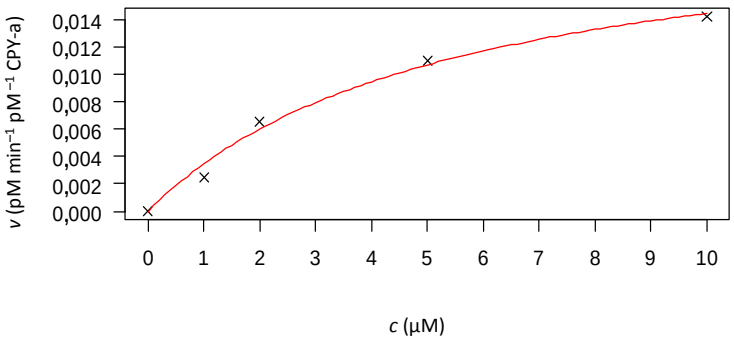
4.6.6 Galangin

Kinetički parametri određeni su za kombiniranu reakciju galangin → kemferol → kvercetin koju su katalizirali citokromi P450 HLM-a u odgovarajućim inkubacijama. Izračunata je konstanta brzine katalize (k_{cat}) koja je iznosila 3,3 ± 0,5 pM min^{-1} pM^{-1} CYP-a i K_m vrijednost koja je iznosila 31,6 ± 16,0 μM. Konstanta specifičnosti (k_{cat}/K_m) za ovu reakciju iznosila je (0,11 ± 0,06) × 10^6 M^{-1} min^{-1}. Na slici 84 prikazan je graf ovisnosti brzine reakcije o koncentraciji supstrata s ucrtanom krivuljom koja najbolje opisuje Michaelis-Menteničinu kinetiku ove reakcije.



Slika 84. Graf ovisnosti brzine kombinirane reakcije galangin → kemferol → kvercetin o koncentraciji supstrata galangina u inkubacijama s HLM-om. Na grafu je ucrtana krivulja koja najbolje opisuje Michaelis-Menteničinu kinetiku ove reakcije.

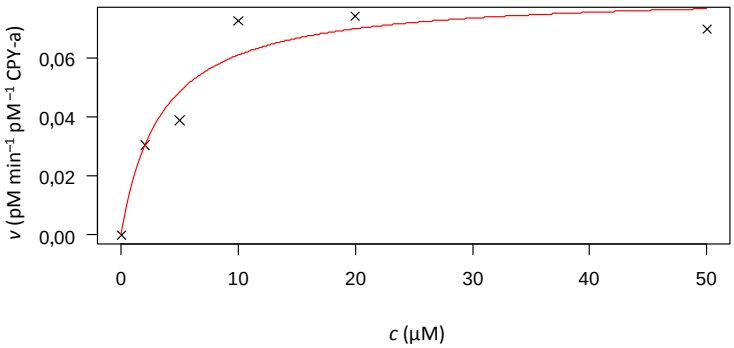
Kinetički parametri određeni su i za reakciju galangin → kemferol koju je katalizirao CYP2C19 u odgovarajućim inkubacijama. Izračunata je konstanta brzine katalize (k_{cat}) koja je iznosila 0,022 ± 0,003 pM min^{-1} pM^{-1} CYP-a i K_m vrijednost koja je iznosila 5,4 ± 1,4 μM. Konstanta specifičnosti (k_{cat}/K_m) za ovu reakciju iznosila je (0,004 ± 0,001) × 10^6 M^{-1} min^{-1}. Na slici 85 prikazan je graf ovisnosti brzine reakcije o koncentraciji supstrata s ucrtanom krivuljom koja najbolje opisuje Michaelis-Menteničinu kinetiku ove reakcije.



Slika 85. Graf ovisnosti brzine reakcije galangin → kemferol o koncentraciji supstrata galangina u inkubacijama s CYP2C19. Na grafu je ucrtana krivulja koja najbolje opisuje Michaelis-Menteničinu kinetiku ove reakcije.

4.6.7 Kemferol

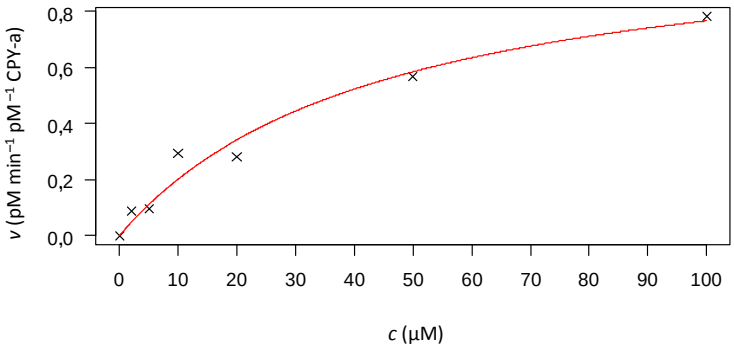
Kinetički parametri određeni su za reakciju kemferol → kvercetin koju su katalizirali citokromi P450 HLM-a u odgovarajućim inkubacijama. Izračunata je konstanta brzine katalize (k_{cat}) koja je iznosila 0,082 ± 0,009 pM min^{-1} pM^{-1} CYP-a i K_m vrijednost koja je iznosila 3,4 ± 1,5 μM. Konstanta specifičnosti (k_{cat}/K_m) za ovu reakciju iznosila je (0,024 ± 0,010) × 10^6 M^{-1} min^{-1}. Na slici 86 prikazan je graf ovisnosti brzine reakcije o koncentraciji supstrata s ucrtanom krivuljom koja najbolje opisuje Michaelis-Menteničinu kinetiku ove reakcije.



Slika 86. Graf ovisnosti brzine reakcije kemferol → kvercetin o koncentraciji supstrata kemferola u inkubacijama s HLM-om. Na grafu je ucrtana krivulja koja najbolje opisuje Michaelis-Menteničinu kinetiku ove reakcije.

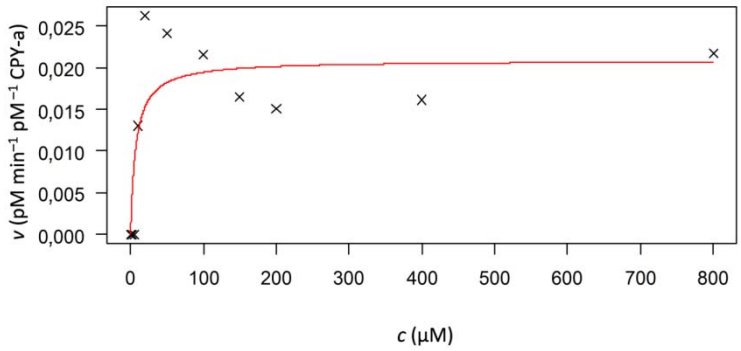
4.6.8 Naringenin

Kinetički parametri određeni su za reakciju naringenin → eriodiktiol koju su katalizirali citokromi P450 HLM-a u odgovarajućim inkubacijama. Izračunata je konstanta brzine katalize (k_{cat}) koja je iznosila 1,1 ± 0,2 pM min^{-1} pM^{-1} CYP-a i K_m vrijednost koja je iznosila 45,2 ± 14,9 µM. Konstanta specifičnosti (k_{cat}/K_m) za ovu reakciju iznosila je (0,025 ± 0,009) × 10^6 M^{-1} min^{-1}. Na slici 87 prikazan je graf ovisnosti brzine reakcije o koncentraciji supstrata s ucrtanom krivuljom koja najbolje opisuje Michaelis-Menteničinu kinetiku ove reakcije.



Slika 87. Graf ovisnosti brzine reakcije naringenin → eriodiktiol o koncentraciji supstrata naringenina u inkubacijama s HLM-om. Na grafu je ucrtana krivulja koja najbolje opisuje Michaelis-Menteničinu kinetiku ove reakcije.

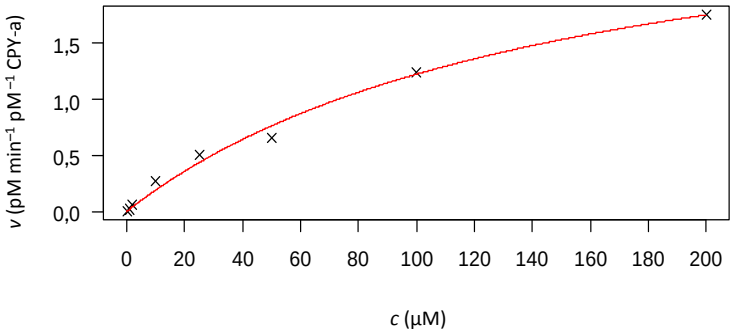
Kinetički parametri određeni su i za reakciju naringenin → eriodiktiol koju je katalizirao CYP1A2 u odgovarajućim inkubacijama. Izračunata je konstanta brzine katalize (k_{cat}) koja je iznosila 0,021 ± 0,003 pM min^{-1} pM^{-1} CYP-a i K_m vrijednost koja je iznosila 7,3 ± 5,6 µM. Konstanta specifičnosti (k_{cat}/K_m) za ovu reakciju iznosila je (0,003 ± 0,002) × 10^6 M^{-1} min^{-1}. Budući da se radi o sporoj reakciji karakteriziranoj slabom učinkovitošću, u inkubacijama je formirana vrlo mala količina metabolita te je greška mjerenja izraženija u rezultatima kinetičkih parametara. Zbog toga se dobiveni rezultati mogu uzeti kao gruba procjena kinetike ove reakcije. Na slici 88 prikazan je graf ovisnosti brzine reakcije o koncentraciji supstrata s ucrtanom krivuljom koja najbolje opisuje Michaelis-Menteničinu kinetiku ove reakcije.



Slika 88. Graf ovisnosti brzine reakcije naringenin → eriodiktiol o koncentraciji supstrata naringenina u inkubacijama s CYP1A2. Na grafu je ucrtana krivulja koja najbolje opisuje Michaelis-Menteničinu kinetiku ove reakcije.

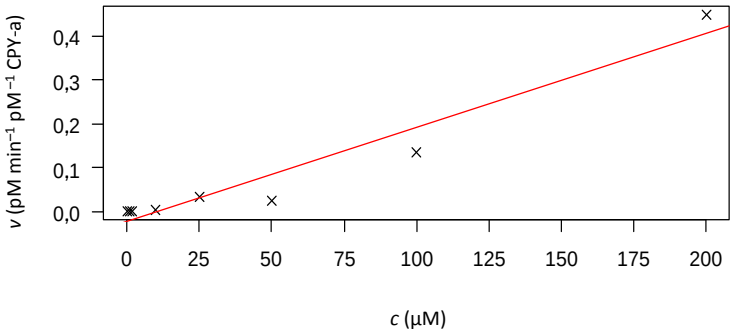
4.6.9 Sakuranetin

Kinetički parametri određeni su za kombiniranu reakciju sakuranetin → naringenin → eriodiktiol koju su katalizirali citokromi P450 HLM-a u odgovarajućim inkubacijama. Izračunata je konstanta brzine katalize (k_{cat}) koja je iznosila 3,1 ± 0,3 pM min^{-1} pM^{-1} CYP-a i K_m vrijednost koja je iznosila 152 ± 31 μM. Konstanta specifičnosti (k_{cat}/K_m) za ovu reakciju iznosila je (0,020 ± 0,005) × 10^6 M^{-1} min^{-1}. Na slici 89 prikazan je graf ovisnosti brzine reakcije o koncentraciji supstrata s ucrtanom krivuljom koja najbolje opisuje Michaelis-Menteničinu kinetiku ove reakcije.



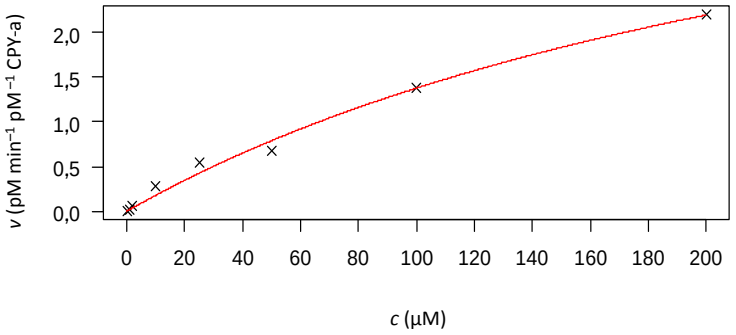
Slika 89. Graf ovisnosti brzine kombinirane reakcije sakuranetin → naringenin → eriodiktiol o koncentraciji supstrata sakuranetina u inkubacijama s HLM-om. Na grafu je ucrtana krivulja koja najbolje opisuje Michaelis-Menteničinu kinetiku ove reakcije.

Za reakciju sakuranetin → 5,3',4'-trihidroksi-7-metoksiflavanon koju su katalizirali citokromi P450 HLM-a u odgovarajućim inkubacijama nije bilo moguće odrediti kinetičke parametre kao kod ostalih metaboličkih reakcija. U odabranom koncentracijskom rasponu nastajanje metabolita 5,3',4'-trihidroksi-7-metoksiflavanona još je bilo u linearnom području, a koncentracije nije bilo moguće dalje povećavati zbog slabe topljivosti supstrata sakuranetina. Stoga je prema linearnom modelu enzimske kinetike na temelju eksperimentalnih podataka izračunat nagib pravca koji u ovom području odgovara konstanti specifičnosti (k_{cat}/K_m) (vidi razmatranje iz poglavlja 4.6.5). Iz nagiba pravca izračunata je konstanta specifičnosti (k_{cat}/K_m) koja je iznosila (0,0022 ± 0,0002) × 10^6 M^{-1} min^{-1}. Na slici 90 prikazan je graf ovisnosti brzine reakcije o koncentraciji supstrata s ucrtanim pravcem koji određen metodom najmanjih kvadrata najbolje opisuje eksperimentalne podatke.



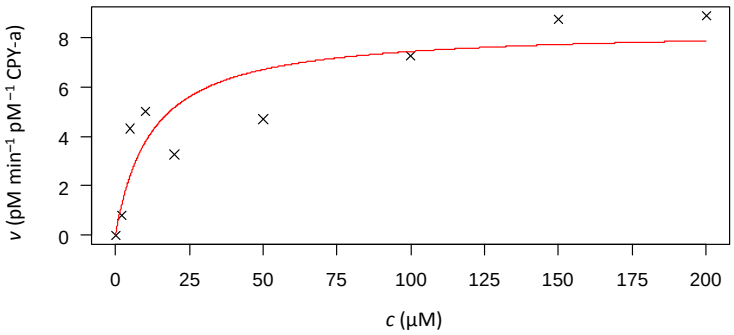
Slika 90. Graf ovisnosti brzine reakcije sakuranetin → 5,3',4'-trihidroksi-7-metoksiflavanon o koncentraciji supstrata sakuranetina u inkubacijama s HLM-om. Na grafu je ucrtan pravac koji određen metodom najmanjih kvadrata najbolje opisuje eksperimentalne podatke.

Kinetički parametri određeni su i za ukupnu metaboličku reakciju sakuranetin → naringenin + eriodiktiol + 5,3',4'-trihidroksi-7-metoksiflavanon koju su katalizirali citokromi P450 HLM-a u odgovarajućim inkubacijama. Izračunata je konstanta brzine katalize (k_{cat}) koja je iznosila 5,4 ± 1,0 pM min^{-1} pM^{-1} CYP-a i K_m vrijednost koja je iznosila 292 ± 82 μM. Konstanta specifičnosti (k_{cat}/K_m) za ovu reakciju iznosila je (0,019 ± 0,006) × 10^6 M^{-1} min^{-1}. Na slici 91 prikazan je graf ovisnosti brzine reakcije o koncentraciji supstrata s ucrtanom krivuljom koja najbolje opisuje Michaelis-Menteničinu kinetiku ove reakcije.



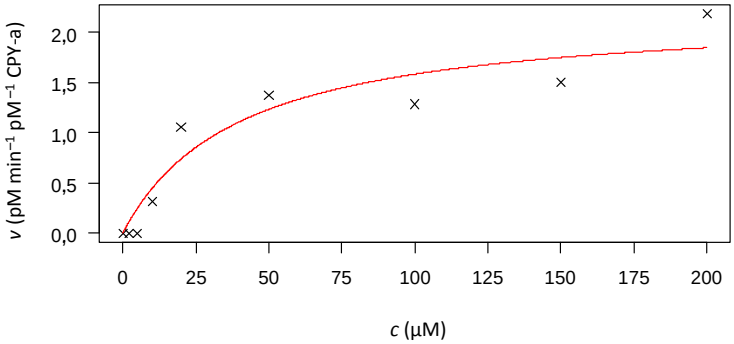
Slika 91. Graf ovisnosti brzine ukupne metaboličke sakuranetin → naringenin + eriodiktiol + 5,3',4'-trihidroksi-7-metoksiflavanon o koncentraciji supstrata sakuranetina u inkubacijama s HLM-om. Na grafu je ucrtana krivulja koja najbolje opisuje Michaelis-Menteničinu kinetiku ove reakcije.

Kinetički parametri određeni su i za reakciju sakuranetin → 5,3',4'-trihidroksi-7-metoksiflavanon koju je katalizirao CYP1A2 u odgovarajućim inkubacijama. Izračunata je konstanta brzine katalize (k_{cat}) koja je iznosila 8,3 ± 1,1 pM min^{-1} pM^{-1} CYP-a i K_m vrijednost koja je iznosila 12,2 ± 6,8 μM. Konstanta specifičnosti (k_{cat}/K_m) za ovu reakciju iznosila je (0,7 ± 0,4) × 10^6 M^{-1} min^{-1}. Na slici 92 prikazan je graf ovisnosti brzine reakcije o koncentraciji supstrata s ucrtanom krivuljom koja najbolje opisuje Michaelis-Menteničinu kinetiku ove reakcije.



Slika 92. Graf ovisnosti brzine reakcije sakuranetin → 5,3',4'-trihidroksi-7-metoksiflavanon o koncentraciji supstrata sakuranetina u inkubacijama s CYP1A2. Na grafu je ucrtana krivulja koja najbolje opisuje Michaelis-Menteničinu kinetiku ove reakcije.

Kinetički parametri određeni su i za reakciju sakuranetin → 5,3',4'-trihidroksi-7-metoksiflavanon koju je katalizirao CYP3A4 u odgovarajućim inkubacijama. Izračunata je konstanta brzine katalize (k_{cat}) koja je iznosila 2,2 ± 0,4 pM min^{-1} pM^{-1} CYP-a i K_m vrijednost koja je iznosila 39,8 ± 20,1 μM. Konstanta specifičnosti (k_{cat}/K_m) za ovu reakciju iznosila je (0,06 ± 0,03) × 10^6 M^{-1} min^{-1}. Na slici 93 prikazan je graf ovisnosti brzine reakcije o koncentraciji supstrata s ucrtanom krivuljom koja najbolje opisuje Michaelis-Menteničinu kinetiku ove reakcije.

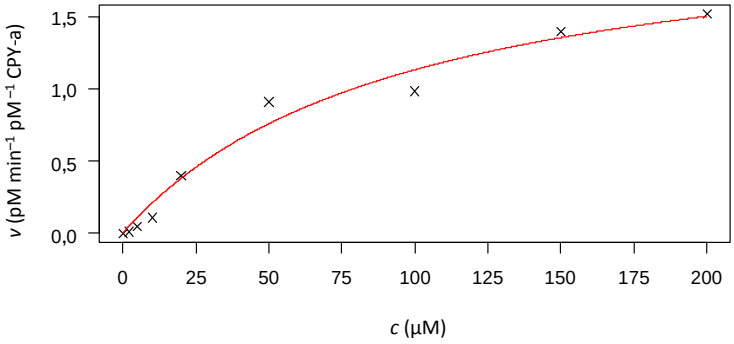


Slika 93. Graf ovisnosti brzine reakcije sakuranetin → 5,3',4'-trihidroksi-7-metoksiflavanon o koncentraciji supstrata sakuranetina u inkubacijama s CYP3A4. Na grafu je ucrtana krivulja koja najbolje opisuje Michaelis-Menteničinu kinetiku ove reakcije.

4.6.10 Tangeretin

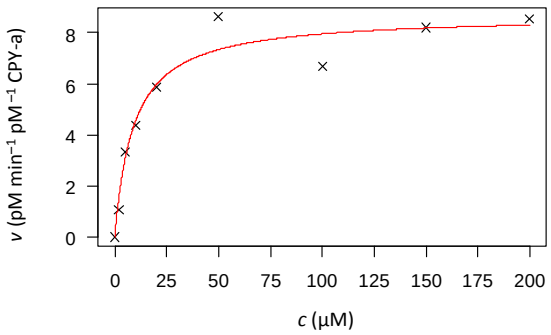
Zbog interferencije metabolita na UV detektoru u inkubacijama enzimske kinetike s HLM-om nije bilo moguće pratiti glavnu metaboličku reakciju tangeretina: tangeretin → 4'-hidroksi-5,6,7,8-tetrametoksiflavon → 3',4'-dihidroksi-5,6,7,8-tetrametoksiflavon (slika 45).

Kinetički parametri određeni su za reakciju jednostruke demetilacije tangeretina na prstenu A pri čemu je nastao metabolit na RT = 10,85 min (slika 46b), a koju su katalizirali citokromi P450 HLM-a u odgovarajućim inkubacijama. Izračunata je konstanta brzine katalize (k_{cat}) koja je iznosila 2,2 ± 0,3 pM min^{-1} pM^{-1} CYP-a i K_m vrijednost koja je iznosila 97,3 ± 29,2 μM. Konstanta specifičnosti (k_{cat}/K_m) za ovu reakciju iznosila je (0,023 ± 0,008) × 10^6 M^{-1} min^{-1}. Na slici 94 prikazan je graf ovisnosti brzine reakcije o koncentraciji supstrata s ucrtanom krivuljom koja najbolje opisuje Michaelis-Menteničinu kinetiku ove reakcije.



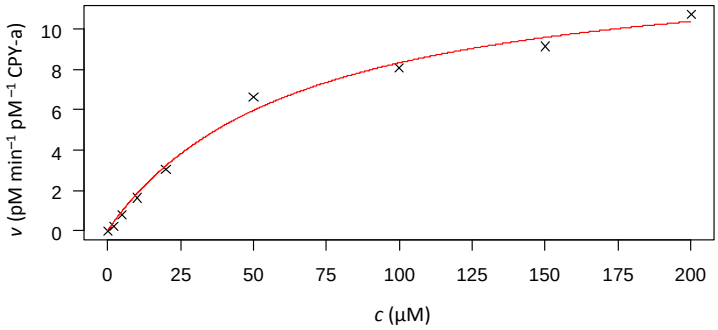
Slika 94. Graf ovisnosti brzine reakcije jednostruke demetilacije tangeretina na prstenu A pri čemu je nastao metabolit na RT = 10,85 min (slika 46b) o koncentraciji supstrata tangeretina u inkubacijama s HLM-om. Na grafu je ucrtana krivulja koja najbolje opisuje Michaelis-Menteničinu kinetiku ove reakcije.

Kinetički parametri određeni su za kombiniranu reakciju tangeretin → 4'-hidroksi-5,6,7,8-tetrametoksiflavon → 3',4'-dihidroksi-5,6,7,8-tetrametoksiflavon koju je katalizirao CYP1A2 u odgovarajućim inkubacijama. Izračunata je konstanta brzine katalize (k_{cat}) koja je iznosila 8,7 ± 0,5 pM min^{-1} pM^{-1} CYP-a i K_m vrijednost koja je iznosila 9,1 ± 2,3 μM. Konstanta specifičnosti (k_{cat}/K_m) za ovu reakciju iznosila je (1,0 ± 0,2) × 10^6 M^{-1} min^{-1}. Na slici 95 prikazan je graf ovisnosti brzine reakcije o koncentraciji supstrata s ucrtanom krivuljom koja najbolje opisuje Michaelis-Menteničinu kinetiku ove reakcije.



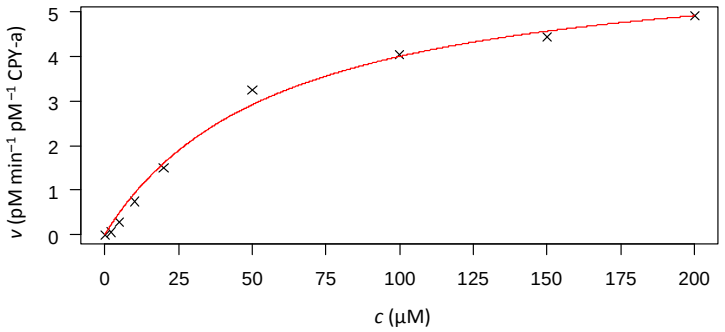
Slika 95. Graf ovisnosti brzine reakcije tangeretin → 4'-hidroksi-5,6,7,8-tetrametoksiflavon → 3',4'-dihidroksi-5,6,7,8-tetrametoksiflavon o koncentraciji supstrata tangeretina u inkubacijama s CYP1A2. Na grafu je ucrtana krivulja koja najbolje opisuje Michaelis-Menteničinu kinetiku ove reakcije.

Kinetički parametri određeni su za reakciju jednostruke demetilacije tangeretina na prstenu A pri čemu je nastao metabolit na RT = 10,85 min (slika 46b), koju je katalizirao CYP3A4 u odgovarajućim inkubacijama. Izračunata je konstanta brzine katalize (k_{cat}) koja je iznosila 13,8 ± 0,8 pM min^{-1} pM^{-1} CYP-a i K_m vrijednost koja je iznosila 65,4 ± 9,9 μM. Konstanta specifičnosti (k_{cat}/K_m) za ovu reakciju iznosila je (0,21 ± 0,03) × 10^6 M^{-1} min^{-1}. Na slici 96 prikazan je graf ovisnosti brzine reakcije o koncentraciji supstrata s ucrtanom krivuljom koja najbolje opisuje Michaelis-Menteničinu kinetiku ove reakcije.



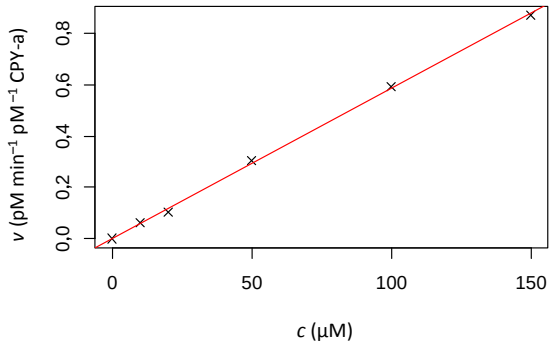
Slika 96. Graf ovisnosti brzine reakcije reakcije jednostruke demetilacije tangeretina na prstenu A pri čemu je nastao metabolit na RT = 10,85 min (slika 46b) o koncentraciji supstrata tangeretina u inkubacijama s CYP3A4. Na grafu je ucrtana krivulja koja najbolje opisuje Michaelis-Menteničinu kinetiku ove reakcije.

Kinetički parametri određeni su i za reakciju tangeretin → 4'-hidroksi-5,6,7,8-tetrametoksiflavon koju je katalizirao CYP3A4 u odgovarajućim inkubacijama. Izračunata je konstanta brzine katalize (k_{cat}) koja je iznosila 6,4 ± 0,4 pM min^{-1} pM^{-1} CYP-a i K_m vrijednost koja je iznosila 59,3 ± 9,0 μM. Konstanta specifičnosti (k_{cat}/K_m) za ovu reakciju iznosila je (0,11 ± 0,02) × 10^6 M^{-1} min^{-1}. Na slici 97 prikazan je graf ovisnosti brzine reakcije o koncentraciji supstrata s ucrtanom krivuljom koja najbolje opisuje Michaelis-Menteničinu kinetiku ove reakcije.



Slika 97. Graf ovisnosti brzine reakcije tangeretin → 4'-hidroksi-5,6,7,8-tetrametoksiflavon o koncentraciji supstrata tangeretina u inkubacijama s CYP3A4. Na grafu je ucrtana krivulja koja najbolje opisuje Michaelis-Menteničinu kinetiku ove reakcije.

Za reakciju tangeretin → 4'-hidroksi-5,6,7,8-tetrametoksiflavon koju je katalizirao CYP2D6 u odgovarajućim inkubacijama nije bilo moguće odrediti kinetičke parametre kao kod ostalih metaboličkih reakcija. U odabranom koncentracijskom rasponu formiranje metabolita 4'-hidroksi-5,6,7,8-tetrametoksiflavona još je bilo u linearnom području, a koncentracije nije bilo moguće dalje povećavati zbog slabe topljivosti supstrata tangeretina. Stoga je prema linearnom modelu enzimske kinetike na temelju eksperimentalnih podataka izračunat nagib pravca koji u ovom području odgovara konstanti specifičnosti (k_{cat}/K_m) (vidi razmatranje u poglavlju 4.6.5). Iz nagiba pravca izračunata je konstanta specifičnosti (k_{cat}/K_m) koja je iznosila (0,0058 ± 0,0001) × 10^6 M^{-1} min^{-1}. Na slici 98 prikazan je graf ovisnosti brzine reakcije o koncentraciji supstrata s ucrtanim pravcem koji određen metodom najmanjih kvadrata najbolje opisuje eksperimentalne podatke.



Slika 98. Graf ovisnosti brzine reakcije tangeretin → 4'-hidroksi-5,6,7,8-tetrametoksiflavon o koncentraciji supstrata tangeretina u inkubacijama s CYP2D6. Na grafu je ucrtan pravac koji određen metodom najmanjih kvadrata najbolje opisuje eksperimentalne podatke.

4.7 Sažeti prikaz rezultata metabolizma odabranih flavonoidnih aglikona

U ovom su poglavlju sažeto prikazani ukupni rezultati metabolizma odabranih flavonoidnih aglikona posredovanog humanim jetrenim citokromima P450. U tablici 8 prikazani su skupni podaci o detektiranim metabolitima i enzimima odgovornima za njihovo nastajanje. Sažeti skupni prikaz svih rezultata eksperimenta enzimske kinetike metaboličkih reakcija primijećenih u inkubacijama s humanim jetrenim citokromima P450 dan je u tablici 9.

Tablica 8. Metabolizam odabranih flavonoidnih aglikona posredovan humanim jetrenim citokromima P450. Zbirni podaci o detektiranim metabolitima i enzimima odgovornima za njihovo formiranje.

Supstrat (S)	Mol. formula (S)	Produkt (P)	Mol. formula (P)	Reakcija	Enzim	RT (P) (min)	Točna masa (P)	Greška mase (ppm)
3,7-dihidroksiflavon	$C_{15}H_{10}O_4$	3,7,4'-trihidroksiflavon	$C_{15}H_{10}O_5$	aromatska hidroksilacija	HLM/CYP2E1*	5,4	270,0529	–0,16
		3,6,7-trihidroksiflavon ili 3,7,8-trihidroksiflavon	$C_{15}H_{10}O_5$	aromatska hidroksilacija	HLM/CYP1A2	9,0	270,0527	0,39
7-hidroksiflavon	$C_{15}H_{10}O_3$	6,7-dihidroksiflavon	$C_{15}H_{10}O_4$	aromatska hidroksilacija	HLM/CYP3A4/CYP1A2/CYP2D6	7,6	254,0577	0,83
		7,8-dihidroksiflavon	$C_{15}H_{10}O_4$	aromatska hidroksilacija	HLM/CYP3A4	5,6	254,0578	0,34
		7,4'-dihidroksiflavon	$C_{15}H_{10}O_4$	aromatska hidroksilacija	HLM	5,3	254,0580	–0,35
akacetin	$C_{16}H_{12}O_5$	apigenin	$C_{15}H_{10}O_5$	*O*-demetilacija	HLM/CYP1A2/CYP2D6	7,4	270,0528	0,04
		luteolin	$C_{15}H_{10}O_6$	*O*-demetilacija i aromatska hidroksilacija	HLM	5,8	286,0477	0,20
apigenin	$C_{15}H_{10}O_5$	luteolin	$C_{15}H_{10}O_6$	aromatska hidroksilacija	HLM/CYP1A2	5,8	286,0478	–0,29
diosmetin	$C_{16}H_{12}O_6$	luteolin	$C_{15}H_{10}O_6$	*O*-demetilacija	HLM	5,8	286,0475	0,71
flavon	$C_{15}H_{10}O_2$	4'-hidroksiflavon	$C_{15}H_{10}O_3$	aromatska hidroksilacija	HLM/CYP1A2	8,2	238,0629	0,45
galangin	$C_{15}H_{10}O_5$	kaempferol	$C_{15}H_{10}O_6$	aromatska hidroksilacija	HLM/CYP2C19/CYP2D6	7,1	286,0480	–0,94
genistein	$C_{15}H_{10}O_5$	orobol	$C_{15}H_{10}O_6$	aromatska hidroksilacija	HLM	4,3	286,0470	2,62
hesperetin	$C_{16}H_{14}O_6$	eriodiktiol	$C_{15}H_{12}O_6$	*O*-demetilacija	HLM	4,0	288,0648	–5,02
kemferol	$C_{15}H_{10}O_6$	kvercetin	$C_{15}H_{10}O_7$	aromatska hidroksilacija	HLM/CYP1A2	5,2	302,0425	0,37
krizin	$C_{15}H_{10}O_4$	bajkalein	$C_{15}H_{10}O_5$	aromatska hidroksilacija	HLM	8,4	270,0542	5,16
		luteolin	$C_{15}H_{10}O_6$	aromatska hidroksilacija	HLM	5,8	286,0475	0,96
naringenin	$C_{15}H_{12}O_5$	eriodiktiol	$C_{15}H_{12}O_6$	aromatska hidroksilacija	HLM/CYP1A2	4,0	288,0635	–0,30
prunetin	$C_{16}H_{12}O_5$	genistein	$C_{15}H_{10}O_5$	*O*-demetilacija	HLM	6,3	270,0515	4,82
		santal	$C_{16}H_{12}O_6$	aromatska hidroksilacija	HLM	8,4	300,0640	–2,07
		6-hidroksiprunetin ili 8-hidroksiprunetin	$C_{16}H_{12}O_6$	aromatska hidroksilacija	HLM	5,0	300,0626	2,53
sakuranetin	$C_{16}H_{14}O_5$	5,3',4'-trihidroksi-7-metoksiflavanon	$C_{16}H_{14}O_6$	aromatska hidroksilacija	HLM/CYP1A2/CYP3A4	7,9	302,0791	–0,13
		naringenin	$C_{15}H_{12}O_5$	*O*-demetilacija	HLM/CYP1A2/CYP2E1*	5,6	272,0683	0,49
		eriodiktiol	$C_{15}H_{12}O_6$	*O*-demetilacija i aromatska hidroksilacija	HLM	4,0	288,0635	–0,30
tangeretin	$C_{20}H_{20}O_7$	4'-hidroksi-5,6,7,8-tetrametoksiflavon**	$C_{19}H_{18}O_7$	*O*-demetilacija	HLM/CYP1A2/CYP3A4/CYP2D6	9,5	358,1053	–0,21
		3',4'-dihidroksi-5,6,7,8-tetrametoksiflavon***	$C_{19}H_{18}O_8$	*O*-demetilacija i aromatska hidroksilacija	HLM/CYP1A2	7,8	374,0999	0,67

* Sudjelovanje enzima u reakciji posredno je potvrđeno u eksperimentu inhibicija metabolizma specifičnim inhibitorima citokroma P450.

** Metabolit je karakteriziran na temelju MS/MS podataka.

*** Metabolit je karakteriziran na temelju MS/MS podataka. Pretpostavljeno je da je C3' najvjerojatnije mjesto aromatske hidroksilacije.

Tablica 9. Rezultati enzimske kinetike metaboličkih reakcija primijećenih u inkubacijama s humanim jetrenim citokromima P450.

Supstrat	**Produkt**	**Reakcija**	**Enzim**	k_{cat} [pM min^{-1} pM^{-1} CYP-a]	K_m [μM]	k_{cat}/K_m [10^6 M^{-1} min^{-1}]
3,7-dihidroksiflavon	3,7,4'-trihidroksiflavon	hidroksilacija	HLM	5,9 ± 1,1	492 ± 163	0,012 ± 0,005
	3,6,7trihidroksiflavon ili 3,7,8-trihidroksiflavon	hidroksilacija	CYP1A2	6,1 ± 0,7	4,2 ± 2,6	1,5 ± 0,9
7-hidroksiflavon	6,7-dihidroksiflavon + 7,8-dihidroksiflavon + 7,4'-dihidroksiflavon	hidroksilacija	HLM	2,7 ± 0,2	54,9 ± 16,7	0,050 ± 0,016
	6,7-dihidroksiflavon	hidroksilacija	HLM	1,9 ± 0,1	43,5 ± 13,3	0,043 ± 0,014
	7,8-dihidroksiflavon	hidroksilacija	HLM	0,42 ± 0,05	104 ± 37	0,004 ± 0,002
	7,4'-dihidroksiflavon	hidroksilacija	HLM	0,45 ± 0,04	82,0 ± 21,7	0,006 ± 0,002
	6,7-dihidroksiflavon + 7,8-dihidroksiflavon	hidroksilacija	CYP3A4	3,9 ± 0,3	37,8 ± 10,3	0,10 ± 0,03
	6,7-dihidroksiflavon	hidroksilacija	CYP3A4	2,6 ± 0,3	47,9 ± 16,4	0,054 ± 0,020
	7,8-dihidroksiflavon	hidroksilacija	CYP3A4	1,4 ± 0,1	26,2 ± 6,6	0,052 ± 0,014
	6,7-dihidroksiflavon	hidroksilacija	CYP2D6	1,60 ± 0,08	26,0 ± 4,8	0,06 ± 0,01
	6,7-dihidroksiflavon	hidroksilacija	CYP1A2	14,2 ± 0,7	9,7 ± 2,0	1,5 ± 0,3
akacetin	apigenin + luteolin	demetilacija + hidroksilacija	HLM	0,62 ± 0,07	9,5 ± 3,3	0,06 ± 0,02
	apigenin + luteolin	demetilacija + hidroksilacija	CYP1A2	3,8 ± 0,4	1,3 ± 0,6	2,9 ± 1,5
	apigenin	demetilacija	CYP2D6	3,7 ± 0,5	22,7 ± 7,0	0,16 ± 0,05
apigenin	luteolin	hidroksilacija	HLM	0,20 ± 0,03	12,4 ± 6,0	0,017 ± 0,009
	luteolin	hidroksilacija	CYP1A2	0,30 ± 0,01	0,7 ± 0,1	0,5 ± 0,1
flavon	4'-hidroksiflavon + 6-hidroksiflavon + 7-hidroksiflavon	hidroksilacija	HLM	/	/	0,0028 ± 0,0002
	4'-hidroksiflavon	hidroksilacija	HLM	/	/	0,0015 ± 0,0001
galangin	kemferol + kvercetin	hidroksilacija	HLM	3,3 ± 0,5	31,6 ± 16,0	0,11 ± 0,06
	kemferol	hidroksilacija	CYP2C19	0,022 ± 0,003	5,4 ± 1,4	0,004 ± 0,001
kemferol	kvercetin	hidroksilacija	HLM	0,082 ± 0,009	3,4 ± 1,5	0,024 ± 0,010

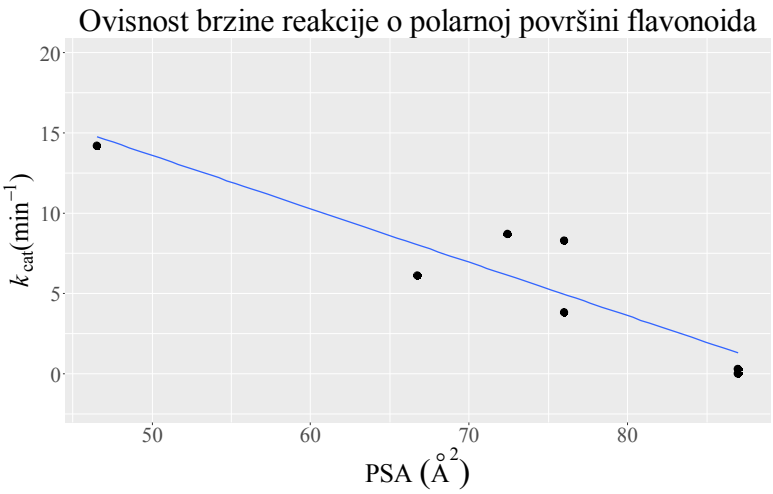
Tablica 9. Rezultati enzimske kinetike metaboličkih reakcija primijećenih u inkubacijama s humanim jetrenim citokromima P450 (nastavak).

Supstrat	**Produkt**	**Reakcija**	**Enzim**	k_{cat} [pM min^{-1} pM^{-1} CYP-a]	K_m [μM]	k_{cat}/K_m [10^6 M^{-1} min^{-1}]
naringenin	eriodiktiol	hidroksilacija	HLM	1,1 ± 0,2	45,2 ± 14,9	0,025 ± 0,009
	eriodiktiol	hidroksilacija	CYP1A2	0,021 ± 0,003	7,3 ± 5,6	0,003 ± 0,002
sakuranetin	5,3',4'-trihidroksi-7-metoksiflavanon + naringenin + eriodiktiol	hidroksilacija + demetilacija + hidroksilacija	HLM	5,4 ± 1,0	293 ± 82	0,019 ± 0,006
	naringenin + eriodiktiol	demetilacija + hidroksilacija	HLM	3,1 ± 0,3	152 ± 31	0,020 ± 0,005
	5,3',4'-trihidroksi-7-metoksiflavanon	hidroksilacija	HLM	/	/	0,0022 ± 0,0002
	5,3',4'-trihidroksi-7-metoksiflavanon	hidroksilacija	CYP3A4	2,2 ± 0,4	39,8 ± 20,1	0,06 ± 0,03
	5,3',4'-trihidroksi-7-metoksiflavanon	hidroksilacija	CYP1A2	8,3 ± 1,1	12,2 ± 6,8	0,7 ± 0,4
tangeretin	X-demetilirani (prsten A)	demetilacija	HLM	2,2 ± 0,3	97,3 ± 29,2	0,023 ± 0,008
	4'-hidroksi-5,6,7,8-tetrametoksiflavon + 3',4'-dihidroksi-5,6,7,8-tetrametoksiflavon	demetilacija + hidroksilacija	CYP1A2	8,7 ± 0,5	9,1 ± 2,3	1,0 ± 0,2
	4'-hidroksi-5,6,7,8-tetrametoksiflavon	demetilacija	CYP1A2	6,2 ± 0,3	12,9 ± 2,6	0,5 ± 0,1
	3',4'-dihidroksi-5,6,7,8-tetrametoksiflavon	hidroksilacija (demetilacija)	CYP1A2	2,4 ± 0,1	4,5 ± 1,0	0,5 ± 0,1
	X-demetilirani (prsten A)	demetilacija	CYP3A4	13,8 ± 0,8	65,4 ± 9,9	0,21 ± 0,03
	4'-hidroksi-5,6,7,8-tetrametoksiflavon	demetilacija	CYP3A4	6,4 ± 0,4	59,3 ± 9,0	0,11 ± 0,02
	4'-hidroksi-5,6,7,8-tetrametoksiflavon	demetilacija	CYP2D6			0,0058 ± 0,0001

4.8 Prediktivni statistički modeli

4.8.1 Statistička analiza

U statističkoj analizi utjecaja fizikalno-kemijskh svojstava na karakteristike metabolizma ispitanih flavonoida posredovanog citokromom P450 1A2, jedina statistički značajna ($p < 0{,}05$) korelacija nađena je između polarne površine (engl. *polar surface area*, PSA) flavonoida i k_{cat} (prilagođeni $R^2 = 0{,}7979$) (slika 99): što je veća polarna površina flavonoida, to je sporiji njihov metabolizam. Ovaj rezultat je u skladu s općim karakteristikama reakcija posredovanih citokromima P450 i njihovom preferencijom prema lipofilnijim supstratima.



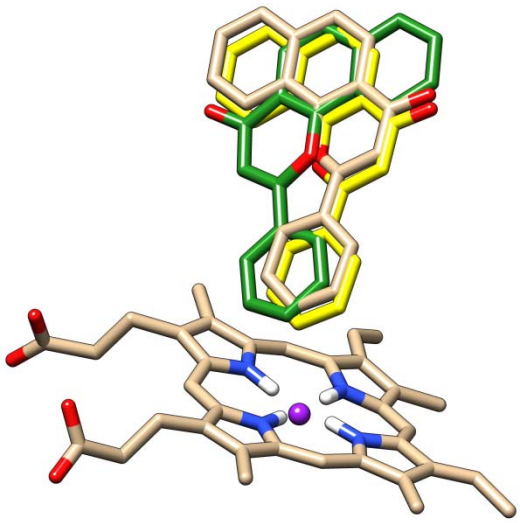
Slika 99. Korelacija između polarne površine flavonoida i k_{cat} (prilagođeni $R^2 = 0{,}7979$, $p < 0{,}05$)

Određene su i opće strukturne značajke koje određuju hoće li odabrani flavonoidni aglikon biti metaboliziran citokromima P450. Nađeno je da su tri supstituenta u strukturi odabranih flavonoida statistički značajno korelirana s metabolizmom posredovanim citokromima P450: prisutnost 4'-metoksilne skupine (80%), odsutnost 3'-hidroksilne skupine (29%) i odsutnost 3-hidroksilne skupine (30%). Njihovi međusobni koeficijenti korelacije utvrđeni su u rasponu od $r = -0{,}14$ za 3-hidroksilne i 4'-metoksilne skupine do $r = 0{,}38$ za 3'-hidroksilne i 4'-metoksilne skupine, što ukazuje na to da spomenute strukturne značajke flavonoida nisu međusobno korelirane.

Također su sa statističkom značajnošću utvrđene i neke strukturne značajke koje se odnose na položaj na kojem se dogodila metabolička pretvorba flavonoida katalizirana citokromom P450 1A2. Utvrđeno je da je demetilacija metoksilne skupine preferirana na položaju 4' prstena B, dok isto ne vrijedi za demetilaciju metoksilne skupine na položaju 7 prstena A. Prisutnost hidroksilne skupine na položaju 4' prstena B snažno utječe na dodatnu hidroksilaciju na položaju 3' prstena B. Prisutnost hidroksilne skupine na položaju 5 ili na položaju 6 prstena A ne pogoduje hidroksilaciji na položaju 4' prstena B, a prisutnost hidroksilne skupine na položaju 5 prstena A također ne pogoduje hidroksilaciji na položaju 6 istog prstena. Sličan negativan utjecaj 5-hidroksilne skupine također je utvrđen za hidroksilaciju na položajima 7 i 8, ali zbog malog uzorka nije statistički značajan. Općenito vrijedi da CYP1A2 preferira lipofilnije flavonoide koji na položaju 4' imaju supstituiranu hidroksilnu ili metoksilnu skupinu i nisu supstituirani na položaju 5 prstena A.

4.8.2 Sidrenje

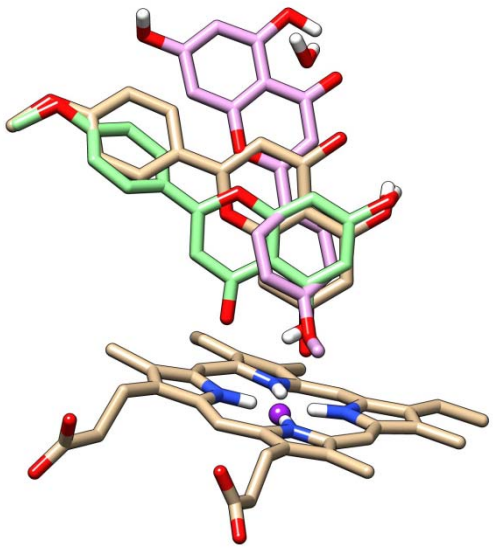
Provedeno je sidrenje alfa-naftoflavona u prisutnosti i odsutnosti HOH 733 i napravljena je usporedba s kristalografskim podacima (slika 100).



Slika 100. Preklapanje usidrenih položaja alfa-naftoflavona s uklonjenim svim molekulama vode (zeleno), u prisutnosti HOH 733 (žuto) i kristalografske strukture alfa-naftoflavona (smeđe) u blizini hema citokroma P450 1A2. Atomi kisika označeni su crvenom, atomi dušika plavom, atomi vodika bijelom i atom željeza u hemu ljubičastom bojom.

Usidreni položaji alfa-naftoflavona rotirani su za otprilike 180°, ovisno o tome je li molekula vode prisutna ili nije. Položaj usidrenog alfa-naftoflavona u slučaju kad je molekula vode prisutna ima gotovo jednake koordinate kao kristalografski alfa-naftoflavon. Ova provjera je napravljena u svrhu potvrde da je sidrenje akacetina i apigenina u prisutnosti molekule HOH 733 opravdano, budući da je poznato da ona može imati utjecaj na položaj liganda u veznom mjestu CYP1A2 [78,79].

Sidrenje akacetina i apigenina provedeno je u prisutnosti i odsutnosti HOH 733 i napravljena je usporedba njihovih položaja (slika 101). Budući da je pokazano da CYP1A2 katalizira *O*-demetilaciju akacetina na položaju 4' prstena B, znamo da bi 4'-metoksilna skupina trebala biti usmjerena prema atomu željeza u hemu. Usporedbom sidrenja specija akacetina u različitim uvjetima (tablica 10), može se zaključiti da sidrenje aniona akacetina rezultira pogrešnom orijentacijom u veznom mjestu, a isto proizlazi i na temelju sidrenja molekule akacetina u odsutnosti HOH 733. Ovaj rezultat sugerira da je akacetin metaboliziran citokromom P450 1A2 kad se nalazi u svom molekularnom obliku i da je prisutnost molekule vode u veznom mjestu enzima ključno za njegovu pravilnu orijentaciju.



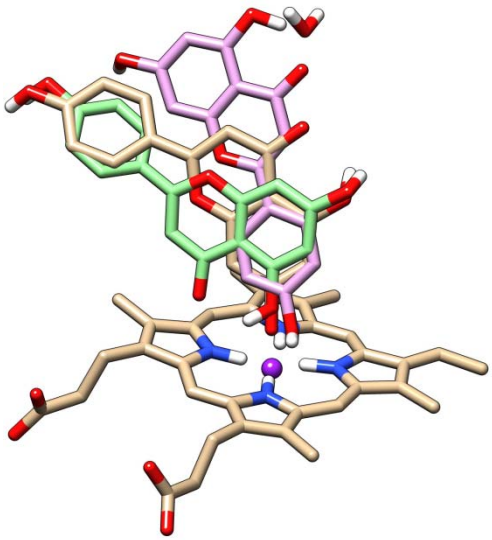
Slika 101. Preklapanje usidrenih specija akacetina dobivenih u najvećem broju sidrenja u prisutnosti i odsutnosti HOH 733. Anioni akacetina usidreni s i bez HOH 733 zauzimaju isti položaj i označeni su smeđom bojom. Molekula akacetina usidrena bez HOH 733 označena je zelenom, a molekula akacetina usidrena s HOH 733 (smještena u blizini 5-hidroksilne skupine) ljubičastom bojom. Atomi kisika označeni su crvenom, atomi dušika plavom, atomi vodika bijelom i atom željeza u hemu ljubičastom bojom.

Tablica 10. Sažetak podataka sidrenja specija akacetina. Sivom bojom označena su sidrenja koja su rezultirala vezanjem izvan veznog mjesta, dok su zvjezdicom (*) označena sidrenja koja su rezultirala vezanjem u veznom mjestu u ispravnoj orijentaciji (4'-metoksilna skupna usmjerena prema atomu željeza u hemu).

akacetin-7-anion					
u prisutnosti HOH 733			bez HOH 733		
Rang grozda	Postotak broja sidrenja	Energija vezanja (kcal/mol)	Rang grozda	Postotak broja sidrenja	Energija vezanja (kcal/mol)
1.	72	–7,14	1.	72	–7,18
2.	23	–4,35	2.*	1	–5,31
3.	4	–3,71	3.	24	–4,35
4.	1	–3,64	4.	1	–3,76
			5.	1	–3,71
			6.	1	–3,64

molekula akacetina					
u prisutnosti HOH 733			bez HOH 733		
Rang grozda	Postotak broja sidrenja	Energija vezanja (kcal/mol)	Rang grozda	Postotak broja sidrenja	Energija vezanja (kcal/mol)
1.	5	–8,48	1.	79	–8,52
2.*	85	–8,44	2.	14	–8,21
3.*	2	–7,97	3.	3	–5,18
4.	6	–5,21	4.	1	–5,12
5.	1	–5,11	5.	3	–4,98
6.	1	–5,01			

Rezultati sidrenja apigenina slični su dobivenima za akacetin (slika 102, tablica 11). Slično kao kod akacetina, za apigenin je pokazano da CYP1A2 katalizira reakciju aromatske hidroksilacija na položaju 3' prstena B, pa znamo da bi prsten B trebao biti usmjeren prema atomu željeza u hemu. Rezultati sidrenja apigenina razlikuju se u odnosu na akacetin najviše u tome što je ispravna orijentacija aniona apigenina u pristutnosti HOH 733 zabilježena u 26% od ukupnog broja sidrenja. Ali ipak je taj postotak puno manji u usporedbi s molekulom apigenina u prisutnosti HOH 733 (89%). Ovaj rezultat sugerira da je apigenin metaboliziran citokromom P450 1A2 kad se nalazi u svom molekularnom obliku i da je prisutnost molekule vode u veznom mjestu enzima ključno za njegovu pravilnu orijentaciju.



Slika 102. Preklapanje usidrenih specija apigenina dobivenih u najvećem broju sidrenja u prisutnosti i odsutnosti HOH 733. Anioni apigenina usidreni s i bez HOH 733 zauzimaju isti položaj i označeni su smeđom bojom. Molekula apigenina usidrena bez HOH 733 označena je zelenom, a molekula apigenina usidrena s HOH 733 (smještena u blizini 5-hidroksilne skupine) ljubičastom bojom. Atomi kisika označeni su crvenom, atomi dušika plavom, atomi vodika bijelom i atom željeza u hemu ljubičastom bojom.

Tablica 11. Sažetak podataka sidrenja specija apigenina. Sivom bojom označena su sidrenja koja su rezultirala vezanjem izvan veznog mjesta, dok su zvjezdicom (*) označena sidrenja koja su rezultirala vezanjem u veznom mjestu u ispravnoj orijentaciji (prsten B usmjeren prema atomu željeza u hemu).

apigenin-7-anion					
u prisutnosti HOH 733			bez HOH 733		
Rang grozda	Postotak broja sidrenja	Energija vezanja (kcal/mol)	Rang grozda	Postotak broja sidrenja	Energija vezanja (kcal/mol)
1.	61	–6,3	1.	97	–6,35
2.*	26	–6,1	2.	3	–4
3.	12	–4,06			
4.	1	–3,51			

molekula apigenina					
u prisutnosti HOH 733			bez HOH 733		
Rang grozda	Postotak broja sidrenja	Energija vezanja (kcal/mol)	Rang grozda	Postotak broja sidrenja	Energija vezanja (kcal/mol)
1.	5	–8,22	1.	90	–7,99
2.*	89	–8,05	2.	7	–7,95
3.	4	–7,95	3.*	3	–7,73
4.	2	–5,11			

5 RASPRAVA

5.1 Oksidativni metabolizam flavona

U ovom je radu ispitano 11 flavonoida koji pripadaju skupini flavona. Za njih šest (akacetin, apigenin, diosmetin, krizin, luteolin i tangeretin) u literaturi je moguće pronaći radove koji opisuju istraživanje metabolizma posredovanog citokromima P450. Za preostalih pet ispitanih flavonoida iz ove skupine (flavon, 6-hidroksiflavon, 7-hidroksiflavon, krizindimetileter i tektokrizin) u ovom su radu prvi puta opisani rezultati metabolizma posredovanog citokromima P450. Metabolizam posredovan humanim jetrenim citokromima P450 u uvjetima eksperimenta opisanog u ovom radu nije zabilježen za sljedeće flavone: krizindimetileter, luteolin i tektokrizin. Problemi s utvrđivanjem metabolizma 6-hidroksiflavona opisani su ranije u poglavlju 4.3. Izostanak oksidativnog metabolizma luteolina zabilježen je i u istraživanju Nielsena i suradnika [38], iako treba naglasiti da su autori u tom eksperimentu koristili štakorske jetrene mikrosome.

5.1.1 Akacetin

Istraživanje metabolizma akacetina koje su proveli Androutsopolus i suradnici [37] uključivao je samo eksperiment s rekombinantnim enzimima citokroma P450 CYP1A1 i CYP1B1. Ti su enzimi istraživani ponajprije zbog njihove potencijalne uloge u karicinogenezi, no njihov udio u zdravoj jetri praktički je zanemariv [15]. Stoga rezultati ovog istraživanja nemaju relavantno značenje za metabolizam akacetina u zdravom organizmu. Zbog svega navedenog može se reći da su u ovom radu također i za akacetin prvi puta opisani rezultati metabolizma posredovanog citokromima P450 koji imaju relevantno značenje za opću populaciju. Rezultati ovog istraživanja ukazuju na to da je oksidativni metabolizam akacetina karakteriziran s dvije metaboličke reakcije u kojima nastaju dva metabolita: apigenin i luteolin. Riječ je o kombiniranoj reakciji *O*-demetilacije nakon koje distributivno slijedi aromatska hidroksilacija, a shematski se može prikazati na slijedeći način: akacetin → apigenin → luteolin (slika 21). Kompletnu kombiniranu reakciju kataliziraju enzimi HLM-a i CYP1A2, dok CYP2D6 katalizira samo reakciju demetilacije akacetina pri čemu nastaje apigenin. Za sve ove reakcije određeni su kinetički parametri koji općenito ukazuju na visoku katalitičku učinkovitost istih te na glavnu ulogu CYP1A2 u oksidativnom metabolizmu akacetina. Iako opisana metabolička pretvorba akacetina nije najbrža među analiziranim flavonoidima, dobivene vrijednosti K_m od 1,3 μM (druga najniža vrijednost među analiziranim flavonoidima) i k_{cat}/K_m od $2{,}9 \times 10^6$ M^{-1} min^{-1} (najviša vrijednost među analiziranim flavonoidima), za reakciju kataliziranu uz CYP1A2, ukazuju na to da je ovo najučinkovitija metabolička reakcija između svih analiziranih flavonoida. Androutsopolus i suradnici [37]

utvrdili su da istu kombiniranu reakciju metabolizma akacetina kataliziraju CYP1A1 i CYP1B1, a za navedne reakcije nisu odredili kinetičke parametre. U uvjetima ekeprimenta opisanog u tom radu detektirano je nastajanje dva dodatna metabolita, od kojih je jedan identificiran kao skutelarein, a drugi nije dalje karakteriziran. Skutelarein je karakteriziran kao sekundarni produkt aromatske hidroksilacije apigenina, nastao u manjem obimu u odnosu na glavni produkt ovog koraka metabolizma akacetina u uvjetima eksperimenta. Skutelarein nije detektiran kao metabolit u eksperimentima provedenima u ovom istraživanju. Ipak zbog razlike u fokusu na različite enizme citokroma P450, nije moguće direktno uspoređivati rezultate ova dva istraživanja i u tom smislu opisana minorna razlika u sekundarnom produktu metabolizma akacetina nije relevantna za raspravu u okviru ovog rada. Parametri enzimske kinetike metaboličkih reakcija akacetina posredovanih humanim jetrenim citokromima P450 određeni u ovom istraživanju prvi su poznati podaci ove vrste objavljeni za akacetin.

5.1.2 Apigenin

Rezultati ovog istraživanja ukazuju na to da je oksidativni metabolizam apigenina karakteriziran jednom metaboličkom reakcijom u kojoj nastaje jedan metabolit luteolin. Riječ je o reakciji aromatske hidroksilacije koja se shematski može prikazati na slijedeći način: apigenin → luteolin (slika 23). Ovu reakciju kataliziraju enzimi HLM-a i CYP1A2. Za ove reakcije određeni su kinetički parametri koji općenito ukazuju na relativno visoku katalitičku učinkovitost istih te na glavnu ulogu CYP1A2 u oksidativnom metabolizmu apigenina. Opisana metabolička pretvorba apigenina uz CYP1A2 s vrijednostima k_{cat} od 0,3 pM min^{-1} pM^{-1} CYP-a među najsporijima je od analiziranih flavonoida. S druge strane, najniža izmjerena vrijednost K_m među analiziranim flavonoidima u iznosu od 0,7 μM ukazuje na najveći afinitet vezanja apigenina prema CYP1A2 u odnosu na sve analizirane flavonoide. Vrijednost k_{cat}/K_m od $0,5 \times 10^6$ M^{-1} min^{-1} za reakciju kataliziranu uz CYP1A2 među višima je među analiziranim flavonoidima, sugerirajući relativno visoku katalitičku učinkovitost metaboličke reakcije. Ipak, u rasponu određenih vrijednosti katalitičke konstante (k_{cat}/K_m), vrijednost određena za apigenin među najnižima je od ispitanih flavonoida za koje je utvrđeno da su susptrati enzima CYP1A2. Parametri enzimske kinetike metaboličkih reakcija apigenina posredovanih humanim jetrenim citokromima P450 određeni u ovom istraživanju prvi su poznati podaci ove vrste objavljeni za apigenin. Rezultati dobiveni u ovom istraživanju slažu se s ranije objavljenima u radovima Neilsena i suradnika [38] i Breinholta i suradnika [39]. Potonja grupa autora je uz glavnu ulogu koju ima CYP1A2 u metabolizmu apigenina, utvrdila da manju ulogu ima i CYP3A4, što nije potvrđeno u inkubacijama s čistim rekombinantnim

enzimom u ovom istraživanju. Mogući razlog za ovu manju razliku jesu različiti uvjeti eksperimenta, tj. različite koncentracije enzima korištene u inkubacijama s rekombinantnim enzimima i različito vrijeme inkubacije. Dok su Breinholt i suradnici [39] radili su s koncentracijama CYP3A4 od približno 29 pmol/100 µl i vremenom inkubacije od 20 min, u ovom istraživanju je koncentracija CYP3A4 u inkubacijama bila 3 pmol/100 µl, a vrijeme inkubacije bilo je kraće za 5 min. Gradolatto i suradnici [40] su u eksperimentalnom modelu s jetrenim mikrosomima štakora *in vitro*, osim glavnog metabolita luteolina, identificirali dodatna dva hidroksilirana metabolita zastupljena u malim količinama, skutelarein i izoskutelarein. Ova dva dodatna metabolita nastala su samo u eksperimentu s induciranim mikrosomima, dok je s neinduciranima jedini produkt metabolizma bio luteolin. U ovom slučaju zbog različitog izvora enizma citokroma P450, nije moguće direktno uspoređivati rezultate ova dva istraživanja i u tom smislu opisana minorna razlika u sekundarnim produktima metabolizma apigenina nije relevantna za raspravu u okviru ovog rada.

5.1.3 Diosmetin

Rezultati ovog istraživanja ukazuju na to da je oksidativni metabolizam diosmetina karakteriziran jednom metaboličkom reakcijom u kojoj nastaje jedan metabolit luteolin. Riječ je o reakciji *O*-demetilacije na položaju 4' prstena B, a koja se shematski može prikazati na slijedeći način: diosmetin → luteolin (slika 25). Ovu reakciju kataliziraju enzimi HLM-a, a budući da nastaje manje od 10% (*m*/*m*) metabolita u odnosu na koncentraciju supstrata, metabolizam diosmetina nije dalje karakteriziran. Rezultati dobiveni u ovom istraživanju slažu se s ranije objavljenima u radovima Androutsopolusa i suradnika koji su u prvom eksperimentu u inkubacijama *in vitro* s rekombinantnim citokromima P450 i staničnim linijama adenokarcinoma dojke MCF-7 [41] te u drugom eksperimentu *in vitro* u inkubacijama sa staničnim linijama adenokarcinoma dojke MDA-MB 468 i normalnim stanicama tkiva dojke MCF-10A [42] pokazali je da je glavni put metabolizma diosmetina bio istovjetan predloženom u ovom istraživanju. Ova grupa autora dodatno je utvrdila da CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 i CYP3A5 nisu odgovorni za ovu reakciju, te da glavnu ulogu u oksidativnom metabolizmu diosmetina ima CYP1A2, a u manjoj mjeri i CYP3A4.

5.1.4 Flavon

Rezultati ovog istraživanja ukazuju na to da je oksidativni metabolizam flavona karakteriziran jednom dominantnom metaboličkom reakcijom u kojoj nastaje metabolit identificiran kao 4'-hidroksiflavon. Riječ je o reakciji aromatske hidroksilacije na položaju 4' prstena B, a koja se

shematski može prikazati na slijedeći način: flavon → 4'-hidroksiflavon (slika 27). Minorni produkti detektirani samo na MS detektoru upućuju i na druga mjesta aromatske hidroksilacije, ali u praktički zanemarivim količinama. Pronalazak 4'-hidroksiflavona kao glavnog produkta metabolizma upućuje na zaključak da je aromatska hidroksilacija posredovana djelovanjem enzima citokroma P450 nesupstituiranog flavona preferirana na položaju 4' prstena B. Ovu metaboličku pretvorbu katalizirali su enzimi HLM-a i CYP1A2. Vrijednost k_{cat}/K_m od 0,0015 × 10^6 M^{-1} min^{-1} za reakciju kataliziranu uz HLM najniža je među analiziranim flavonoidima, sugerirajući slabu katalitičku učinkovitost ove metaboličke reakcije. U inkubacijama s rekombinantnim CYP1A2 reakcija je bila toliko spora i neučinkovita da kinetički parametri nisu niti mogli biti određeni. Metabolizam flavona dosad nije opisan u dostupnoj literaturi, stoga su rezultati dobiveni u ovom radu prvi poznati podaci o njegovom metabolizmu.

5.1.5 7-Hidroksiflavon

Rezultati ovog istraživanja ukazuju na to da je oksidativni metabolizam 7-hidroksiflavona karakteriziran s tri metaboličke reakcije u kojima nastaju tri metabolita: 6,7-dihidroksiflavon, 7,8-dihidroksiflavon i 7,4'-dihidroksiflavon. Riječ je o aromatskoj hidroksilaciji supstrata na položaju 6, odnosno 8 prstena A, te na položaju 4' prstena B. Dva hidroksilirana metabolita (6,7-dihidroksiflavon i 7,8-dihidroksiflavon), nastala su u inkubacijama s CYP3A4. U inkubacijama s CYP1A2 i CYP2D6 detektiran je jedino 6,7-dihidroksiflavon, glavni metabolit iz eksperimenta s HLM-om. Iako je CYP3A4 katalizirao oba metabolička puta kojima se hidroksilira prsten A primijećena u eksperimentu s HLM-om, ukupni obim metabolizma nešto je manji u odnosu na CYP1A2 i CYP2D6. Reakciju u kojoj nastaje 7,4'-dihidroksiflavon nije katalizirao nijedan od ispitanih pojedinačnih enzima. Katalitičke učinkovitosti metaboličkih reakcija u inkubacijama s HLM-om općenito su niže u odnosu na vrijednosti dobivene s čistim rekombinantnim enzimima, a jednako tako su nađene niže vrijednosti za sve reakcije u kojima nastaju 7,8-dihidroksiflavon i 7,4'-dihidroksiflavon u odnosu na vrijednosti za reakcije u kojima nastaje 6,7-dihidroksiflavon jasno sugerirajući da je 6,7-dihidroksiflavon glavni produkt metabolizma 7-hidroksiflavona posredovan humanim jetrenim citokromima P450. Među enzimima koji kataliziraju ovu reakciju, najvećom katalitičkom učinkovitošću ističe se CYP1A2, te se uz vrijednost omjera k_{cat}/K_m od 1,5 × 10^6 M^{-1} min^{-1} svrstava na drugo mjesto najučinkovitijih reakcija među ispitanim flavonoidima. Na temelju ovih rezultata može se zaključiti da su sva tri enzima citokroma P450 za koje je utvrđeno da sudjeluju u metabolizmu 7-hidroksiflavona podjednako važna, a najvećom

katalitičkom učinkovitošću među njima se ističe CYP1A2. Metabolizam 7-hidroksiflavona dosad nije opisan u dostupnoj literaturi, stoga su rezultati dobiveni u ovom radu prvi poznati podaci o njegovom metabolizmu.

5.1.6 Krizin

Rezultati ovog istraživanja ukazuju na to da je oksidativni metabolizam krizina karakteriziran s dvije metaboličke reakcije u kojima nastaju dva metabolita: bajkalein i luteolin. Riječ je o reakciji aromatske hidroksilacije na položaju 6 prstena A, pri čemu nastaje bajkalein, te o dvostrukoj aromatskoj hidroksilaciji na položajima 3' i 4' prstena B, pri čemu nastaje luteolin. Ovu reakciju kataliziraju enzimi HLM-a, a budući da nastaje manje od 10% (*m*/*m*) metabolita u odnosu na koncentraciju supstrata, metabolizam krizina nije dalje karakteriziran. Ovdje je potrebno istaknuti da uz luteolin kao produkt metabolizma iznenađujuće nije pronađen jednostruko hidroksilirani međuprodukt (npr. apigenin), čak niti u tragovima. Naime, u svim dosadašnjim slučajevima u kojima je primijećena kombinirana reakcija (dvostruka hidroksilacija ili demetilacija/hidroksilacija), utvrđeno je da se zbivala distributivno, preko jednostruko hidroksiliranog/demetiliranog međuprodukta. Nije sasvim očito koji je razlog preskakanja jednostruko hidroksiliranog međuprodukta u nastanku luteolina. Na temelju ostalih rezultata možemo pretpostaviti da se prvo mjesto hidroksilacije nalazi na položaju 4' prstena B. U tom slučaju nastao bi apigenin. Za apigenin je utvrđeno da ga metaboliziraju HLM i CYP1A2. Za ovu reakcije zabilježene su relativno niske vrijednosti patametra K_m, štoviše, za reakciju koju katalizira CYP1A2, određena je najniža vrijednost ovog parametra od 0,7 μM sugerirajući najveći afinitet vezanja apigenina prema CYP1A2 u odnosu na sve analizirane flavonoide. Iako se prema vrijednostima k_{cat} ova reakcija ne zbiva u velikom obimu, uz vrlo niske vrijednosti K_m, radi se o učinkovitoj reakciji. Stoga je moguće da se, uz relativno sporu reakciju pretvorbe krizina u apigenin, pretvorba nastalog apigenina u luteolin zbiva puno većom učinkovitošću zbog znatno većeg afiniteta CYP1A2 kojeg ovaj enzim moguće ima prema apigeninu u odnosu na krizin. U tom bi se slučaju male količine nastalog apigenina, odmah metabolizirale do luteolina. Kako zbog općenito male količine nastalih metabolita, metabolizam krizina nije dalje karakteriziran, nisu dostupni kinetički patametri za usporedbu i provjeru ove pretpostavke. Zanimljivo je i usporediti dobivene rezultate u ovom istraživanju s već objavljenim podacima u literaturi za krizin. Androutsopolus i suradnici [43] u *in vitro* eksperimentalnom modelu s humanim rekombinantnim citokromima P450 nisu utvrdili nastanak ni apigenina ni luteolina, već je utvrđena pretborba krizina u bajkalein katalizirana sljedećim enzimima citokroma P450: 1A1, 1A2 i 1B1. Bajkalein je bio jedini

produkt metabolizma u uvjetima eksperimenta. Otake i Walle [47] u uvjetima svog eksperimenta nisu uopće primijetili metabolizam krizina HLM-om. Nažalost, teško je dati usporedbu između ovih istraživanja jer potonji autori nisu koristili molarne koncentracije enzima korištenih u inkubacijama, stoga razlozi ove razlike ostaju nejasni. Dodatno, u istraživanju Neilsena i suradnika [38] u *in vitro* eksperimentu s jetrenim mikrosomima štakora utvrđen je nastanak četiri produkta oksidativnog metabolizma. Dva količinski najzastupljenija metabolita nisu identificirana niti dalje karakterizirana, dok su dva metabolita nađena u manjoj količini identificirana kao apigenin i luteolin. Iako bi bilo zanimljivo otkriti koja su to dva glavna metabolita nastala u eksperimentu, zbog različitog izvora enzima citokroma P450 ovi rezultati nisu sasvim prikladni za usporedbu s rezultatima u ovom radu. Zaključno se može ustvrditi da su rezultati metabolizma krizina u ovom istraživanju potvrdili nastanak bajkaleina kao jednog od glavnih produkata. Pronalazak luteolina kao drugog metabolita sugerira da je i drugi metabolički put oksidacije krizina humanim citokromima P450 moguć, a u ovom je radu po prvi puta opisan za humane jetrene citokrome P450. Oba metabolita zastupljena su u približno jednakim količinama što ukazuje na to da nijedan od ovih metaboličkih puteva kataliziranih humanim citokromima P450 nije preferiran, a općenito se zbivao u malom obimu.

5.1.7 Tangeretin

Većina od jedanaest detektiranih metabolita u inkubacijama tangeretina s HLM-om nije mogla biti identificirana zbog nedostupnosti odgovarajućih standarada. Najveći broj detektiranih metabolita odnosio se na jednostruko i dvostruko demetilirane derivate tangeretina u različitim kombinacijama i na različitim položajima na prstenu A i prstenu B, koji su nađeni u malim količinama. Ipak, dva glavna metabolita, količinski najzastupljenija u inkubacijama tangeretina s HLM-om, posredno su identificirana na temelju podataka dobivenih LC-MS/MS analizom te je utvrđeno da se radi o 4'-hidroksi-5,6,7,8-tetrametoksiflavonu i 3',4'-dihidroksi-5,6,7,8-tetrametoksiflavonu. Pretpostavljen je distributivan nastanak ovih metabolita primarnom *O*-demetilacijom na položaju 4' prstena B nakon koje slijedi aromatska hidroksilacija na položaju 3' prstena B. Utvrđeno je da je ova pretpostavljena metabolička pretvorba glavni put metabolizma tangeretina kataliziranog humanim jetrenim citokromima P450 koji je shematski prikazan na sljedeći način: tangeretin → 4'-hidroksi-5,6,7,8-tetrametoksiflavon → 3',4'-dihidroksi-5,6,7,8-tetrametoksiflavon (slika 45). Inkubacijama s pojedinačnim rekombinantnim citokromima P450 utvrđeno je da su za metabolizam tangeretina odgovorni enzimi CYP1A2, CYP2D6 i CYP3A4. Prema količini

nastalih produkata metabolizma, može se zaključiti da najvažniju ulogu imaju CYP1A2 i CYP3A4. CYP1A2 najvažniji je enzim za oksidativni metabolizam tangeretina budući da je katalizirao njegovu glavnu metaboličku reakciju primijećenu u eksperimentu s HLM-om. Dobiveni rezultati vrlo dobro se slažu s već objavljenim podacima za metabolizam tangeretina koji su detaljno opisani u poglavlju 1.4.1. Primijećeno je i dobro podudaranje rezultata oksidativnog metabolizma tangeretina u različitim ispitanim eksperimentalnim modelima, jetrenim mikrosomima štakora, štakora *in vivo*, a osobito dobro podudaranje zabilježeno je s mišjim i humanim jetrenim mikrosomima. Glavni metabolit s najvećim količinskim udjelom u ovom je slučaju bio 4'-hidroksi-5,6,7,8-tetrametoksiflavon. Eksperimenti s rekombinantnim citokomima P450 pokazali su da su enzimi CYP1A2, CYP3A4 i CYP2D6 uključeni u oksidativni metabolizam tangeretina, no nije precizno utvrđeno koji od njih je odgovoran za svaku pojedinačnu metaboličku reakciju. Kao i u ovom istraživanju, pokazano je da je CYP1A2 glavni enzim odgovoran za demetilaciju na položaju 4' prstena B, kao i za naknadnu hidroksilaciju na položaju 3' prstena B ovog glavnog demetiliranog produkta. Ista pretvorba je primijećena i uz CYP3A4, ali u manjem obimu. Jedino se u segmentu metabolizma s CYP3A4 rezultati djelomično ne poklapaju u tome što u ovom istraživanju nije primijećena daljnja oksidacija 4'-demetiliranog produkta u inkubacijama s CYP3A4. No, ipak zbog malih količina ovog metabolita koja je nađena u istraživanju Breinholta i suradnika [45], možemo zaključiti da se radi o minornoj razlici koju su mogle uzrokovati male razlike u uvjetima eksperimenta. Osobito je važno napomenuti da se koncentracije citokroma P450 u inkubacijama ne mogu usporediti jer je autori ne navode. Na kraju možemo zaključiti da je rezultatima ovog istraživanja potvrđen glavni put metabolizma tangeretina posredovan humanim jetrenim citokromima P450 kao i glavna uloga CYP1A2 u tom procesu.

5.1.8 Opće karakteristike oksidativnog metabolizma flavona

Hidroksilacija flavona katalizirana je humanim citokromima P450 na položajima 3' i 4' na prstenu B, s tim da je položaj 4' preferiran na nesupstituiranom prstenu B. Hidroksilacija je također moguća na položajima 6 i 8 na prstenu A. Na primjeru nesupstituiranog flavona, očito je da je preferirano mjesto aromatske hidroksilacije položaj 4' prstena B, ali da je hidroksilacija moguća i na drugim položajima u strukturi flavona. Obzirom na vrlo nisku katalitičku učinkovitost hidroksilacije flavona (najniža od ispitanih reakcija), čini se da je supstitucija funkcionalnim skupinama u strukturi flavona važna za njihov metabolizam posredovan humanim citokromima P450. *O*-Demetilacija metoksilne skupine kod flavona preferirana je na položaju 4' prstena B, dok je na primjeru tangeretina vidljivo da je moguća i

na prstenu A. Dominantni enzim odgovoran za primijećene metaboličke reakcije flavona je CYP1A2. Iako je iz ove skupine ispitano najviše predstavnika u odnosu na ostale skupine, njih čak 11, i dalje se to čini premalim uzorkom za bilo kakvu daljnju opću karakterizaciju oksidativnog metabolizma flavona posredovanog humanim citokromima P450.

5.2 Oksidativni metabolizam flavonola

U ovom je radu ispitano 10 flavonoida koji pripadaju skupini flavonola. Za njih sedam (galangin, izoramnetin, kemferol, kvercetin, miricetin, morin i tamariksetin) u literaturi je moguće pronaći radove koji opisuju istraživanje metabolizma posredovanog citokromima P450. Za preostala tri ispitana flavonoida iz ove skupine (3,6-dihidroksiflavon, 3,7-dihidroksiflavon i ramnetin) u ovom su radu prvi puta opisani rezultati metabolizma posredovanog citokromima P450. Metabolizam posredovan humanim jetrenim citokromima P450 u uvjetima eksperimenta opisanog u ovom radu nije zabilježen za sljedeće flavonole: 3,6-dihidroksiflavon, izoramnetin, kvercetin, miricetin, morin, ramnetin i tamariksetin. Ovakav rezultat slaže se s već objavljenim istraživanjem Nielsena i suradnika [38] koji su također utvrdili izostanak metabolizma izoramnetina, kvercetina, miricetina i morina u inkubacijama sa štakorskim citokromima P450. Ovo je ujedno i jedino dosad objavljeno istraživanje oksidativnog metabolizma posredovanog citokromima P450 za navedene flavonoide. Jedino se za tamariksetin ne slažu literaturni podaci s rezultatima ovog istraživanja u kojem u inkubacijama tamariksetina s HLM-om nije zabilježen metabolizam. U uvodu je već opisano da su Neilsen i suradnici [38] te Breinholt i suradnici [39] utvrdili metaboličku pretvorbu tamariksetina u kvercetin demetilacijom na položaju 4' prstena B i da je glavni enzim odgovoran za tu pretvorbu bio CYP1A2. Uspoređujući samo sustave s HLM-om i rekombinantnim citokromima P450, očito je da su Breinholt i suradnici [39] koristili znatno veću (i do 30 puta veću) koncentraciju čistog enzima u odnosu na inkubacije u ovom istraživanju, dok koncentraciju enzima u inkubacijama s HLM-om nije moguće usporediti jer autori nisu dali taj podatak. Budući da su koncentracije flavonoida bile podjednake u oba istraživanja, mogući uzrok različitom rezultatu je različita koncentracija enzima korištena u inkubacijama.

5.2.1 3,7-Dihidroksiflavon

Inkubacijama s pojedinačnim rekombinantnim citokromima P450 utvrđeno je da je za metabolizam 3,7-dihiroksiflavona odgovoran enzim CYP1A2. Ovaj enzim jedini je od ispitanih djelovao na metaboličku pretvorbu 3,7-dihidroksiflavona, ali nije katalizirao glavnu

metaboličku reakciju aromatske hidroksilacije na položaju 4' prstena B primijećenu u eksperimentu s HLM-om (slika 17), nego sekundarnu reakciju hidroksilacije na prstenu A na položaju 6 ili 8, pri čemu je nastao kao jedini metabolit 3,6,7-trihidroksiflavon ili 3,7,8-trihidroksiflavon. Glavnu metaboličku pretvorbu 3,7-dihiroksiflavona u 3,7,4'-trihidroksiflavon nije katalizirao nijedan od ispitanih enzima. Tek su rezultati inhibicija sa specifičnim inhibitorima citokroma P450 ukazali da je među ispitanim enzimima CYP2E1 jedini bio značajan za kataliziranje ove reakcije, a iz ustanovljenog opsega inhibicije od 80% proizlazi da je ujedno i najznačajniji za ovu metaboličku pretvorbu. Rezultati metabolizma 3,7-dihidroksiflavona posebno su zanimljivi iz razloga što je ovo jedini primjer u kojem je utvrđeno da čisti enzim (CYP1A2) katalizira sekundarnu reakciju u većem obimu i znatno većom katalitičkom učinkovitošću u odnosu na glavnu reakciju kataliziranu HLM-om (tablica 12).

Tablica 12. Usporedba parametara enzimske kinetike metaboličkih reakcija 3,7-dihidroksiflavona posredovanih humanim jetrenim citokromima P450.

Supstrat	**Produkt**	**Reakcija**	**Enzim**	k_{cat} [pM min^{-1} pM^{-1} CYP-a]	K_m [μM]	k_{cat}/K_m [10^6 M^{-1} min^{-1}]
3,7-dihidroksiflavon	3,6,7-trihidroksiflavon ili 3,7,8-trihidroksiflavon	hidroksilacija	CYP1A2	6,1 ± 0,7	4,2 ± 2,6	1,5 ± 0,9
3,7-dihidroksiflavon	3,7,4'-trihidroksiflavon	hidroksilacija	HLM	5,9 ± 1,1	492 ± 163	0,012 ± 0,005

Na osobit se način ističe velika razlika u vrijednosti parametra K_m, koja je oko 100 puta niža za reakciju s čistim enzimom, sugerirajući veliku razliku u afinitetima enzima prema istom supstratu. Obzirom na tako veliku razliku u afinitetima prema istom supstratu, za pretpostaviti je da ove dvije reakcije kataliziraju različiti enzimi. Ispitivanja inhibicija to su i potvrdila kako je gore objašnjeno. Dodatna zanimljivost koja proizlazi na temelju ovih rezultata je činjenica da je metabolička reakcija koju je katalizirao CYP1A2 u inkubacijama s HLM-om bila suprimirana u uvjetima eksperimenta. U uvjetima visoke koncentracije flavonoida u inkubacijama s HLM-om, u ovom slučaju 200 μM, te uz očekivanu podjednaku ekspresiju CYP1A2 i CYP2E1, na temelju utvrđenih kinetičkih parametara bilo bi za očekivati da će se reakcija s većom katalitičkom specifičnošću (k_{cat}/K_m) zbivati u većem obimu. No, treba

napomenuti da podaci o ekspresiji pojedinih citokroma P450 u jetri dosta variraju u ovisnosti o izvoru, ali i o analitičkoj tehnici određivanja, čak i kada su određivane u pulovima od više desetaka donora [15]. Stoga, iako je u ovom istraživanju korišten pul humanih jetrenih mikrosoma od 10 različitih donora, stvarni podatak o ekspresiji pojedinih enzima nije poznat, pa ove podatke o ekspresiji treba uzeti s rezervom. Mogućnost da je CYP1A2 slabije eksprimiran u HLM-u korištenom u ovom radu ostavlja i podatak da su izuzev reakcije naringenin → eriodiktiol, za sve druge reakcije za koje je utvrđeno da ih katalizira CYP1A2 razlike u utvrđenoj brzini reakcije (k_{cat}) bile i više od 10 puta u korist čistog enzima u odnosu na HLM. Zbog načina računanja koncentracije enzima u HLM-u, pri kojem je nepoznat udio pojedinačnih citokroma P450, već samo ukupna koncentracija svih citokroma P450 u uzroku, za očekivati je da će brzine reakcije biti više kod čistih enzima, no ipak za bilo kakvu procjenu bilo bi potrebno usporediti niz reakcija koje kataliziraju oba enzima CYP1A2 i CYP2E1 s vrijednostima kinetičkih parametara istih reakcija koje katalizira HLM. A da su razlike u opaženim aktivnostima enzima moguće između inkubacija s HLM-om, odnosno s čistim enzimom potvrđuje i jedan primjer opisan u radu Breinholta i suradnika [45] u kojem je primijećen nastanak različitih metabolita u inkubacijama tangeretina s HLM-om i čistim rekombinantnim CYP3A4. Autori su tu razliku objasnili mogućim aktiviranjem metaboličkih putova niskog afiniteta što dovodi do nastanka metabolita koji nisu primijećeni u inkubacijama s HLM-om koji sadrže i druge citokrome P450 za koje tangeretin ima puno veći afinitet. Ipak, treba napomenuti da je ovo objašnjenje čisto teoretsko razmatranje te da nije potkrijepljeno nikakvim kinetičkim podacima, budući da autori nisu ispitali kinetike opisanih reakcija. I na kraju, iako je obim ekspresije mogući uzrok, ostaje nejasno zbog čega je metabolička reakcija koju je katalizirao CYP1A2 u inkubacijama s HLM-om bila suprimirana u ovom istraživanju. Razmatranje oksidativnog metabolizma 3,7-dihidroksiflavona posredovanog humanim citokromima P450 valja zaključiti činjenicom da nikakav metabolizam za ovaj flavonoid dosad nije opisan u dostupnoj literaturi, stoga su rezultati dobiveni u ovom radu prvi poznati podaci o njegovom metabolizmu uopće.

5.2.2 Galangin

Rezultati ovog istraživanja ukazuju na to da je oksidativni metabolizam galangina karakteriziran jednom metaboličkom reakcijom u kojoj nastaje jedan metabolit kemferol. Riječ je o reakciji aromatske hidroksilacije koja se shematski može prikazati na slijedeći način: galangin → kemferol (slika 29). Ovu reakciju kataliziraju enzimi HLM-a te CYP2C19 i CYP2D6. U uvjetima eksperimenta su u inkubacijama s čistim enzimom nastale male

količine kemferola, znatno manje u odnosu na eksperiment s HLM-om. Kinetički parametri utvrđeni za te metaboličke reakcije jasno potvrđuju ovu razliku te ukazuju na veću katalitičku učinkovitost metaboličke reakcije posredovane HLM-om u odnosu na čiste enzime (tablica 13).

Tablica 13. Usporedba parametara enzimske kinetike metaboličkih reakcija galangina posredovanih humanim jetrenim citokromima P450.

Supstrat	**Produkt**	**Reakcija**	**Enzim**	k_{cat} [pM min^{-1} pM^{-1} CYP-a]	K_m [μM]	k_{cat}/K_m [10^6 M^{-1} min^{-1}]
galangin	kemferol + kvercetin	hidroksilacija	HLM	3,3 ± 0,5	31,6 ± 16,0	0,11 ± 0,06
galangin	kemferol	hidroksilacija	CYP2C19	0,022 ± 0,003	5,4 ± 1,4	0,004 ± 0,001

U inkubacijama s HLM-om reakcija se zbivala i u znatno većem obimu, čak je u inkubacijama za enzimsku kinetiku reakcija aromatske hidroksilacije išla sve do kvercetina sugerirajući dvostruku, distributivnu hidroksilaciju na prstenu B. Dvostruka hidroksilacija nije primijećena u eksperimentu s čistim enzimima. Uz reakciju naringenin → eriodiktiol, ovo je jedina reakcija čija je katalitička učinkovitost bila znatno manja u inkubacijama s čistim enzimima u usporedbi s HLM-om. U raspravi o metabolizmu 3,7-dihidroksiflavona dotaknuto je pitanje razlike kinetičkih parametara između ova dva *in vitro* sustava za ispitivanje oksidativnog metabolizma posredovanog humanim citokromima P450. Konstatirano je da bi u teoriji katalitičke učinkovitosti trebale biti veće u sustavu s čistim enzimom, a dobiveni rezultati su to uvelike i potvrdili. No, već spomenute dvije reakcije predstavljaju iznimku, što sugerira da citokrom P450 koji dominantno katalizira ove metaboličke reakcije najvjerojatnije nije među ispitanima. Drugim riječima, za galangin se može konstatirati da je metabolička pretvorba u kemferol katalizirana enzimima CYP2C19 i CYP2D6 sekundarni put oksidativnog metabolizma galangina, dok je enzim koji dominantno katalizira ovu reakciju ostao nepoznat. Rezultat metabolizma galangina dobiven u ovom isptraživanju slaže se s literaturnim podacima u pogledu reakcije koju kataliziraju humani jetreni citokromi P450 u kojoj kao glavni metabolit nastaje kemferol, no ne i u pogledu enzima odgovornih za katalizu ove reakcije. I dok su Otake i Walle [47] pronašli da je dominantnu ulogu u ovoj metaboličkoj pretvorbi imao CYP1A2, a da je određenu ulogu imao i CYP2C9, ovo istraživanje je pokazalo da navedeni enzimi ne metabloziraju galangin u uvjetima eksperimenta, te da su sekundarni

enzimi odgovorni za primijećeni metabolizam galangina CYP2C19 i CYP2D6. Dominantni enzim odgovoran za ovu metaboličku reakciju nije pronađen, a utvrđeno je da se ne radi o CYP1A2, CYP2A6, CYP2C8, CYP2C9 ili CYP3A4. Na temelju malih razlika u uvjetima eksperimenta u ova dva istraživanja, nije moguće pronaći jasno objašnjenje za primijećenu razliku. Otake i Walle [47] metabolizam galangina ispitali su u ovom eksperimentu s tri relevantna rekombinantna čista enzima CYP1A2, CYP2C9 i CYP3A4. Iako su ustvrdili da glavnu ulogu ima CYP1A2, na temelju rezultata inhibicija specifičnim inhibitorima gdje je metabolizam posredovan HLM-om bio inhibiran svega 40% sa specifičnim inhibitorom za CYP1A2, autori su konstatirali da bi i drugi specifični citokromi P450 mogli biti uključeni u ovaj metabolizam. Slično tome, velika razlika u obimu metabolizma koju jasno opisuju kinetički parametri određeni za primijećene reakcije galangina u ovom istraživanju (tablica 13), također upućuje na drugi specifični enzim iz porodice citokroma P450 koji bi mogao dominantno biti odgovoran za metabolizam galangina. Ovo razmatranje upućuje na zaključak da su za metabolizam galangina posredovan humanim citokromima P450 u određenoj mjeri odgovorni enzimi CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19 i CYP2D6, no da je enzim dominantno odgovoran za metabolizam galangina i dalje nepoznat. Parametri enzimske kinetike metaboličkih reakcija galangina posredovanih humanim jetrenim citokromima P450 određeni u ovom istraživanju prvi su poznati podaci ove vrste objavljeni za galangin.

5.2.3 Kemferol

Rezultati ovog istraživanja ukazuju na to da je oksidativni metabolizam kemferola karakteriziran jednom metaboličkom reakcijom u kojoj nastaje metabolit kvercetin. Riječ je o reakciji aromatske hidroksilacije na položaju 3' prstena B, a koja se shematski može prikazati na slijedeći način: kemferol → kvercetin (slika 35). Ovu metaboličku pretvorbu katalizirali su enzimi HLM-a i CYP1A2. Vrijednost k_{cat}/K_m od 0,024 × 10^6 M^{-1} min^{-1} za reakciju kataliziranu uz HLM-om spada među niže vrijednosti među analiziranim flavonoidima, sugerirajući relativno slabu katalitičku učinkovitost ove metaboličke reakcije. U inkubacijama s rekombinantnim CYP1A2 reakcija je bila toliko spora da kinetički parametri nisu niti mogli biti određeni. Metabolizam kemferola dosad je u literaturi opisan jedino u radu Breinholta i suradnika [39], a rezultati ovog istraživanja u potpunosti se slažu s rezultatima njihovog rada. U ovom su pak istraživanju po prvi puta određeni i kinetički parametri metabolizma kemferola posredovanog humanim jetrenim citokromima P450.

5.2.4 Opće karakteristike oksidativnog metabolizma flavonola

Teško je na temelju dobivenih rezultata za flavonole ispitane u ovom radu generalizirati opće karakteristike njihovog oksidativnog metabolizma, jer se čini da je 10 predstavnika ove skupine spojeva i dalje premali uzorak za dobivanje sveobuhvatnih podataka. Slično kao i kod flavona, kod flavonola je aromatska hidroksilacija katalizirana humanim jetrenim citokromima P450 na prstenu B na položajima 3' i 4', s tim da je položaj 4' preferiran na nesupstituiranom prstenu B. Ipak, na primjeru metabolizma 3,7-dihidroksiflavona vidljivo je da je hidroksilacija također moguća i na prstenu A i to na položajima 6 i 8, s tim da je položaj 6 preferiran u odnosu na položaj 8. Prisutnost dvije ili više hidroksilnih skupina na prstenu B flavonola čini se da sprječava daljnji metabolizam posredovan humanim jetrenim citokromima P450. Iako je ispitano nekoliko jednostruko metiliranih predstavnika flavonola, *O*-demetilacija nije primijećena u ovoj flavonoidnoj skupini spojeva. Ovo se odnosi i na tamariksetin za kojega je u literaturi opisana demetilacija na položaju 4' kako je već ranije opisano na početku rasprave o metabolizmu flavonola. Enzim koji je dominantno odgovoran za primijećeni metabolizam flavonola je CYP1A2, s tim da njegova uloga nije izražena u toj mjeri kao što je slučaj kod flavona, dok je na primjeru 3,7-dihidroksiflavona pokazano da neki drugi specifični citokromi P450 (npr. CYP2E1) imaju i važniju ulogu u njegovom metabolizmu.

5.3 Oksidativni metabolizam izoflavona

U ovom su istraživanju ispitana svega dva predstavnika izoflavona: genistein i prunetin. Za oba je flavonoida oksidativni metabolizam posredovan humanim citokromima P450 opisan u literaturi, a osobito dobro dokumentiran za genistein. U ovom je istraživanju metabolizam genisteina i prunetina posredovan humanim jetrenim citokromima P450 potvrđen, a detalji dobivenih rezultata detaljnije će biti raspravljeni u nastavku.

5.3.1 Genistein

Rezultati ovog istraživanja ukazuju na to da je oksidativni metabolizam genisteina karakteriziran jednom metaboličkom reakcijom u kojoj nastaje jedan metabolit orobol. Riječ je o reakciji aromatske hidroksilacije na položaju 3' prstena B, a koja se shematski može prikazati na slijedeći način: genistein → orobol (slika 31). Ovu reakciju kataliziraju enzimi HLM-a, a budući da nastaje manje od 10% (*m*/*m*) metabolita u odnosu na koncentraciju supstrata, metabolizam genisteina nije dalje karakteriziran. Rezultati dobiveni u ovom istraživanju slažu se s ranije objavljenima u literaturi. Oksidativni metabolizam genisteina

posredovan humanim citokromima P450 možda je i najbolje opisan za neki od flavonoida, a detaljni pregled dan je u uvodnom poglavlju ovoga rada. Kumulativno je pronađeno pet produkata oksidativnog metabolizma genisteina, a tri su i identificirana – sve produkti aromatske hidroksilacije na položaju 6 i 8 prstena A, te na položaju 3' prstena B izoflavonskog skeleta. Iako se obim i profil metabolita ponešto razlikovao među objavljenim radovima, opći je zaključak da je glavni metabolički put metabolizma genisteina posredovanog humanim citokromima P450 aromatska hidroksilacija na položaju 3' prstena B pri čemu nastaje orobol. Rezultati istraživanja potvrđuju ovaj zaključak i glavni put metabolizma genisteina posredovanog humanim jetrenim citokromima P450.

5.3.2 Prunetin

Rezultati istraživanja ukazuju na to da je oksidativni metabolizam prunetina karakteriziran je s tri metaboličke reakcije u kojoj nastaju sljedeći metaboliti: genistein, 6-hidroksiprunetin ili 8-hidroksiprunetin i 3'-hidroksiprunetin (poznat pod nazivom santal). Najveća količinska zastupljenost genisteina upućuje na zaključak da je *O*-demetilacija donekle preferirani metabolički put pretvorbe prunetina djelovanjem citokroma P450. Međutim, treba naglasiti da su nađene količine preostala dva hidroksilirana produkta bile približno jednake ili tek nešto manje u odnosu na genistein, prema tome, ne može se govoriti o demetilaciji kao dominantnom metaboličkom putu za prunetin, već se sve tri mogućnosti trebaju uzeti u obzir pri razmatranju. Sve tri reakcije kataliziraju enzimi HLM-a, a budući da nastaje manje od 10% (*m*/*m*) metabolita u odnosu na koncentraciju supstrata, metabolizam prunetina nije dalje karakteriziran. Rezultati dobiveni u ovom istraživanju slažu se s ranije objavljenim istraživanjem Hua i suradnika [51] koji su jedini dosada opisali oksidativni metabolizam prunetina. Hu i suradnici [51] opisali su primijećenu metaboličku reakciju kao vrlo brzu pretvorbu prunetina u genistein, no istovremeno nisu primijetili nijedan drugi metabolički put razgradnje prunetina. Najveća razlika između dva istraživanja je i opet bila u koncentraciji enzima u inkubacijama, gdje su znatno veće koncentracije (oko 3 puta veće u eksperimentu s HLM-om) koristili Hu i suradnici [51] u odnosu na koncentracije korištene u ovom istraživanju. To bi moglo objasniti razliku u opaženoj brzini reakcije demetilacije prunetina, ali ne i neopažanje drugih metaboličkih puteva u radu Hua i suradnika [51]. Fokus njihovog istraživanja je bio na metiliranim predstavnicima izoflavona i njihovoj pretvorbi u nemetilirane analoge genistein i daidzein. Možda je to bio razlog da je *O*-demetilacija opisana kao jedina primijećena metabolička reakcija prunetina u njihovom radu.

5.3.3 Opće karakteristike oksidativnog metabolizma izoflavona

Uzorak ispitanih predstavnika skupine izoflavona u ovom istraživanju premalen je da bi se mogli izvlačiti opći zaključci o njihovom oksidativnom metabolizmu posredovanom humanim jetrenim citokromima P450, ali može se istaknuti dobro slaganje rezultata s već objavljenim podacima za genistein i prunetin. Isto tako, primijećena aromatska hidroksilacija na položaju 3' prstena B genisteina i prunetina dobro se uklapa u sveukupne rezultate za ispitane flavonoide, osobito za flavone – skupinu strukturno najbliskiju izoflavonima. Tako je hidroksilacija prstena B izoflavona preferirana u položaju 3', ako je u strukturi već prisutna hidroksilna skupina na položaju 4'. Na primjeru prunetina pokazano je da je *O*-demetilacija moguća na položaju 7 prstena A, te da je aromatska hidroksilacija moguća na prstenu A izoflavonskog skeleta.

5.4 Oksidativni metabolizam flavanona

U ovom je radu ispitano šest flavonoida koji pripadaju skupini flavanona. Samo je za hesperetin i naringenin u literaturi moguće pronaći radove koji opisuju istraživanje metabolizma posredovanog citokromima P450. Za preostala četiri ispitana flavonoida iz ove skupine (flavanon, pinocembrin, pinocembrin-7-metileter i sakuranetin) u ovom su radu prvi puta opisani rezultati metabolizma posredovanog citokromima P450. Metabolizam posredovan humanim jetrenim citokromima P450 u uvjetima eksperimenta opisanog u ovom radu nije zabilježen za sljedeće flavanone: flavanon, pinocembrin i pinocembrin-7-metileter.

5.4.1 Hesperetin

Rezultati ovog istraživanja ukazuju na to da je oksidativni metabolizam hesperetina karakteriziran jednom metaboličkom reakcijom u kojoj nastaje jedan metabolit eriodiktiol. Riječ je o reakciji *O*-demetilacije na položaju 4' prstena B, a koja se shematski može prikazati na slijedeći način: hesperetin → eriodiktiol (slika 33). Ovu reakciju kataliziraju enzimi HLM-a, a budući da nastaje manje od 10% (*m*/*m*) metabolita u odnosu na koncentraciju supstrata, metabolizam hesperetina nije dalje karakteriziran. Rezultati dobiveni u ovom istraživanju slažu se s ranije objavljenima u radovima Nielsena i suradnika [38] te Breinholta i suradnika [39] koji su u inkubacijama s jetrenim mikrosomoma štakora, odnosno HLM-om i rekombinantnim CYP1A2 pokazali je da je glavni put metabolizma hesperetina bio istovjetan predloženom u ovom istraživanju. Ova grupa autora dodatno je utvrdila da CYP2C9, CYP2D6 i CYP3A4 nisu odgovorni za ovu reakciju, te da glavnu ulogu u oksidativnom metabolizmu hesperetina ima CYP1A2. Izostanak metabolizma hesperetina u eksperimentu

kojeg su proveli Doostdar i suradnici [54], a koji je najvjerojatnije posljedica premale koncentracije flavonoida u inkubacijskim smjesama (najviše 1,5 μM), dodatno je opovrgnut rezultatima ovog istraživanja, te ga u razmatranju ne treba uzeti u obzir.

5.4.2 Naringenin

Rezultati ovog istraživanja ukazuju na to da je oksidativni metabolizam naringenina karakteriziran jednom metaboličkom reakcijom u kojoj nastaje jedan metabolit eriodiktiol. Riječ je o reakciji aromatske hidroksilacije na položaju 3' prstena B koja se shematski može prikazati na slijedeći način: naringenin → eriodiktiol (slika 39). Ovu reakciju kataliziraju enzimi HLM-a te CYP1A2. U uvjetima eksperimenta su u inkubacijama s čistim enzimom nastale male količine eriodiktiola, znatno manje u odnosu na eksperiment s HLM-om. Kinetički parametri utvrđeni za te metaboličke reakcije jasno potvrđuju ovu razliku te ukazuju na veću katalitičku učinkovitost metaboličke reakcije posredovane HLM-om u odnosu na čisti enzim (tablica 14).

Tablica 14. Usporedba parametara enzimske kinetike metaboličkih reakcija galangina posredovanih humanim jetrenim citokromima P450.

Supstrat	**Produkt**	**Reakcija**	**Enzim**	k_{cat} [pM min^{-1} pM^{-1} CYP-a]	K_m [μM]	k_{cat}/K_m [10^6 M^{-1} min^{-1}]
naringenin	eriodiktiol	hidroksilacija	HLM	1,1 ± 0,2	45,2 ± 14,9	0,025 ± 0,009
naringenin	eriodiktiol	hidroksilacija	CYP1A2	0,021 ± 0,003	7,3 ± 5,6	0,003 ± 0,002

U inkubacijama s HLM-om reakcija se zbivala i u znatno većem obimu, a i vrijednosti K_m dosta se razlikuju. Uz reakciju galangin → kemferol, ovo je jedina reakcija čija je katalitička učinkovitost bila znatno manja u inkubacijama s čistim enzimima u usporedbi s HLM-om. U raspravi o metabolizmu 3,7-dihidroksiflavona dotaknuto je pitanje razlike kinetičkih parametara između ova dva *in vitro* sustava za ispitivanje oksidativnog metabolizma posredovanog humanim citokromima P450. Konstatirano je da bi u teoriji katalitičke učinkovitosti trebale biti veće u sustavu s čistim enzimom, a dobiveni rezultati su to uvelike i potvrdili. No, već spomenute dvije reakcije predstavljaju iznimku, što sugerira da citokrom P450 koji dominantno katalizira ove metaboličke reakcije najvjerojatnije nije među ispitanima. Drugim riječima, za naringenin se može konstatirati da je metabolička pretvorba u

eriodiktiol katalizirana enzimom CYP1A2 sekundarni put oksidativnog metabolizma naringenina, dok je enzim koji dominantno katalizira ovu reakciju ostao nepoznat. Rezultat metabolizma naringenina dobiven u ovom istraživanju slaže se s literaturnim podacima u pogledu reakcije koju kataliziraju humani jetreni citokromi P450 u kojoj kao glavni metabolit nastaje eriodiktiol. Zaključci u pogledu specifičnih enzima citokroma P450 dominantno odgovornih za katalizu ove reakcije ipak se u određenoj mjeri razlikuju u odnosu na objavljena istraživanja. I dok su Breinholt i suradnici [39] pronašli da je dominantnu ulogu u ovoj metaboličkoj pretvorbi imao CYP1A2, a da je određenu ulogu imao i CYP3A4, ovo istraživanje je pokazalo da CYP3A4 ne metabolizira naringenin u uvjetima eksperimenta, te da je CYP1A2 tek sekundarni enzim odgovoran za primijećeni metabolizam naringenina. Dominantni enzim odgovoran za ovu metaboličku reakciju nije pronađen, a utvrđeno je da se ne radi o CYP1A2, CYP2A6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 ili CYP3A4. Parametri enzimske kinetike metaboličkih reakcija naringenina posredovanih humanim jetrenim citokromima P450 određeni u ovom istraživanju prvi su poznati podaci ove vrste objavljeni za naringenin.

5.4.3 Sakuranetin

Rezultati ovog istraživanja upućuju na postojanje dva metabolička puta razgradnje sakuranetina djelovanjem humanih jetrenih citokroma P450, pri čemu je detektirano nastajanje tri metabolita. Predložena shema oksidativnog metabolizma sakuranetina prikazana je na slici 43, a može se sažeto napisati kao sakuranetin → naringenin + eriodiktiol + 5,3',4'-trihidroksi-7-metoksiflavanon. Kinetički parametri primijećenih reakcija i obim nastalih metabolita ukazuju na to da je *O*-demetilacija sakuranetina preferirani put metabolizma posredovanog humanim jetrenim citokromima P450. Naime, utvrđeno je da je naringenin količinski najzastupljeniji metabolit nastao u inkubacijama s HLM-om, a katalitička učinkovitost prestpostavljene distributivne reakcije sakuranetin → naringenin + eriodiktiol ($0{,}020 \times 10^6$ M^{-1} min^{-1}) višestruko nadmašuje katalitičku učinkovitost metaboličkog puta aromatske hidroksilacije u reakciji sakuranetin → 5,3',4'-trihidroksi-7-metoksiflavanon ($0{,}0022 \times 10^6$ M^{-1} min^{-1}). Eksperiment s čistim enzimima citokromima P450 pružio je određeni uvid u specifične enzime odgovorne za primijećeni metabolizam sakuranetina. Inkubacijama s pojedinačnim rekombinantnim citokromima P450 utvrđeno je da su među ispitanim enzimima za metabolizam sakuranetina odgovorni enzimi CYP1A2 i CYP3A4. U inkubacijama s CYP1A2 detektirana su dva metabolita: 5,3',4'-trihidroksi-7-metoksiflavanon i naringenin. Pronalazak ova dva metabolita upućuje na zaključak da CYP1A2 katalizira

pretvorbu sakuranetina i putem *O*-demetilacije i putem aromatske hidroksilacije kako je utvrđeno eksperimentom s HLM-om, no njihovi omjeri sugeriraju da je za razliku od eksperimenta s HLM-om, uz čisti enzim CYP1A2 preferirana aromatska hidroksilacija sakuranetina na položaju 3' prstena B u odnosu na *O*-demetilaciju na položaju 7 prstena A. To potvrđuju i rezultati enzimske kinetike ovih reakcija s katalitičkom učinkovitošću većom i do 30 puta za reakciju hidroksilacije sakuranetina kataliziranu čistim enzimom u usporedbi s reakcijom *O*-demetilacije kataliziranu HLM-om. U inkubacijama s CYP3A4 također su detektirana dva metabolita: opet 5,3',4'-trihidroksi-7-metoksiflavanon i nepoznati spoj razlike u masi od –2,0155 Da u odnosu na supstrat sakuranetin i molekulske formule $C_{16}H_{12}O_5$. Štoviše, ovo je bio dominantan produkt metabolizma u inkubacijama s CYP3A4, dok je 3'-hidroksilirani derivat sakuranetina nastao u nešto manjoj količini. Ovakav rezultat upućuje na zaključak da je uz CYP3A4 slično kao i uz CYP1A2 preferirana aromatska hidroksilacija sakuranetina na položaju 3' prstena B u odnosu na *O*-demetilaciju na položaju 7 prstena A, koja uz CYP3A4 nije uopće katalizirana. Ipak glavni put metaboličke pretvorbe sakuranetina uz CYP3A4 ostaje nerazjašnjen zbog nemogućnosti identifikacije nepoznatog metabolita. Ovaj je metabolit pronađen i u inkubacijama s HLM-om, ali u znatno manjim količinama u usporedbi s ostalim metabolitima, što upućuje na zaključak da ovaj treći metabolički put razgradnje sakuranetina djelovanjem humanih citokroma P450 najmanje doprinosi njegovom ukupnom oksidativnom metabolizmu. Distributivnu aromatsku hidroksilaciju naringenina, primarnog metabolita iz eksperimenta s HLM-om, i njegovu pretvorbu u eriodiktiol nije katalizirao nijedan od ispitanih enzima. Stoga je proveden eksperiment inhibicija sa specifičnim inhibitorima citokroma P450 kako bi se pokušao utvrditi specifični enzim odgovoran za glavni metabolički put oksidativne razgradnje sakuranetina. Na temelju tih rezultata može se zaključiti da je među ispitanim citokromima P450 enzim CYP2E1 jedini bio značajan za kataliziranje promatrane reakcije sakuranetin → naringenin → eriodiktiol, iako opseg inhibicije od 50% ostavlja mogućnost da postoje i drugi citokromi P450 koji bi mogli biti u određenoj mjeri odgovorni za ovu metaboličku pretvorbu. Metabolizam sakuranetina dosad nije opisan u dostupnoj literaturi, stoga su rezultati dobiveni u ovom radu prvi poznati podaci o njegovom metabolizmu.

5.4.4 Opće karakteristike oksidativnog metabolizma flavanona

Uzorak ispitanih predstavnika skupine flavanona u ovom istraživanju premalen je da bi se mogli izvlačiti opći zaključci o njihovom oksidativnom metabolizmu posredovanom humanim jetrenim citokromima P450, ali može se istaknuti dobro slaganje rezultata s već

objavljenim podacima za hesperetin i naringenin. Isto tako, primijećena aromatska hidroksilacija na položaju 3' prstena B naringenina i sakuranetina dobro se uklapa u sveukupne rezultate za ispitane flavonoide. Tako je hidroksilacija prstena B flavanona preferirana u položaju 3', ako je u strukturi već prisutna hidroksilna skupina na položaju 4'. Važnost ove hidroksilne skupine za oksidativni metabolizam flavanona dodatno je potencirana izostankom metabolizma kod flavanona, pinocembrina i pinocembrin-7-metiletera koji imaju nesupstituirani prsten B. Na primjeru hesperetina i sakuranetina pokazano je da je *O*-demetilacija moguća na položaju 4' prstena B, odnosno na položaju 7 prstena A. Enzim koji je dominantno odgovoran za primijećeni metabolizam flavanona je CYP1A2, s tim da njegova uloga nije izražena u toj mjeri kao što je slučaj kod flavona, dok je na primjeru sakuranetina i naringenina pokazano da i neki drugi specifični citokromi P450 (npr. CYP2E1 i CYP3A4) imaju važnu ulogu u njihovom metabolizmu.

5.5 Opće karakteristike oksidativnog metabolizma flavonoidnih aglikona

Iako je ispitano 30 predstavnika flavonoida i iako su u svrhu dobivanja što homogenijeg seta uzoraka odabrani samo flavonoidni aglikoni, zbog visoke slektivnosti humanih citokroma P450 prema ovoj skupini spojeva i dalje se čini da je to premali uzorak za dobivanje sveobuhvatnih podataka i izradu dobrih prediktivnih modela za statističku procjenu povezanosti specifičnih strukturnih obilježja povezanih s primijećenim metaboličkim značajkama. Ipak je na temelju dobivenih rezultata u ovom radu moguće izvući neke opće karakteristike njihovog oksidativnog metabolizma i opisati ih u obliku zapažanja, a neke od njih su potvrđene i statističkom analizom postavljenih prediktivnih modela (vidi poglavlje 4.8.1). Ta su zapažanja već opisana za svaku od ispitanih podskupina flavonoida, a u nastavku je dan svojevrsni presjek tih općih karakteristika oksidativnog metabolizma koje vrijede za široku skupinu spojeva flavonoidnih aglikona.

Glavne metaboličke reakcije flavonoidnih aglikona uzrokovane djelovanjem humanih enzima citokroma P450 jesu aromatska hidroksilacija i *O*-demetilacija. Aromatska hidroksilacija preferirana je na položaju 4' prstena B, te također na položaju 3' prstena B, ako je u strukturi već prisutna hidroksilna skupina na položaju 4'. Na nesupstituiranom prstenu B, preferirano mjesto hidroksilacije je 4'. Aromatska hidroksilacija moguća je i na položajima 6 i 8 prstena A, s tim da je položaj 6 preferiran u odnosu na položaj 8. Prisutnost dvije ili više hidroksilnih skupina na prstenu B čini se da sprječava daljnji metabolizam flavonoidnih aglikona posredovan humanim citokromima P450. Ovom zaključku dodatno ide u prilog rezultat

statističke analize utjecaja fizikalno-kemijskih svojstava na karakteristike metabolizma ispitanih flavonoida posredovanog citokromom P450 1A2, kojom je utvrđeno da povećanje polarne površine flavonoida usporava njihov metabolizam. Ovaj rezultat je u skladu i s općim karakteristikama reakcija posredovanih citokromima P450 i njihovom preferencijom prema lipofilnijim supstratima. *O*-Demetilacija metoksilne skupine kod flavonoidnih aglikona preferirana je na položaju 4' prstena B, a moguća je i na prstenu A. Specifični enzim koji je dominantno odgovoran za primijećeni metabolizam flavonoidnih aglikona je CYP1A2.

Na temelju statističke analize postavljenih prediktivnih modela (vidi poglavlje 4.8.1) određene su i opće strukturne značajke koje određuju hoće li odabrani flavonoidni aglikon biti metaboliziran citokromima P450. Nađeno je da su tri supstituenta u strukturi odabranih flavonoida statistički značajno korelirana s metabolizmom posredovanim citokromima P450: prisutnost 4'-metoksilne skupine (80%), odsutnost 3'-hidroksilne skupine (29%) i odsutnost 3-hidroksilne skupine (30%). Također su sa statističkom značajnošću utvrđene i neke strukturne značajke koje se odnose na položaj zbivanja metaboličke pretvorbe flavonoidnog aglikona katalizirane citokromom P450 1A2. Utvrđeno je da je demetilacija metoksilne skupine preferirana na položaju 4' prstena B, dok isto ne vrijedi za demetilaciju metoksilne skupine na položaju 7 prstena A. Prisutnost hidroksilne skupine na položaju 4' prstena B snažno utječe na dodatnu hidroksilaciju na položaju 3' prstena B. Prisutnost hidroksilne skupine na položaju 5 ili na položaju 6 prstena A ne pogoduje hidroksilaciji na položaju 4' prstena B, a prisutnost hidroksilne skupine na položaju 5 prstena A također ne pogoduje hidroksilaciji na položaju 6 istog prstena. Sličan negativan utjecaj 5-hidroksilne skupine također je utvrđen za hidroksilaciju na položajima 7 i 8, ali zbog malog uzorka nije statistički značajan. Općenito vrijedi da CYP1A2 preferira lipofilnije flavonoide koji na položaju 4' imaju supstituiranu hidroksilnu ili metoksilnu skupinu i nisu supstituirani na položaju 5 prstena A.

Ovaj pokušaj opisa općih karakteristika oksidativnog metabolizma flavonoida prvi je poznati takav opis koji se odnosi isključivo na humane citokrome P450 i prvi koji je u određenoj mjeri temeljen na postavljenim prediktivnim statističkim modelima. Najopsežniji opći prikaz oksidativnog metabolizma flavonoida dosada u literaturi nalazimo u preglednom radu Xiaoa i Högger [18], ali bitno je napomenuti da je složen na temelju rezultata dobivenih u eksperimentalnim modelima koji uključuju ne samo humane već i životinjske izvore enzima citokroma P450 i, pored toga, nije temeljen na prediktivnim statističkim modelima. Kako je iz prikaza literaturnih spoznaja o metabolizmu flavonoida posredovanom citokromima P450 danog u uvodnom poglavlju 1.4 jasno vidljivo da su nerijetko zabilježene razlike u

rezultatima između humanih i životinjskih eksperimentalnih modela, ne čini se prikladnim direktno uspoređivati zaključke iz rada Xiaoa i Hogger [18] s onima proizašlima na temelju ovog istraživanja, iako treba reći da se uvelike međusobno slažu.

5.6 Enzimska kinetika metaboličkih reakcija flavonoidnih aglikona

U ovom istraživanju za ispitane metaboličke reakcije flavonoida određeni su kinetički parametri k_{cat} (konstanta brzine katalize) i K_m (Michaelis-Menteničina konstanta) na temelju kojih je izračunata konstanta specifičnosti definirana omjerom k_{cat}/K_m. Raspon dobivenih vrijednosti za k_{cat} bio je 0,021-14,2 pM min^{-1} pM^{-1} CYP-a. Vrijednost K_m dobivena je u rasponu 0,7-492 μM, a izračunate konstante specifičnosti k_{cat}/K_m kretale su se u rasponu 0,0015-2,9 × 10^6 M^{-1} min^{-1}. Raspon dobivenih rezultata za sve kinetičke parametre vrlo je širok, a svi rezultati nalaze se unutar okvira tri reda veličine. Drugim riječima, razlika između najmanje i najveće vrijednosti kreće se i do 1 000 puta. Ako imamo na umu strukturnu bliskost analiziranih spojeva, tj. relativno male strukurne razlike među analiziranim flavonoidnim aglikonima, ovakav rezultat ispitivanja enzimske kinetike primijećenih metaboličkih reakcija upućuje na relativno visoku selektivnost humanih jetrenih citokroma P450 prema određenim supstratima iz ove skupine spojeva. Ovom zaključku ide u prilog i činjenica da je svega nekoliko rekombinantnih citokroma P450 (CYP1A2, CYPC19, CYP2D6 i CYP3A4) kataliziralo primijećene metaboličke reakcije ispitanih flavonoida. Takav rezultat uvelike opravdava fokusiranje ovog istraživanja na flavonoidne aglikone u svrhu dobivanja što homogenijeg skupa strukturno bliskih spojeva kako bi se oksidativni metabolizam flavonoida mogao što sustavnije istražiti.

Enzim koji daleko najučinkovitije metabolizira ispitane flavonoide je CYP1A2. Ako se izuzme reakcija metaboličke pretvorbe naringenina u eriodiktiol za koju je k_{cat}/K_m iznosio 0,003 × 10^6 M^{-1} min^{-1}, vrijednosti k_{cat}/K_m za rekacije koje je katalizirao CYP1A2 kretale su se u rasponu (0,5-2,9) × 10^6 M^{-1} min^{-1}, što upućuje na veliku katalitičku specifičnost ili učinkovitost ovog citokroma P450 u metabolizmu flavonoida. Ovakav rezultat ide u prilog i potvrđuje već objavljene podatke o metabolizmu flavonoida posredovanom citokromima P450, prema kojima je većina autora provedenih studija zaključila da CYP1A2 ima glavnu ulogu u primijećenom oksidativnom metabolizmu ispitianih flavonoida u *in vitro* uvjetima [38,39,41,43,45,47,49,51,53].

Obzirom na niske koncentracije koje se općenito postižu oralnim unosom flavonoida, vrlo važan kinetički parametar za razmatranje je K_m vrijednost. Ovaj parametar daje informaciju o

koncentracijskom rasponu u kojem je reakcija dosegnula polovinu svoje maksimalne brzine, tj. posredno govori o afinitetu enzima prema određenom supstratu. Što je niža vrijednost K_m, to je veći afinitet enzima prema supstratu, a to znači da će se reakcija zbivati brzo i pri manjim koncentracijama supstrata. Ovo je posebno važno u razmatranju metabolizma flavonoida, spojeva za koje je poznato da u vodi imaju vrlo slabu topljivost, a što je još važnije slabu bioraspoloživost nakon oralne primjene. Zbog svega toga, uobičajene koncentracije koje se postižu u krvi nakon primjene flavonoida iz različitih izvora jesu nanomolarne do mikromolarne, uz velike interindividualne razlike, a najviše postignute ne prelaze 10 μM [32]. Iz ovoga proizlazi da metaboličke reakcije flavonoida za koje je utvrđena niska vrijednost K_m imaju veće realne šanse da se zbivaju *in vivo* nakon njihove oralne primjene, u usporedbi s reakcijama koje primjerice imaju i veći kapacitet katalitičke pretvorbe (k_{cat}), ali visoku vrijednost K_m. Ako od svih metaboličkih pretvorbi ispitanih flavonoida izdvojimo samo metaboličke reakcije čije su K_m vrijednosti manje od 10 μM, ostaje svega sedam flavonoida i devet metaboličkih reakcija koje kataliziraju humani jetreni citokromi P450 i koje bi, obzirom na prethodno razmatranje mogle imati klinički značaj, tj. za koje postoji realna mogućnost da bi se mogle dogoditi i u uvjetima *in vivo* u ljudskom organizmu. Ovi flavonoidi i njihove metaboličke reakcije prikazani su u tablici 15.

Tablica 15. Metaboličke reakcije čija je vrijednost K_m manja od 10 μM.

Supstrat	Produkt	Reakcija	Enzim	k_{cat} [pM min^{-1} pM^{-1} CYP-a]	K_m [μM]	k_{cat}/K_m [10^6 M^{-1} min^{-1}]
apigenin	luteolin	hidroksilacija	CYP1A2	0,30 ± 0,01	0,7 ± 0,1	0,5 ± 0,1
akacetin	apigenin + luteolin	demetilacija + hidroksilacija	CYP1A2	3,8 ± 0,4	1,3 ± 0,6	2,9 ± 1,5
kemferol	kvercetin	hidroksilacija	HLM	0,082 ± 0,009	3,4 ± 1,5	0,024 ± 0,010
3,7-dihidroksiflavon	3,6,7-trihidroksiflavon ili 3,7,8-trihidroksiflavon	hidroksilacija	CYP1A2	6,1 ± 0,7	4,2 ± 2,6	1,5 ± 0,9
galangin	kemferol	hidroksilacija	CYP2C19	0,022 ± 0,003	5,4 ± 1,4	0,004 ± 0,001
tangeretin	4'-hidroksi-5,6,7,8-tetrametoksiflavon + 3',4'-dihidroksi-5,6,7,8-tetrametoksiflavon	demetilacija + hidroksilacija	CYP1A2	8,7 ± 0,5	9,1 ± 2,3	1,0 ± 0,2
7-hidroksiflavon	6,7-dihidroksiflavon	hidroksilacija	CYP1A2	14,2 ± 0,7	9,7 ± 2,0	1,5 ± 0,3
akacetin	apigenin + luteolin	demetilacija + hidroksilacija	HLM	0,62 ± 0,07	9,5 ± 3,3	0,06 ± 0,02
naringenin	eriodiktiol	hidroksilacija	CYP1A2	0,021 ± 0,003	7,3 ± 5,6	0,003 ± 0,002

Od sedam izdvojenih flavonoida i njihovih metaboličkih reakcija iz tablice 15, glavnu ulogu u metabolizmu njih šest ima CYP1A2 što dodatno potvrđuje tezu da je ovaj citokrom P450 najvažniji za metabolizam flavonoida u ljudi. Ipak, za bolju procjenu mogućeg kliničkog značaja metaboličke reakcije nije dovoljno razmotriti samo parametar K_m, jer ne daje potpunu sliku kinetike neke reakcije, već ga je potrebno staviti u odnos s konstantom brzine katalize (k_{cat}). Već je rečeno u uvodu da je omjer k_{cat}/K_m, koji se naziva konstantom specifičnosti ili katalitičke učinkovitosti najbolji parametar za procjenu kinetike metaboličke reakcije, za njihovu međusobnu usporedbu. Jer osim mogućnosti da se rekacija dogodi *in vivo* u organizmu, za klinički značaj važan je i obim u kojem se dogodi. Tako primjerice, iako u reakcijama navedenima u tablici 15 postoji relativno veliki afinitet citokroma P450 za kemferol, galagnin i naringenin, obzirom na relativno vrlo niske konstante brzine katalize (k_{cat}), za očekivati je da obim ovih reakcija neće biti velik. Uzmimo zato u razmatranje deset primijećenih metaboličkih reakcija flavonoida s najvišim vrijednostima konstante specifičnosti (k_{cat}/K_m) (tablica 16).

Tablica 16. Deset metaboličkih reakcija flavonoida posredovanih humanim jetrenim citokromima P450 s najvišim vrijednostima k_{cat}/K_m.

Supstrat	Produkt	Reakcija	Enzim	k_{cat} [pM min^{-1} pM^{-1} CYP-a]	K_m [μM]	k_{cat}/K_m [10^6 M^{-1} min^{-1}]
akacetin	apigenin + luteolin	demetilacija + hidroksilacija	CYP1A2	3,8 ± 0,4	1,3 ± 0,6	2,9 ± 1,5
3,7-dihidroksiflavon	3,6,7-trihidroksiflavon ili 3,7,8-trihidroksiflavon	hidroksilacija	CYP1A2	6,1 ± 0,7	4,2 ± 2,6	1,5 ± 0,9
7-hidroksiflavon	6,7-dihidroksiflavon	hidroksilacija	CYP1A2	14,2 ± 0,7	9,7 ± 2,0	1,5 ± 0,3
tangeretin	4'-hidroksi-5,6,7,8-tetrametoksiflavon + 3',4'-dihidroksi-5,6,7,8-tetrametoksiflavon	demetilacija + hidroksilacija	CYP1A2	8,7 ± 0,5	9,1 ± 2,3	1,0 ± 0,2
sakuranetin	5,3',4'-trihidroksi-7-metoksiflavanon	hidroksilacija	CYP1A2	8,3 ± 1,1	12,2 ± 6,8	0,7 ± 0,4
apigenin	luteolin	hidroksilacija	CYP1A2	0,30 ± 0,01	0,7 ± 0,1	0,5 ± 0,1
tangeretin	X-demetilirani (prsten A)	demetilacija	CYP3A4	13,8 ± 0,8	65,4 ± 9,9	0,21 ± 0,03
akacetin	apigenin	demetilacija	CYP2D6	3,7 ± 0,5	22,7 ± 7,0	0,16 ± 0,05
galangin	kemferol + kvercetin	hidroksilacija	HLM	3,3 ± 0,5	31,6 ± 16,0	0,11 ± 0,06
tangeretin	4'-hidroksi-5,6,7,8-tetrametoksiflavon	demetilacija	CYP3A4	6,4 ± 0,4	59,3 ± 9,0	0,11 ± 0,02

Raspon u kojem su određene vrijednosti omjera k_{cat}/K_m ovih reakcija bio je (0,11-2,9) × 10^6 M^{-1} min^{-1}. Teško je ne primijetiti sličnost s vrijednostima dobivenima za reakcije katalizirane enzimom CYP1A2. Ranije je istaknuto da su se vrijednosti omjera k_{cat}/K_m reakcija kataliziranih enzimom CYP1A2 (izuzev hidroksilacije naringenina) kretale u rasponu (0,5-2,9) × 10^6 M^{-1} min^{-1}. Stoga i ne čudi da prvih šest od ovih deset izdvojenih reakcija s najvećom katalitičkom učinkovitošću katalizira upravo CYP1A2. Uz to, reakcije demetilacije tangeretina koje katalizira CYP3A4 i reakcija demetilacije akacetina koju katalizira CYP2D6, tek su sekundarne metaboličke reakcije ovih flavonoida, dok glavne metaboličke putove katalizira CYP1A2. Ako se uzme u obzir da je CYP1A2 jedan od zastupljenijih citokroma P450 u jetri i jedan od važnijih enzima za metabolizam lijekova [15], interakcije na razini oksidativnog metabolizma posredovanog citokromima P450 teoretski su moguće unosom flavonoida koji su u tablicama 15 i 16. Na temelju prethodnog razmatranja o važnosti konstante specifičnosti k_{cat}/K_m, rezultati enzimske kinetike metaboličkih reakcija flavonoida

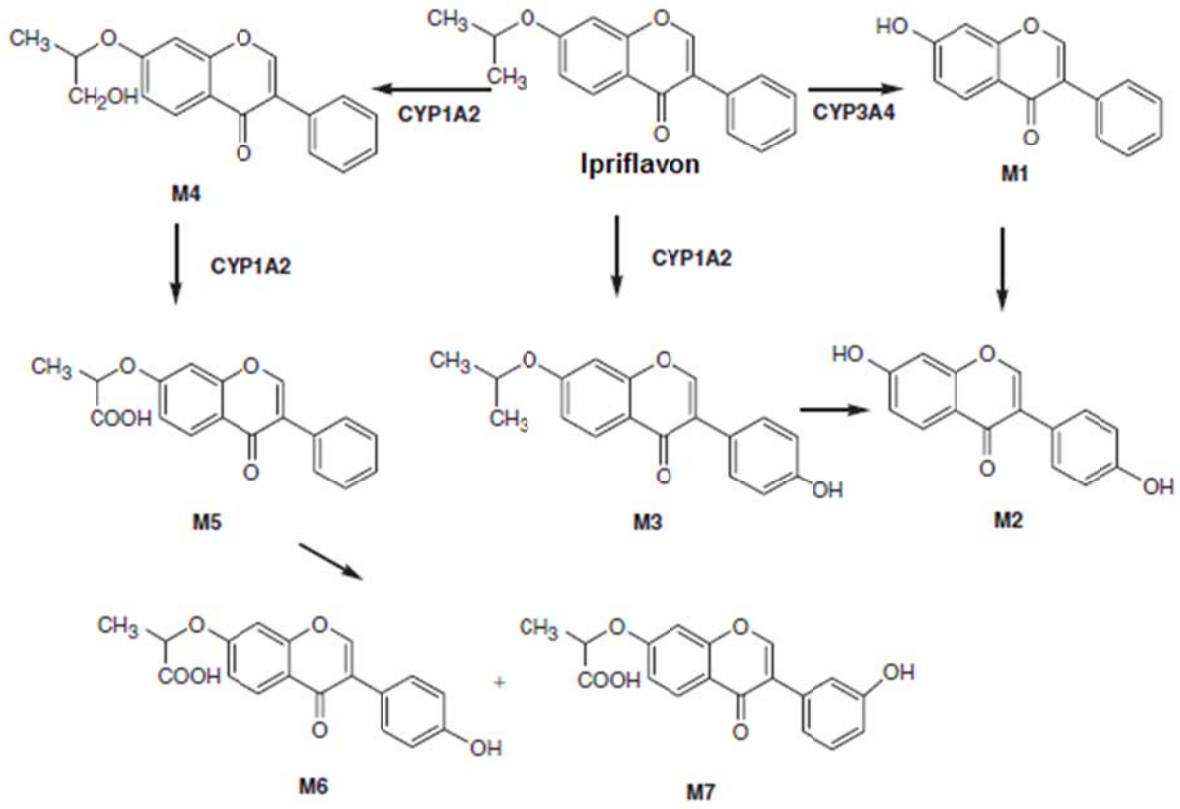
posredovnih humanim jetrenim citokromima P450 sugeriraju da su među ispitanim flavonoidima od najvećeg kliničkog značaja metaboličke reakcije flavonoida navedenih u tablici 16, a ponajprije one koje katalizira CYP1A2. Stoga je u ovom kontekstu potreban dodatni oprez kod unosa akacetina, 3,7-dihidroksiflavona, 7-hidroksiflavona, tangeretina, sakuranetina i apigenina, bilo kao potencijalnih terapijskih molekula bilo putem hrane u izvorima bogatim ovim flavonoidima, te istovremene primjene lijekova koji se primarno metaboliziraju putem CYP1A2 (npr. klozapin, duloksetin, fluvoksamin, haloperidol, imipramin, naproksen, olanzapin, zolmitriptan itd. [15]). Kod unosa ovih flavonoida bitno je imati na umu i velike interindividualne razlike primjećene u ekspresiji/aktivnosti CYP1A2, koje su utvrđene u rasponu i do 40 puta [15,80] koje značajno mogu promijeniti metabolizam ovih flavonoida.

5.6.1 Usporedba s enzimskom kinetikom metaboličkih reakcija flavonoida i lijekova iz literature

Već je rečeno da je u literaturi dostupno vrlo malo podataka o metabolizmu flavonoida posredovanom citokromima P450, ali još je u manje slučajeva za primijećene metaboličke reakcije opisana njihova kinetika te određeni kinetički parametri. Bursztyka i suradnici [52] te Hu i suradnici [51] u svojim su se istraživanjima bavili kinetikom reakcije aromatske hidroksilacije genisteina posredovane enzimima HLM-a i CYP1A2. Wen i Walle [81] proučavali su kinetiku demetilacije 5,7-dimetoksiflavona i 3',4'-dimetoksiflavona katalitičkim djelovanjem citokroma P450 iz HLM-a. Gradolatto i suradnici [40] u svom su se istraživanju bavili kinetikom metaboličke reakcije aromatske hidroksilacije apigenina i nastanka luteolina u inkubacijama sa štakorskim jetrenim mikrosomima (RLM). Metabolizam galangina i kinetiku njegove pretvorbe u kemferol posredovanu citokromima iz HLM-a proučavali su Otake i Walle [47] i Otake i suradnici [82]. Potonja grupa autora nadopunila je istraživanje iste metaboličke reakcije, proučavanjem kinetike nastanka kemferola uz CYP1A1, CYP1A2 i CYP2C9. U svim ovim istraživanjima postoji zajednički problem koji otežava tumačenje rezultata praćenja enzimske kinetike opisanih metaboličkih reakcija i određenih kinetičkih parametara. Sve inkubacije na temelju kojih su određeni kinetički parametri napravljene su bez poznavanja točnih molarnih koncentracija enzima citokroma P450, a bez tog podatka nije moguće izračunati stvarne vrijednosti konstante brzine katalize (k_{cat}) koja se izražava jedinicama [pM min^{-1} pM^{-1} CYP-a] i konstante specifičnosti (katalitičke učinkovitosti) (k_{cat}/K_m) koja se izražava jedincama [10^6 M^{-1} min^{-1}]. Prema teoriji Michaelis-Menteničine enzimske kinetike, oba ova parametra određena su obzirom na molarnu koncentraciju enzima

koji katalizira reakciju i upravo zbog toga mogu se uspoređivati rezultati dobiveni u različitim eksperimentalnim uvjetima. Umjesto molarne koncentracije, autori gore navedenih istraživanja, u kojima su proučavali enzimsku kinetiku metaboličkih reakcija flavonoida, za izražavanje rezultata ovih kinetičkih parametara koristili su jedinicu mase proteina (mikrosoma, rekombinantnih enzima i drugih enzimskih sustava) korištenih u inkubacijama. Na taj su način dobiveni „surogati“ konstante brzine katalize (k_{cat}) izražene najčešće jedinicama [pmol min^{-1} mg^{-1} prot.] i konstante specifičnosti (k_{cat}/K_m) najčešće izražene jedinicama poput [µl min^{-1} mg^{-1} prot.]. Potonji paramtar u literaturi se još naziva i intrinzičkim klirensom *in vitro* (engl. *intrinsic clearance*), što prema Guengerichu [16] nije dobra praksa jer može dovesti do zabune pri usporedbama. Naime, izraz „klirens“ (engl. *clearance*) ima specifično značenje u *in vivo* farmakokinetici. Ovako određeni kinetički parametri, svakako imaju svoju vrijednost i daju koristan uvid u karakteristike metabolizma, ponajprije unutar skupa metaboličkih reakcija ispitanih u istom istraživanju u istim eksperimentalnim uvjetima. Ali postaje problem tumačiti i uspoređivati tako dobivene rezultate između različitih laboratorija s različitim uvjetima ispitivanja, različitim korištenim materijalima i sl. A direktna usporedba sa stvarnim parametrima k_{cat} i k_{cat}/K_m niti nije moguća. Za nijedan od flavonoida ispitanih u ovom istraživanju nije prethodno utvrđena kinetika njegovih metaboličkih reakcija na način koji bi omogućio direktnu usporedbu kinetičkih podataka dobivenih u ovom istraživanju. U literaturi su opisane tek dvije studije u kojima je istražena kinetika metaboličkih reakcija flavonoida i u kojima su određeni stvarni patametri njihovih enzimskih kinetika k_{cat} i k_{cat}/K_m koji se mogu usporediti s rezultatima dobivenima u ovom istraživanju. Androutsopulos i suradnici [41] proučavali su kinetiku metabolizma diosmetina i njegove pretvorbe u luteolin djelovanjem enzima CYP1A1, CYP1A2 i CYP1B1. Određeni su kinetički parametri ove reakcije, a konstanta specifičnosti (k_{cat}/K_m) iznosila je $8{,}1 \times 10^6$ M^{-1} min^{-1}. U usporedbi s najvišom određenom konstantom specifičnosti u ovom istraživanju, ova je vrijednost gotovo tri puta viša, što upućuje na ekstenzivan metabolizam diosmetina *in vitro* u uvjetima eksperimenta. Obim metabolizma diosmetina primijećen u ovom istraživanju nije bio velik, a budući da je nastalo manje od 10% (*m*/*m*) produkata u odnosu na supstrat, dalje nije ni karakteriziran. Razlozi za ovu razliku nisu očiti. Uvjeti eksperimenta razlikovali su se u koncentracijama supstrata i enzima, duljini trajanja inkubacija i korištenoj valnoj duljini na UV-detektoru, ali ne u tolikoj mjeri da bi trebali uzrokovati razlike u metabolizmu. Autori su u inkubacijama kao izvor enzima koristili tzv. „supersome“, mikrosome koje sadrže humane citokrome P450 dobivene iz stanica kukaca koje eksprimiraju gene za ove enzime (engl. *Supersomes*™), za razliku od humanih jetrenih

mikrosoma pročišćenih iz jetre i bakulovirusnih sustava rekombinantnih citokroma P450 korištenih u ovom istraživanju. Ta razlika u korištenom izvoru enzima mogući je razlog za primijećeno odstupanje u obimu metabolizma diosmetina između dva istraživanja. Moon i suradnici [83] proučavali su metabolizam ipriflavona (slika 103) i kinetiku nastanka četiri metabolita u reakcijama kataliziranima enzimima CYP1A2, CYP3A4, CYP2C9 i CYP2C19. Kao izvor enzima autori su koristili cDNK eksprimirane citokrome P450. Raspon vrijednosti konstante specifičnosti (k_{cat}/K_m) određen za ove metaboličke reakcije bio je (0,02-0,22) × 10^6 M^{-1} min^{-1}.



Slika 103. Metabolizam ipriflavona posredovan humanim jetrenim citokromima P450 [83].

U usporedbi s rezultatima ovog istraživanja, vrijednosti katalitičke učinkovitosti metabolizma ipriflavona nalaze se otprilike u sredini raspona dobivenog za ispitane flavonoide. Dakle, možemo reći da se ipriflavon metabolizira putem citokroma P450 prosječnom katalitičkom specifičnošću u odnosu na flavonoide koji su pokazali metabolizam u ovom istraživanju. Ipriflavon je sintetički flavonoid koji pripada skupini izoflavona, a kao suportivna terapija

koristi se u prevenciji i liječenju osteoporoze [84,85]. Za ipriflavon je otprije poznato da se uglavnom metabolizira u jetri oksidacijom izopropoksilne skupine i/ili aromatskom hidroksilacijom prstena B, nakon čega slijedi glukuronidacija ili sulfatacija [83]. Za četiri produkta oksidativnog metabolizma ipriflavona posredovanog humanim jetrenim citokromima P450 pokazano je da posjeduju farmakološku aktivnost povezanu sa stvaranjem i resorpcijom kosti koja može doprinijeti ukupnom učinku ipriflavona [86-89]. Na temelju razmatranja gore navedenih literaturnih podataka o metabolizmu ipriflavona možemo izvući nekoliko važnih zaključaka u kontekstu ovog istraživanja metabolizma flavonoida posredovanog humanim jetrenim citokromima P450. Prvo, ipriflavon pri prvom prolazu kroz jetru podliježe ekstenzivnom metabolizmu koji je velikim dijelom posredovan citokromima P450. Drugo, isti metaboliti oksidativnog metabolizma ipriflavona posredovanog humanim jetrenim citokromima P450 nađeni su u eksperimentu *in vitro* i *in vivo*. Treće, metaboliti oksidativnog metabolizma nastali djelovanjem humanih jetrenih citokroma P450 imaju farmakološku aktivnost. Ako kinetičke parametre metaboličkih reakcija određene u istraživanju Moona i suradnika [83] stavimo u kontekst rezultata enzimske kinetike dobivenih za ispitane flavonoide u ovom istraživanju, na temelju prethodnog razmatranja metabolizma ipriflavona možemo zaključiti da se metaboličke reakcije opisane u ovom radu, nalaze u području katalitičke specifičnosti citokroma P450 koje može imati klinički značaj za metabolizam ispitanih flavonoida.

Usporedba kinetičkih parametara metaboličkih reakcija flavonoida posredovanih citokromima P450 dostupnih iz literaturnih podataka s rezultatima dobivenima u ovom istraživanju potvrđuje širok raspon vrijednosti katalitičkih učinkovitosti metaboličkih reakcija koje se mogu očekivati s flavonoidima kao susptratima humanih citokroma P450. Raspon rezultata dobivenih u ovom istraživanju dobro se smješta u raspon već objavljenih vrijednosti metaboličkih reakcija diosmetina i ipriflavona, što sugerira relevantnost dobivenih rezultata enzimske kinetike. Jednako, tako, razmatranje metabolizma ipriflavona i kinetike njegovih metaboličkih reakcija kataliziranih citokromima P450 stavlja rezultate enzimske kinetike metaboličkih reakcija dobivenih u ovom istraživanju u kontekst kliničke značajnosti.

Obzirom na ključnu ulogu CYP1A2 koju je u ovom istraživanju, ali i u dostupnoj literaturi, imao u metabolizmu ispitanih flavonoida, osvrnut ćemo se na primjer reakcije *O*-deetilacije fenacetina koju katalizira upravo CYP1A2. Ovo je tipična marker reakcija aktivnosti CYP1A2 koja se uobičajeno koristi u istraživanjima povezanima s metabolizmom posredovanim ovim citokromom P450 [90,91]. U sklopu istraživanja koje su proveli Zhou i

suradnici [90] ispitana je kinetika *O*-deetilacije fenacetina katalizirane enzimom CYP1A2 i određeni su kinetički parametri. U inkubacijama su autori kao izvor enzima koristili membranske frakcije s eksprimiranim CYP1A2 pripremljene iz bakterijskih stanica. Konstanta brzine katalize (k_{cat}) iznosila je 1,5 ± 0,1 pM min^{-1} pM^{-1} CYP-a, a K_m 25 ± 6 μM. Izračunata je konstanta specifičnosti reakcije (k_{cat}/K_m) koja je iznosila 0,058 × 10^6 M^{-1} min^{-1}. U usporedbi s vrijednostima konstanti specifičnosti dobivenima za metaboličke reakcije ispitanih flavonoida u ovom istraživanju ((0,0015-2,9) × 10^6 M^{-1} min^{-1}), marker reakcija aktivnosti CYP1A2 smjestila bi se u sredini dobivenog raspona rezultata. Drugim riječima, metabolička marker reakcija *O*-deetilacije fenacetina katalizirana enzimom CYP1A2, obzirom na rezultate ovog istraživanja, svrstala bi se među umjereno učinkovite reakcije, a takav zaključak također ide u prilog relevantnosti dobivenih rezultata enzimske kinetike u ovom radu.

U literaturi je vrlo teško pronaći podatke koji povezuju istraživanja metabolizma lijekova *in vitro* i *in vivo* i koji uključuju utvrđene parametre enzimske kinetike metaboličkih reakcija. Jedan takav primjer je istraživanje oksidativnog metabolizma lonafarniba kojeg su proveli Ghosal i suradnici [92] s ciljem utvrđivanja humanih jetrenih citokroma P450 odgovornih za metabolizam ovog lijeka. Lonafarnib je protutumorski lijek koji na čvrste tumore djeluje sprečavanjem farnezilacije proteina inhibitornim djelovanjem na enzim farnezilproteintransferazu, čijim djelovanjem na određene proteine stanice započinje kompleksni kaskadni proces povezan s preživaljvanjem i proliferacijom stanica. Lijek je 2014. godine dobio status „lijeka siročeta“ (engl. *orphan drug*) za liječenje infekcija virusom hepatitisa delta [93]. Lijek djeluje blokirajući replikaciju virusa farnezilacijom glavnog proteina uključenog u taj proces. U inkubacijama s HLM-om autori su utvrdili nastanak četiri metabolita lonafarniba, tri produkta hidroksilacije (označeni kao M1, M3 i M4) i jednog dehidrogenacije (označenog kao M2) pri čemu je nastala dvostruka veza između dva atoma ugljika u molekuli. Ranije je u kliničkim ispitivanjima[6] utvrđeno da isti metaboliti kod ljudi nastaju nakon primjene lonafarniba i mogu biti detektirani *in vivo*. Štoviše, metaboliti M1 i M2 detektirani su kao glavni metaboliti u ispitivanju *in vivo* nakon primjene jedne doze, a nakon primjene uzastopnih doza ovi metaboliti postaju minorni. Ispitivanjem s rekombinantnim citokromima P450 i ispitivanjem inhibicija reakcije specifičnim inhibitorima citokroma P450 utvrđeno je da su za nastanak metabolita M1, M2 i M3 odgovorni enzimi

[6] Podaci nisu dostupni kao referenca, već ih autori u istom radu navode kao „neobjavljeni podaci“. Vjerojatni razlog nedostupnosti reference jest čuvanje poslovne tajne, budući da je lijek još uvijek u fazi razvoja.

CYP3A4 i CYP3A5, dok je za nastanak metabolita M2 bio odgovoran CYP2C8. Kinetički parametri određeni su za metaboličke reakcije u kojima nastaju M1 i M2, dva glavna metabolita nađena u ispitivanjima *in vivo* nakon primjene jedne doze lonafarniba. No, kinetički parametri odnose se na reakcije posredovane HLM-om u *in vitro* eksperimentu opisanom u radu. Tako je za M1 izračunata konstanta specifičnosti (k_{cat}/K_m) iznosila $0{,}01 \times 10^6$ M^{-1} min^{-1}, a za M2 $0{,}003 \times 10^6$ M^{-1} min^{-1}. Metaboličke reakcije nastanka glavnih metabolita lonafarniba (M1 i M2) svrstale bi se među najsporije i najmanje učinkovite kad bismo ih usporedili s rezultatima enzimske kinetike metaboličkih reakcija ispitanih flavonoida u ovom radu. Ipak, metaboliti M1 i M2 i uz relativno niske vrijednosti konstante katalitičke sepcifičnosti (k_{cat}/K_m) određene u eksperimentalnim uvjetima *in vitro*, detektirani su i u uvjetima *in vivo* i to kao glavni metaboliti nakon primjene jedne doze lonafarniba. Primjer metabolizma lonafarniba, kao neflavonoidnog spoja, i kinetičkih osobina njegovih metaboličkih reakcija posredovanih humanim jetrenim citokromima P450, na sličan način kao i ranije opisani primjer ipriflavona, također ide u prilog zaključku da se metaboličke reakcije opisane u ovom radu, nalaze u području katalitičke specifičnosti citokroma P450 koje može imati klinički značaj za metabolizam ispitanih flavonoida.

Namjera rasprave o rezultatima kinetičkih parametara metaboličkih reakcija flavonoida ispitanih u ovom istraživanju i usporedba s odgovarajućim literaturnim podacima nije napravljena s namjerom bilo kakve direktne ekstrapolacije i predikcije metabolizma *in vivo*. Kao što je već nagalašeno u uvodu da je pitanje bioraspoloživosti flavonoida kompleksno jer uključuje niz varijabli poput apsorpcije u tankom crijevu, ekskrecije glukuronidiranih metabolita natrag u lumen tankog crijeva, metabolizma posredovanog crijevnom mikroflorom, metabolizma u tankom crijevu i u jetri, farmakokinetike, identifikacije metabolita prisutnih u krvi, vezanja na albumin, nakupljanja u stanicama, unutarstaničnog metabolizma, nakupljanja u tkivima te eliminacije putem žuči i urina, tako i metabolizam flavonoida treba staviti u ovaj kontekst sveukupne sudbine flavonoida u organizmu nakon oralne primjene. Upravo zbog kompleksnosti procesa uključenih u sudbinu flavonoida u organizmu, klinička značajnost njihovog metabolizma nije određena isključivo kinetičkim parametrima utvrđenima u eksperimentalnim uvjetima *in vitro*. Za potpuniji uvid u kliničku značajnost neke metaboličke reakcije potrebna su dodatna i pojedinačna razmatranja za svaki od flavonoida od interesa, ponajprije u različitim dostupnim *in vivo* eksperimentalnim modelima. Naime, može se dogoditi, hipotetski gledano, da oksidativni metabolizam akacetina posredovan humanim jetrenim citokromima P450 za kojega je u ovom istraživanju

utvrđena najviša katalitička specifičnost (k_{cat}/K_m) nema uopće klinički značaj zbog primjerice, vrlo slabe apsorpcije i posljedično male bioraspoloživosti ili zbog ekstenzivne konjugacije prilikom apsoprpcije u stanicama tankog crijeva koja može značajno smanjiti udio slobodnog akacetina koji uopće dolazi do jetre i sl. Zato treba istaknuti da su sve usporedbe s literaturnim podacima napravljene u sklopu rasprave o rezultatima enzimske kinetike primijećenih metaboličkih reakcija ispitanih flavonoida samo smjernice koje pomažu u promišljanju o dobivenim rezultatima i način da ih se stavi u kontekst dosadašnjih spoznaja u ovom području, dok je specifičnost metabolizma svakog flavonoida od interesa potrebno utvrditi pojedinačno.

5.7 Važnost drugih metaboličkih puteva za ukupni metabolizam flavonoida

Iako je enzimski sustav citokroma P450 općenito najvažniji za metabolizam lijekova (slika 4a), nije nužno da je najvažniji i za promatrani flavonoid od interesa. O tome svjedoče i rezultati istraživanja T. Walle-a i suradnika koji su proučavali sveukupni metabolizam flavonoida nakon unosa u ljudski organizam. U svojim se istraživanjima nisu fokusirali samo na oksidativni metabolizam posredovan humanim citokromima P450, već su koristili različite dostupne *in vitro* modele za ispitivanje metabolizma te ih kombinirali s ispitivanjima *in vivo*. Ilustrativni primjer kompleksnosti metabolizma flavonoida nalazimo u rezultatima istraživanja metabolizma kvercetina [94]. Mjerenjima količine eliminiranog kvercetina u standardnim biološkim izlučevinama poput urina i fecesa utvrđeno je da je manje od 10% ukupne unesene oralne doze, te oko 20% ukupne unesene intravenske doze kvercetina eliminirano ovim najčešćim putevima eliminacije lijekova i ksenobiotika općenito. Ovakav rezultat upućivao je na alterantivni put eliminacije kvercetina, koji je otkriven u eksperimentu s radioobilježenim [^{14}C]kvercetinom. Iznenađujuće je utvrđeno da se najveći dio unesene doze kvercetina, bilo oralno, bilo intravenski, eliminira putem pluća kao ugljikov dioksid u izdahnutom zraku. Do danas nije poznat točan menahizam ove pretvorbe od kvercetina do ugljikovog dioksida, ali postoje jasne indikacije da važnu ulogu u ovom procesu imaju bakterije u udaljenim dijelovima tankog crijeva i u debelom crijevu. Bakterijski metabolizam flavonoida već je dulje vrijeme poznat iz ispitivanja na životinjskim modelima [95], a mogao bi također biti i ograničavajući korak u raspodjeli flavonoida i biološkoj raspoloživosti kod ljudi. Već je spomenuto u uvodu da crijevne bakterije mogu biti odgovorne za hidrolizu glikozida flavonoida kao i konjugiranih metabolita – glukuronida i sulfata – do ishodišnih

aglikona koji se opet mogu apsorbirati. Ovo eneterohepatičko cirkuliranje za posljedicu ima dulje zadržavanje flavonoida u organizmu. No, utvrđeno je da hidrolitička reakcija nije jedina posredovana crijevnim bakterijama već da se djelovanjem bakterija flavonoidi razgrađuju do brojnih i različitih fenolnih i karboksilnih kiselina [87,88], pa sve do ugljikovog dioksida kako je ranije opisano. Biološki značaj ovih metabolita još uvijek je vrlo slabo istražen i poznat. U opisanom istraživanju [94], kao i u drugim *in vivo* istraživanjima metabolizma kvercetina [55] aglikonski oblik u plazmi ili nije nađen ili je nađen tek u tragovima, dok su kao dominantne forme nađeni glukuronidni i/ili sulfatni konjugati.

Ulogu i važnost drugih metaboličkih putova u biološkoj sudbini flavonoida istražili su u odvojenim istraživanjima Otake i suradnici [82] te Wen i Walle [81] direktno usporedivši oksidativni metabolizam posredovan humanim citokromima P450 s metaboličkim procesima konjugacije u različitim *in vitro* modelima. U prvoj studiji [82], galangin je odabran kao predstavnik skupine flavonoidnih spojeva. Za karakterizaciju oksidativnog metabolizma i glukuronidacije galangina u inkubacijama su korišteni humani jetreni mikrosomi kojima su dodavani odgovarajući koenzimi za aktivaciju citokroma P450, odnosno glukuronoziltransferaza. Na ovaj je način bilo moguće direktno usporediti brzine metaboličkih pretvorbi galangina posredovanih ovim dvama enzimskim sustavima, dok doprinos sulfatacije nije bilo moguće direktno usporediti u ovom modelu budući da je posredovana citosolnim enzimima sulfotransferazama (SULT). Zbog toga je usporedba sva tri metabolička puta napravljena u eksperimentu s pulom frakcije S9 jetre 10 donora, a rezultati potvrđeni u eksperimentu sa svježim humanim hepatocitima. Dobro podudaranje ova dva eksperimenta ukazalo je na to da je frakcija jetre S9 dobar *in vitro* eksperimentalni model za ispitivanje ukupnog hepatičkog metabolizma galangina, a moguće i drugih flavonoida. Zaključak ovih ispitivanja bio je da galangin većinom podliježe metaboličkim pretvorbama koje uključuju konjugaciju, prvenstveno glukuronidaciju, dok je doprinos oksidacije ukupnom metabolizmu galangina bio vrlo mali. Vrijednosti k_{cat}/K_m određene u ovoj studiji bile su i do 30 puta veće za reakcije glukuronidacije te oko 7 puta veće za reakcije sulfatacije u usporedbi s vrijednostima dobivenima za reakcije oksidacije posredovane citokromima P450. Ova je studija jasno pokazala da je u odnosu na oksidaciju citokromima P450 preferirani metabolički put galangina *in vivo* glukuronidacija i sulfatacija, jer su ovi metabolički procesi u jetri znatno učinkovitiji. Wen i Walle [81] u novoj su studiji potvrdili ove rezultate metabolizma galangina, a istraživanje su proširili na metoksilirane analoge flavona 5,7-dimetoksiflavon i 3',4'-dimetoksiflavon. Uvjeti *in vitro* eksperimenta bili su jednaki kao i u prethodno opisanoj

studiji metabolizma galangina. Za razliku od galangina, metoksilirani analozi flavona pokazali su značajnu stabilnost prema hepatičkom metabolizmu. Budući da u svojoj strukturi nemaju slobodnih hidroksilnih skupina, ispitivani metoksilirani flavoni nisu pokazali metabolizam u prisutnosti koenzima za glukuronoziltransferaze i sulfotransferaze. Drugim riječima, nije primijećen nastanak konjugiranih derivata. Čak je i oksidativni metabolizam posredovan humanim jetrenim citokromima P450 primijećen u puno manjem obimu u usporedbi s galanginom. Rezultati su i opet potvrđeni u eksperimentu sa svježim humanim hepatocitima. 5,7-Dimetoksiflavon nije pokazao nikakav metabolizam nakon 4 h inkubacija, dok je 3',4'-dimetoksiflavon pokazao značajnu interindividualnu varijabilnost metabolizma posredovanog humanim citokromima P450 u eksperimentu sa svježim hepatocitima. Ipak, ova razlika u osjetljivosti na oksidativni metabolizam posredovan humanim jetrenim citokromima P450 pokazana je za dva metoksilirana flavona i na modelu HLM-a čime je umanjen utjecaj interindividualnih razlika određenih izvorom enzima. Znatno brži metabolizam u takvim uvjetima pokazao je 3',4'-dimetoksiflavon. Između ostalog je zaključeno i da je u slučaju metoksiliranih flavona, čiji je metabolički put usmjeren dominantno prema oksidaciji citokromima P450, bolji izvor informacija o metabolizmu model s HLM-om u odnosu na jetrenu frakciju S9. Jedan od glavnih razloga niske bioraspoloživosti flavonoida je i ekstenzivan metabolizam putem glukuronidacije i sulfatacije, kako je jasno pokazano u slučaju galangina. Budući da su se metilirani analozi flavona, osobito 5,7-dimetoksiflavon, pokazali metabolički puno stabilnijima u *in vitro* eksperimentalnim modelima u usporedbi s nemetiliranim flavonoidom galanginom, može se pretpostaviti da će potpuno metilirani flavoni imati višu oralnu bioraspoloživost u odnosu na nemetilirane analoge.

Ova tri opisana primjera metabolizma kvercetina, galangina i metiliranih flavona vrlo dobro ilustriraju kompleksnost metabolizma flavonoida kod kojih i vrlo male razlike u strukturi mogu značiti potpuno različit metabolički put i biološku sudbinu. Rezultati dobiveni u ovom istraživanju u nekoliko važnih točaka potvrđuju netom opisana istraživanja i ovakva promišljanja o metabolizmu flavonoida koja proizlaze na temelju njihovih rezultata. Kvercetin je bio predmetom istraživanja u ovom radu i utvrđeno je da nema metabolizma posredovanog humanim jetrenim citokromima P450. Isti rezultat potvrđen je u drugim istraživanjima opisanima u literaturi i ranije u radu [38], dok je gore opisano istraživanje metabolizma kvercetina [94] potvrdilo da se kvercetin *in vivo* metabolizira alterantivnim putem, a oksidativni metabolizam nije primijećen. S druge strane, za galangin je u ovom istraživanju utvrđen umjereno jaki do jaki metabolizam posredovan humanim citokromima

P450 u odnosu na raspon kinetičkih parametara dobivenih za ispitane flavonoide. Od 30 ispitanih flavonoida u ovom radu, samo krizindimetileter i tangeretin potpuno su metilirani flavoni koji nemaju slobodnih hidroksilnih skupina u svojim strukturama. Krizindimetileter koji ima dvije metoksilne skupine u strukturi smještene samo na prstenu A nije pokazao nikakav metabolizam u ovom istraživanju, dok je tangeretin, pentametoksilirani flavon supstituiran i na prstenu A i B, pokazao značajan metabolizam posredovan humanim jetrenim citokromima P450. Ovakav rezultat uvelike se slaže s rezultatima metabolizma metiliranih flavona koje su pokazali Wen i Walle [81], gdje je opažen znatno veći metabolizam flavona supstituiranog samo na prstenu B u odnosu na flavon suspstituiran samo na prstenu A, a u eksperimantalnim modelima s hepatocitima, metabolizam flavona supstituiranog samo na prstenu A nije niti primijećen. U ovom kontekstu reakcije demetilacije posredovane humanim citokromima P450 dobivaju dodatno na značaju, osobito za potpuno metilirane flavonoide čiji metabolički put može biti značajno promijenjen. U ovom je istraživanju reakcija demetilacije primijećena za akacetin, diosmetin, tangeretin i hesperetin na položaju 4' prstena B, te za sakuranetin i prunetin na položaju 7 prstena A. Rezultati ovog istraživanja jasno ukazuju na to da je metoksilna skupina na položaju 4' prstena B daleko najosjetljivija na metabolizam posredovan humanim jetrenim citokromima. Od ispitanih flavonoida koji na položaju 4' prstena B imaju supstituiranu metoksilnu skupinu, jedino tamariksetin nije pokazao reakciju demetilacije, niti metabolizam posredovan humanim jetrenim citokromima općenito. Razlozi za to nisu očiti. Tamariksetin je uz ramnetin i izoramnetin jedini ispitani flavonol koji ima metoksilnu skupinu u strukturi, a nijedan od njih nije pokazao metabolizam posredovan humanim jetrenim citokromima P450. Moguće je da hidroksilna skupina na položaju 3 prstena C u strukturi flavonola ima određeni negativan utjecaj na metabolizam posredovan humanim jetrenim citokromima P450, budući da je diosmetin, flavonski analog tamariksetina, pokazao metabolizam i to upravo reakciju demetilacije. Osim toga, statističkom analizom je utvrđeno da odsutnost 3-hidroksilne skupine statistički značajno korelira s metabolizmom posredovanim citokromima P450. Ipak, za donošenje konačnog zaključka o negativnom utjecaju hidroksilne skupine na položaju 3 prstena C flavonoidnih aglikona, potrebna su dodatna istraživanja s više pomno odabranih analoga flavona i flavonola. Osim na položaju 4' prstena B, reakcija demetilacije primijećena je i na položaju 7 prstena A kod jednog predstavnika flavanona (sakuranetin) i jednog predstavnika izoflavona (prunetin). Oba spoja imaju u strukturi hidroksilne skupine na položajima 5 prstena A i 4' prsterna B, dok ostali ispitani flavonoidi koji imaju metoksilnu skupinu na položaju 7 prstena A, imaju drugačiji obrazac supstituenata i ne pokazuju metabolizam posredovan humanim jetrenim citokromima

P450. Pokazalo se da su reakcije demetilacije na položaju 4' prstena B, koje su primijećene u ovom istraživanju, vrlo učinkovite te predstavljaju glavne metaboličke putove gore nabrojanih flavonoida. Štoviše, reakcija demetilacije akacetina je i najučinkovitija metabolička reakcija opažena u ovom istraživanju, dok je reakcija 4'-demetilacije tangeretina među prvih deset najučinkovitijih. Ovi rezultati ukazuju na visoku selektivnost citokroma P450 prema metiliranim flavonoidima kao supstratima, slično kao i prema flavonoidima općenito. Reakcije demetilacije flavonoida posredovane humanim jetrenim citokromima P450 vrlo su učinkovite u odnosu na sve primijećene metaboličke reakcije u ovom istraživanju, a najčešće se zbivaju na položaju 4' prstena B. U kontekstu značaja metilacije za poboljšanje oralne bioraspoloživosti flavonoida, spoznaje o oksidativnom metabolizmu posredovanom humanim jetrenim citokromima P450, a osobito o reakcijama demetilacije, dobivaju dodatno na važnosti. Na primjeru sakuranetina i prunetina vidljivo je da je djelovanjem citokroma P450 moguća i aromatska hidroksilacija u prisutnosti metoksilne skupine u strukturi, što može utjecati na pojavu drugih metaboličkih puteva osim demetilacije metiliranih flavonoida. Ovaj podatak vrlo je važan također i u kontekstu rasprave o doprinosu konjugativnih metaboličkih puteva ukupnom metabolizmu kako je ranije opisano na primjeru galangina. Aromatska hidroksilacija potpuno metiliranih flavonoida stvara mete za konjugaciju i na taj način može značajno utjecati na ukupni metabolizam i eliminaciju flavonoida iz organizma. Naposljetku, u ovom kontekstu rasprave o kompleksnosti metabolizma flavonoida valja još jednom istaknuti širinu dobivenog raspona rezultata oksidativnog metabolizma posredovanog humanim jetrenim citokromima P450 za ispitane flavonoide. Polovica ispitanih flavonoida nije niti pokazala metabolizam u uvjetima eksperimenta, a kinetički parametri određeni za flavonoide podložne metabolizmu posredovanom humanim jetrenim citokromima P450 dobiveni su u rasponu od tri reda veličine. Osim već spomenute visoke selektivnosti humanih citokroma P450 prema flavonoidima ranije u raspravi, ovakvi rezultati potvrđuju kompleksnost i specifičnost metabolizma flavonoida kakvu nalazimo i u dostupnoj literaturi, osobito kad razmišljamo i o drugim metaboličkim putevima koji mogu imati i veću važnost za pojedine flavonoide.

Upravo u tom smislu u kontekstu rezultata dobivenih u ovom istraživanju valja preispitati tezu o većoj važnosti konjugacijskih metaboličkih procesa za metabolizam flavonoida u usporedbi s oksidativnim metabolizmom posredovanim humanim citokromima P450 koju provlače T. Walle i suradnici na temelju rezultata svojih istraživanja [81,82]. Činjenica je, kako tvrdi ova grupa autora, da postoji vrlo malo dokaza za to da bi oksidacija većine

flavonoida mogla biti bitna *in vivo*. No, također postoji vrlo malo dokaza da su glukuronidacija i/ili sulfatacija flavonoida najvažniji metabolički procesi za većinu flavonoida, a to ističu i sami autori u svojim radovima. U uvodu smo već konstatirali da je vrlo malo dostupnih podataka o metabolizmu flavonoida *in vivo* kod ljudi. Većina spoznaja o konjugiranim metabolitima flavonoida dolazi nam iz istraživanja na životinjskim modelima na kojima su glukuronidni metaboliti dobro dokumentirani i opisani za nekolicinu flavonoida poput kvercetina, luteolina, krizina, flavonoida čaja i diosmetina [55]. Kod ljudi su u plazmi nađeni glukuronidni metaboliti kvercetina, hesperetina te nekolicine katehina i izoflavona [32]. S druge strane, izomerni slulfatirani metaboliti ne mogu se odijeliti i detektirati tekućinskom kromatografijom i to predstavlja glavni problem u istraživanju važnosti sulfatacije za flavonoide. Jasno je na temelju ovih istraživanja da su konjugacijski metabolički procesi vrlo bitni za metabolizam flavonoida. S druge strane, teško je na temelju trenutnih spoznaja i dostupnih eksperimentalnih modela *in vitro* i *in vivo* procjeniti doprinos svih metaboličkih procesa uključenih u metabolizam određenog flavonoida. Ako promotrimo samo gore opisani primjer galangina, čiji su metabolizam istražili Otake i suradnici [82] i stavimo ga u kontekst rezultata enzimske kinetike oksidacijskih reakcija posredovanih humanim jetrenim citokromima P450 istraženih u ovom radu, primijetit ćemo da je reakcija galangin → kemferol među prvih deset prema katalitičkoj učinkovitosti, točnije na devetom mjestu s omjerom k_{cat}/K_m u iznosu od $0{,}11 \times 10^6$ M^{-1} min^{-1}. Obzirom da je utvrđeno da mnoge metaboličke reakcije flavonoida imaju veće katalitičke učinkovitosti, a najučinkovitija gotovo 30 puta veću od ove, postavlja se pitanje je li odabrana reprezentativna reakcija za usporedbu s glukuronidacijom i sulfatacijom. I drugo, obzirom na širok raspon rezultata katalitičkih učinkovitosti pojedinih metaboličkih reakcija flavonoida, je li prikladno i dovoljno ispitati samo jednu reakciju i na temelju nje pokušati generalizirati. Rezultati ovog istraživanja ukazuju upravo na potrebu da se usporedba doprinosa pojedinih metaboličkih puteva napravi u širem rasponu flavonoidnih spojeva. Pri tome bi trebalo odabrati predstavnike iz različitih skupina flavonoida, te uključiti i one koji nemaju sve nesupstituirane hidroksilne skupine ili ih nemaju uopće i vidjeti bi li glukuronidacija i sulfatacija u tom slučaju bile i dalje preferirane i u kojoj mjeri.

Na kraju ovog razmatranja o važnosti drugih metaboličkih putova za flavonoide treba još jednom istaknuti da su istraživanja pokazala i to da se metaboliti prisutni u tkivima mogu razlikovati u odnosu na one prisutne u krvi [33-36]. Inicijalne studije na ljudskim tkivima također pokazuju da se koncentracije u plazmi ne mogu direktno povezati s koncentracijama u

ciljanim tkivima te da distribucija između krvi i tkiva varira za različite flavonoide. Ovdje se postavlja pitanje je li koncentracija flavonoida u plazmi točan biološki pokazatelj stvarne izloženosti [19].

I dok se ne rasvijetle ova i brojna druga otvorena pitanja u vezi bioraspoloživosti flavonoida i povezanosti s njihovim biološkim učincima, proučavanje flavonoida u različitim eksperimentalnim uvjetima *in vitro* i dalje su vrijedan i neizostavan izvor informacija koje mogu doprinijeti odgonetavanju kompleksne zagonetke zvane metabolizam flavonoida popunjavajući brojne praznine u ovom relativno slabo istraženom području. U tom smislu su i rezultati ovog istraživanja, osobito iz razloga što je pitanje oksidativnog metabolizma aglikona flavonoida posredovanog humanim jetrenim citokromima P450 sistematično obrađeno, vrijedan doprinos području metabolizma ksenobiotika.

6 ZAKLJUČAK

U ovom istraživanju razvijena je i opisana brza i pouzdana HPLC/Q-TOF-MS metoda za praćenje metabolizma flavonoida posredovanog humanim citokromima P450 te je uspješno primijenjena na većem broju odabranih flavonoidnih aglikona.

Od 30 ispitanih flavonoidnih aglikona, za njih 15 je zabilježen oksidativni metabolizam posredovan humanim jetrenim citokromima P450, dok su za njih 10 po prvi puta određeni parametri enzimske kinetike primijećenih metaboličkih reakcija. Oksidativni metabolizam posredovan humanim jetrenim citokromima P450 utvrđen je i opisan u ovom radu za sljedeće flavonoide: 3,7-dihidroksiflavon, 7-hidroksiflavon, akacetin, apigenin, diosmetin, flavon, galangin, genistein, hesperetin, kemferol, krizin, naringenin, prunetin, sakuranetin i tangeretin, a primijećene su dvije vrste metaboličkih reakcija: aromatska hidroksilacija i *O*-demetilacija. Izostanak metabolizma u uvjetima eksperimenta zabilježen je za 3,6-dihidroksiflavon, 6-hidroksiflavon, flavanon, izoramnetin, krizindimetileter, kvercetin, luteolin, miricetin, morin, pinocembrin, pinocembrin-7-metileter, ramnetin, tamariksetin i tektokrizin.

Za primijećene metaboličke reakcije flavonoida određeni su kinetički parametri k_{cat} (konstanta brzine katalize) i K_m na temelju kojih je izračunata konstanta specifičnosti (ili konstanta katalitičke učinkovitosti) definirana omjerom k_{cat}/K_m. Raspon dobivenih vrijednosti za k_{cat} bio je 0,021-14,2 pM min^{-1} pM^{-1} CYP-a. Vrijednost K_m dobivena je u rasponu 0,7-492 μM, a izračunate konstante specifičnosti k_{cat}/K_m kretale su se u rasponu (0,0015-2,9) × 10^6 M^{-1} min^{-1}. Širok raspon rezultata parametara enzimske kinetike primijećenih metaboličkih reakcija upućuje na relativno visoku selektivnost humanih jetrenih citokroma P450 prema određenim supstratima iz ove skupine spojeva. Ovom zaključku ide u prilog i činjenica da je za svega nekoliko rekombinantnih citokroma P450 (CYP1A2, CYPC19, CYP2D6, CYP2E1 i CYP3A4) utvrđena uloga u kataliziranju primijećenih metaboličkih reakcija ispitanih flavonoida. Činjenica da polovica odabranih flavonoidnih aglikona nije podlijegala metaboličkim promjenama u ovom istraživanju, također upućuje na visoku selektivnost humanih citokroma P450 prema flavonoidima kao supstratima pri čemu male razlike u strukturi molekule flavonoida mogu značajno utjecati na afinitet citokroma P450 prema ovoj skupini spojeva.

Usporedba s literaturnim podacima oksidativnog metabolizma flavonoida i lijekova općenito potvrđuje širok raspon vrijednosti katalitičkih učinkovitosti metaboličkih reakcija koje se mogu očekivati s flavonoidima kao susptratima humanih citokroma P450, te da se

metaboličke reakcije opisane u ovom radu nalaze u području katalitičke specifičnosti citokroma P450 koje može imati klinički značaj za metabolizam ispitanih flavonoida.

Enzim koji daleko najučinkovitije metabolizira ispitane flavonoide je CYP1A2. Od deset izdvojenih metaboličkih reakcija s najvećom katalitičkom učinkovitošću (najveći k_{cat}/K_m) prvih šest katalizira upravo CYP1A2, a uključuje sljedeće flavonoide: akacetin, 3,7-dihidroksiflavon, 7-hidroksiflavon, tangeretin, sakuranetin i apigenin (navedeni redom prema padajućoj katalitičkoj učinkovitosti njihovih metaboličkih reakcija). Ako se uzme u obzir da je CYP1A2 jedan od zastupljenijih citokroma P450 u jetri i jedan od važnijih enzima za metabolizam lijekova [15] te velike interindividualne razlike primjećene u ekspresiji/aktivnosti CYP1A2, utvrđene u rasponu i do 40 puta [15,80], rezultati ovog istraživanja sugeriraju da je zbog mogućih interakcija potreban dodatni oprez kod unosa ovih flavonoida i istovremene primjene lijekova koji se primarno metaboliziraju putem CYP1A2.

Rezultati ovog istraživanja potvrđuju kompleksnost i visoku selektivnost metabolizma flavonoida kod kojih i vrlo male razlike u strukturi mogu značiti potpuno različit metabolički put i biološku sudbinu. Pretpostavka da će potpuno metilirani flavonodi imati višu oralnu bioraspoloživost u odnosu na nemetilirane analoge [46,81], reakcijama demetilacije posredovanim humanim citokromima P450 daje dodatni značaj. Osobito je to važno za potpuno metilirane flavonoide čiji metabolički put može značajno biti promijenjen i usmjeren dominantno prema oksidaciji citokromima P450 [81]. Rezultati dobiveni u ovom istraživanju ukazuju na visoku selektivnost citokroma P450 prema metiliranim flavonoidima kao supstratima, slično kao i prema flavonoidima općenito. Reakcije demetilacije flavonoida posredovane humanim jetrenim citokromima P450 vrlo su učinkovite u odnosu na sve primijećene metaboličke reakcije u ovom istraživanju, a najčešće se zbivaju na položaju 4' prstena B te ujedno predstavljaju glavne metaboličke putove tih flavonoida.

Sustavan pristup istraživanju metabolizma flavonoida posredovanog humanim jetrenim citokromima P450, kojim je ispitan veći broj flavonoida uz fokusiranje samo na njihove aglikone u svrhu dobivanja što homogenijeg skupa uzoraka, omogućio je po prvi puta razvoj prediktivnih statističkih modela kojima su opisana jedinstvena strukturna obilježja odgovorna za metabolizam specifičnim citokromom P450 i koji omogućuju predviđanje mogućih metaboličkih putova i za flavonoide koji nisu bili predmetom ovog istraživanja.

Aromatska hidroksilacija preferirana je na položaju 4' prstena B, te također na položaju 3' prstena B, ako je u strukturi već prisutna hidroksilna skupina na položaju 4'. Na

nesupstituiranom prstenu B, preferirano mjesto hidroksilacije je 4'. Aromatska hidroksilacija moguća je i na položajima 6 i 8 prstena A, s tim da je položaj 6 preferiran u odnosu na položaj 8. Statistička povezanost prisutnosti 4'-metoksilne skupine, odnosno odsutnosti 3'-hidroksilne skupine u strukturi flavonoidnog aglikona s metabolizmom posredovanim humanim citokromima P450 utvrđena je na cijelom skupu podataka. Prisutnost dvije ili više hidroksilnih skupina na prstenu B čini se da sprječava daljnji metabolizam flavonoidnih aglikona posredovan humanim citokromima P450. Ovom zaključku dodatno ide u prilog rezultat statističke analize utjecaja fizikalno-kemijskih svojstava na karakteristike metabolizma ispitanih flavonoidnih aglikona posredovanog citokromom P450 1A2, kojom je utvrđeno da povećanje polarne površine flavonoida usporava njihov metabolizam. Ovaj rezultat je u skladu i s općim karakteristikama reakcija posredovanih citokromima P450 i njihovom preferencijom prema lipofilnijim supstratima. *O*-Demetilacija metoksilne skupine kod flavonoidnih aglikona preferirana je na položaju 4' prstena B, a moguća je i na prstenu A. Statistička analiza povezanosti strukturnih značajki i metabolizma posredovanog humanim citokromom P450 1A2 potvrdila je prethodna opća opažanja da je demetilacija metoksilne skupine preferirana na položaju 4' prstena B, te da prisutnost hidroksilne skupine na položaju 4' prstena B snažno utječe na dodatnu hidroksilaciju na položaju 3' prstena B. Dodatno je utvrđeno da prisutnost hidroksilne skupine na položaju 5 ili na položaju 6 prstena A ne pogoduje hidroksilaciji na položaju 4' prstena B, a prisutnost hidroksilne skupine na položaju 5 prstena A također ne pogoduje hidroksilaciji na položaju 6 istog prstena. Općenito vrijedi da CYP1A2 preferira lipofilnije flavonoide koji na položaju 4' imaju supstituiranu hidroksilnu ili metoksilnu skupinu i nisu supstituirani na položaju 5 prstena A.

Pronalazak najznačajnijih humanih jetrenih citokroma P450 odgovornih za biotransformaciju flavonoida, otkrivanje njihovih metabolita i određivanje odgovarajućih kinetičkih parametara omogućuje bolje razumijevanje metabolizma flavonoida i daje bolji uvid u njihovu metaboličku sudbinu nakon unosa u organizam i prvog prolaska kroz jetru. Dobiveni su rezultati stoga originalan i značajan doprinos boljem razumijevanju mehanizama bioloških učinaka flavonoida te njihovih potencijalnih interferencija s farmakološkim učincima lijekova. Bolje razumijevanje metabolizma flavonoida može pomoći u prevladavanju niske bioraspoloživosti flavonoida *in vivo* i usmjeriti napore istraživača prema pronalaženju flavonoida s povoljnim terapeutskim i metaboličkim profilom.

7 POPIS KRATICA I SIMBOLA

ADME – ukupnost složenih procesa koje nazivamo apsorpcija, distribucija, metabolizam i ekskrecija, engl. *absorption*, *distribution*, *metabolism and excretion*

AUC – površina (lijeka) ispod krivulje, engl. *area under curve*

C18 – vrsta kolone u tekućinskoj kormatografiji, na čestice silikagela stacionarne faze vezani su oktadecilni alkilni lanci

CD – cirkularni dikroizam, engl. *circular dichroism*

CGE – kapilarna gel-elektroforeza, engl. *capillary gel electrophoresis*

$C_{p,max}$ – najviša koncentracija lijeka u plazmi

CYP – citokrom P450

DME – enzimi koji sudjeluju u metabolizmu lijeka, engl. *drug-metabolising enzymes*

DMET – enzimi i transportni proteini koji sudjeluju u metabolizmu lijeka, engl. *drug-metabolizing enzymes and transporeters*

DMSO – dimetilsulfoksid

DNA – deoksiribonukleinska kiselina

EIC – kromatogram izdvojenog iona, engl. *extracted ion chromatogram*

EM – brzi metabolizator, engl. *extensive metabolizer*

ESI – ionizacija elektrosprejom, engl. *electrospray ionization*

ex. – eksperimentalno određena masa

FMO – flavinmonooksigenaza

G6P – glukoza-6-fosfat

G6PD – glukoza-6-fosfat dehidrogenaza

GC – plinska kromatografija, engl. *gas chromatography*

GS – NADPH-generirajući sustav

GST – glutation-*S*-transferaza

HCl – klorovodična kiselina

HLM – humani jetreni mikrosomi, engl. *human liver microsomes*

HOMO – najviša popunjena molekulska orbitala, engl. *highest occupied molecular orbital*

HPLC – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti, engl. *high performance liquid chromatography*

HRMS – spektrometrija masa visoke rezolucije, engl. *high-resolution mass spoctrometry*

IR – spektrometrija apsorpcije infracrvenog zračenja, engl. *infrared absorption spectrometry*

k_{cat} – konstanta brzine enzimske katalize

k_{cat}/K_m – katalitička učinkovitost enzima ili konstanta specifičnosti enzima

K_d – konstanta vezanja supstrata

K_m – Michaelis-Menteničina konstanta, koncentracija pri kojoj je postignuta ½ V_{max}.

LC-MS ili LC/MS – tekućinska kromatografija spregnuta sa spektrometrijom masa, engl. *liquid chromatography-mass spectrometry*

LDL – lipoproteini niske gustoće, engl. *low density lipoproteins*

LGA – lamarkijanski genetski algoritam, engl. *lamarckian genetic algorithm*

LUMO – najniža popunjena molekulska orbitala, engl. *lowest occupied molecular orbital*

m/*z* – omjer mase i naboja iona u spektrometriji masa

MAO – monoaminoksidaza

MAO – monoaminoksidaza

MCF-10A – normalne stanice tkiva dojke

MCF-7, MDA-MB 468 – stanične linije adenokarcinoma dojke

MeOH – metanol

MLM – mišji jetreni mikrosomi, engl. *mouse liver microsomes*

MLM induc. – inducirani mišji jetreni mikrosomi

MS – spektrometrija masa, engl. *mass spectrometry*

NAD – nikotinamidadenindinukleotidfosfat

NADPH – reducirani oblik nikotinamidadenindinukleotidfosfata

NAT – *N*-acetiltransferaza

NMR – spektrometrije magnetske rezonancije jezgre, engl. *nuclear magnetic resonance spectrometry*

$\overline{P}$ – prosječna količina metabolita nastalog u inkubacijama bez dodanog inhibitora

$\overline{P_i}$ – prosječna količina metabolita nastalog u inkubacijama s dodanim inhibitorom

P-gp – P-glikoprotein

PM – spori metabolizator, engl. *poor metabolizer*

PSA – polarna površine (molekule), engl. *polar surface area*

Q-TOF-MS – detektor spektrometrije masa s kvadrupolnim analizatorom i analizatorom vremena leta, engl. *quadrupole time-of-flight mass spectrometry detector*

RLM – štakorski jetreni mikrosomi, engl. *rat liver microsomes*

RLM induc. – inducirani štakorski jetreni mikrosomi

RMSD – korijen srednje kvadratne devijacije, engl. *root-mean-square-deviation*

RNA – ribonukleinska kiselina

ROS – reaktivni kisikovi spojevi, engl. *reactive oxygen species*

RT – vrijeme zadržavanja na koloni, engl. *retention time*

SA – simulirano traženje globalnog minimuma, engl. *simulated annealing*

SAR – povezanost strukture i djelovanja, engl. *structure-activity relationship*

SULT – sulfotransferaza

th. – teoretska masa

TLC – tankoslojna kromatografija, engl. *thin-layer chromatography*

UGT – glukuronoziltransferaza

UPLC – tekućinska kromatografija ultra-visoke djelotvornosti, engl. *ultra-performance liquid chromatography*

UV – ultraljubičasto zračenje (odnosi se na područje spektra elektromagnetskog zračenja koje karakteriziraju valne duljine od približno 10 do 400 nm), engl. *ultraviolet*

UV-Vis – spektrometrija apsorpcije ultraljubičastog i vidljivog zračenja

V_{max} – najveća brzina enzimske katalize

ΔG – promjena slobodne energije

8 LITERATURA

1. A. M. Yua, M. Ingelman-Sundbergb, N. J. Cherrington, L. M. Aleksunes, U. M. Zanger, W. Xie, H. Jeong, E. T. Morgan, P. J. Turnbaugh, C. D. Klaassen, A. P. Bhattl, M. R. Redinbo, P. Hao, D. J. Waxman, L. Wang, X. Zhong. Regulation of drug metabolism and toxicity by multiple factors of genetics, epigenetics, lncRNAs, gut microbiota, and diseases: a meeting report of the 21st International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations (MDO). Acta Pharm Sin B 7 (2017) 241-248.

2. E. Croom. Metabolism of xenobiotics of human environments. Prog Mol Biol Transl Sci 112 (2012) 31-88.

3. A. Parkinson, B. W. Ogilvie. Biotransformation of xenobiotics. U: C. D. Klaassen, J. B. Watkins, L. J. Casarett. Casarett & Doull's Essentials of Toxicology, Second Edition, McGraw-Hill Medical Pub. Division, New York, 2010.

4. K. R. Iyer, M. W. Sinz. Characterization of Phase I and Phase II hepatic drug metabolism activities in a panel of human liver preparations. Chem-Biol Interact 118 (1999) 151-169.

5. P. Olinga, M. G. L. Elferink, A. L. Draaisma, M. T. Merema, J. V. Castell, G. Pérez, G. M. M. Groothuis. Coordinated induction of drug transporters and phase I and II metabolism in human liver slices. Eur J Pharm Sci 33 (2008) 380-389.

6. M. J. Zamek-Gliszczynski, K. A. Hoffmaster, K. Nezasa, M. N. Tallman, K. L. R. Brouwer. Integration of hepatic drug transporters and phase II metabolizing enzymes: Mechanisms of hepatic excretion of sulfate, glucuronide, and glutathione metabolites. Eur J Pharm Sci 27 (2006) 447-486.

7. D. K. Sevior, O. Pelkonen, J. T. Ahokas. Hepatocytes: The powerhouse of biotransformation. Int J Biochem Cell Biol 44 (2012) 257-261.

8. C. Xu, C. Y. Li, A. N. Kong. Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. Arch Pharm Res 28 (2005) 249-268.

9. U. M. Zanger, M. Schwab. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. Pharmacol Therapeut 138 (2013) 103-141.

10. E. Delaporte, A. D. Rodrigues. Cytochrome P450 Assays. Curr Protoc Pharmacol 15 (2002) 3.9.1-3.9.32.

11. K. Bavishi, T. Laursen, K. L. Martinez, B. Lindberg Møller, E. A. Della Pia. Application of nanodisc technology for direct electrochemical investigation of plant cytochrome P450s and their NADPH P450 oxidoreductase. Sci Rep 6 (2016) 29459.

12. F. P. Guengerich. Cytochrome P450 and Chemical Toxicology. Chem Res Toxicol 21 (2008) 70-83.

13. F. P. Guengerich. Analysis and Characterization of Enzymes and Nucleic Acids Relevant to Toxicology. U: A. W. Hayes. Principles and Methods of Toxicology, Fifth Edition, Informa Healthcare Inc., New York, 2014.

14. R. L. P. Lindberg, M. Negishi. Alteration of mouse cytochrome $P450_{coh}$ substrate specificity by mutation of a single amino-acid residue. Nature 339 (1989) 632-634.

15. F. P. Guengerich. Human cytochrome P450 enzymes. U: P. R. Ortiz de Montellano, ed., Cytochrome P450: Structrue, Mechanism, and Biochemistry, Četvrto izdanje, Springer, Cham, 2015.

16. F. P. Guengerich. Mechanisms of Enzyme Catalysis and Inhibition. U: C. A. McQueen, Comprehensive Toxicology, Third Edition, Vol. 10, pp. 45-53, Elsevier Ltd., Oxford, 2018.

17. J. A. Yáñez, P. K. Andrews, N. M. Davies. Methods of analysis and separation of chiral flavonoids. J Chromatogr B 848 (2007) 159-181.

18. J. Xiao, P. Högger. Metabolism of Dietary Flavonoids in Liver Microsomes. Curr Drug Metab 14 (2013) 381-391.

19. C. Manach, A. Scalbert, C. Morand, C. Rémésy, L. Jiménez. Polyphenols: food sources and bioavailability. Am J Clin Nutr 79 (2004) 727-47.

20. B. H. Havsteen. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. Pharmacol Therapeut 96 (2002) 67– 202.

21. Y. J. Moon, X. Wang, M. E. Morris. Dietary flavonoids: Effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. Toxicol In Vitro 20 (2006) 187-210.

22. K. E. Heim, A. R. Tagliaferro, D. J. Bobilya. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. J Nutr Biochem 13 (2002) 572-584.

23. A. N. Panche, A. D. Diwan, S. R. Chandra. Flavonoids: an overview. J Nutr Sci 5 (2016) 1-15.

24. M. Bojić, Ž. Debeljak, M. Tomičić, M. Medić-Šarić, S. Tomić. Evaluation of antiaggregatory activity of flavonoid aglycone series. Nutr J 10 (2011) 73.

25. M. Bojić, Ž. Debeljak, M. Medić-Šarić, M. Tomičić. Interference of selected flavonoid aglycons in platelet aggregation assays. Clin Chem Lab Med 50 (2012) 1403-1408.

26. M. Barbarić, K. Mišković, M. Bojić, M. Baus Lončar, A. Smolčić-Bubalo, Ž. Debeljak, M. Medić-Šarić. Chemical composition of the ethanolic propolis extracts and its effect on HeLa cells. J Ethnopharmacol 135 (2011) 772-778.

27. V. Rastija, M. Medić-Šarić. QSAR study of antioxidant activity of wine polyphenols. Eur J Med Chem 44 (2009) 400-408.

28. V. Rastija, M. Medić-Šarić. QSAR modeling of anthocyanins, anthocyanidins and catechins as inhibitors of lipid peroxidation using three-dimensional descriptors. Med Chem Research 18 (2009) 579-588.

29. I. Mudnić, D. Modun, V. Rastija, J. Vuković, I. Brizić, V. Katalinić, B. Kozina, M. Medić-Šarić, M. Boban. Antioxidative and vasodilatory effects of phenolic acids in wine. Food Chem 119 (2010) 1205-1210.

30. J. Viskupičová, M. Ondrejovič, E. Šturdík. Bioavailability and metabolism of flavonoids. J Food Nutr Res 47 (2008) 151-162.

31. A. Scalbert, G. Williamson. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. J Nutr 130 (2000) 2073-2085.

32. C. Manach, G. Williamson, C. Morand, A. Scalbert, C. Rémésy. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. Am J Clin Nutr 81 (2005) 230-242.

33. K. A. Youdim, M. S. Dobbie, G. Kuhnle, A. R. Proteggente, N. J. Abbott, C. Rice-Evans. Interaction between flavonoids and the blood-brain barrier: in vitro studies. J Neurochem 85 (2003) 180-192.

34. W. A. Fritz, L. Coward, J. Wang, C. A. Lamartiniere. Dietary genistein: perinatal mammary cancer prevention, bioavailability and toxicity testing in the rat. Carcinogenesis 19 (1998) 2151-2158.

35. H. C. Chang, M. I. Churchwell, K. B. Delclos, R. R. Newbold, D. R. Doerge. Mass spectrometric determination of Genistein tissue distribution in diet-exposed Sprague-Dawley rats. J Nutr 130 (2000) 1963-1970.

36. J. Wang, I. E. Eltoum, C. A. Lamartiniere. Dietary genistein suppresses chemically induced prostate cancer in Lobund-Wistar rats. Cancer Lett 186 (2002) 11-18.

37. V. P. Androutsopoulos, A. Papakyriakou, D. Vourloumis, D. A. Spandidos. Comparative CYP1A1 and CYP1B1 substrate and inhibitor profile of dietary flavonoids. Bioorg Med Chem 19 (2011) 2842-28.

38. S. E. Nielsen, V. Breinholt, U. Justesen, C. Cornett, L. O. Dragsted. In vitro biotransformation of flavonoids by rat liver microsomes. Xenobiotica 28 (1998) 389-401.

39. V. M. Breinholt, E. A. Offord, C. Brouwer, S. E. Nielsen, K. Brøsen,T. Friedberg. In vitro investigation of cytochrome P450-mediated metabolism of dietary flavonoids. Food Chem Toxicol 40 (2002) 609-616.

40. A. Gradolatto, M. C. Canivenc-Lavier, J. P. Basly, M. H. Siess, and C. Teyssier. Metabolism of apigenin by rat liver phase I and phase II enzymes and by isolated perfused rat liver. Drug Metab Dispos 32 (2004) 58-65.

41 V. Androutsopoulos, N. Wilsher, R. R. J. Arroo, G. A. Potter. Bioactivation of the phytoestrogen diosmetin by CYP1 cytochromes P450. Cancer Lett 274 (2009) 54-60.

42 V. P. Androutsopoulos, S. Mahale, R. R. J. Arroo, G. Potter. Anticancer effects of the flavonoid diosmetin on cell cycle progression and proliferation of MDA-MB 468 breast cancer cells due to CYP1 activation. Oncol Rep 21 (2009) 1525-1528.

43 V. P. Androutsopoulos, K. Ruparelia, R. R. J. Arroo, A. M. Tsatsakis, D. A. Spandidos. Toxicology CYP1-mediated antiproliferative activity of dietary flavonoids in MDA-MB-468 breast cancer cells. Toxicology 264 (2009) 162-170.

44. S. E. Nielsen, V. Breinholt, C. Cornett, L. O. Dragsted. Biotransformation of the citrus flavone tangeretin in rats. Identification of metabolites with intact flavane nucleus. Food Chem Toxicol 38 (2000) 739-746.

45. V. M. Breinholt, S. E. Rasmussen, K. Brøsen, T. H. Friedberg. In vitro metabolism of genistein and tangeretin by human and murine cytochrome P450s. Pharmacol Toxicol 93 (2003) 14-22.

46. T. Walle. Methylation of dietary flavones increases their metabolic stability and chemopreventive effects. Int J Mol Sci 10 (2009) 5002-5019.

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

48. S. E. Kulling, D. M. Honig, M. Metzler. Oxidative metabolism of the soy isoflavones daidzein and genistein in humans in vitro and in vivo. J Agric Food Chem 49 (2001) 3024-3033.

49. S. E. Kulling, D. M. Honig, T. J. Simat, M. Metzler. Oxidative in vitro metabolism of the soy phytoestrogens daidzein and genistein. J Agric Food Chem 48 (2000) 4963-4972.

50. S. E. Kulling, L. Lehmann, M. Metzler. Oxidative metabolism and genotoxic potential of major isoflavone phytoestrogens. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 777 (2002) 211-218.

51. M. Hu, K. Krausz, J. Chen, X. Ge, J. Li, H. L. Gelboin, F. J. Gonzalez. Identification of CYP1A2 as the main isoform for the phase I hydroxylated metabolism of genistein and a prodrug converting enzyme of methylated isoflavones. Drug Metab Dispos 31 (2003) 924-931.

52. J. Bursztyka, E. Perdu, J. Tulliez, L. Debrauwer, G. Delous, C. Canlet, G. De Sousa, R. Rahmani, E. Benfenati, J. P. Cravedi. Comparison of genistein metabolism in rats and humans using liver microsomes and hepatocytes. Food Chem Toxicol 46 (2008) 939-948.

53. K. M. Atherton, E. Mutch, D. Ford. Metabolism of the soyabean isoflavone daidzein by CYP1A2 and the extra-hepatic CYPs 1A1 and 1B1 affects biological activity. Biochem Pharmacol 72 (2006) 624-631.

54. H. Doostdar, M. D. Burke, R. T. Mayer. Bioflavonoids: selective substrates and inhibitors for cytochrome P450 CYP1A and CYP1B1. Toxicology 144 (2000) 31-38.

55. T. Walle. Absorption and metabolism of flavonoids. Free Radic Biol Med 36 (2004) 829-837.

56. F. P. Guengerich. Experimental Approaches to Analysis of Reactions of Cytochrome P450 Enzymes. U: J. Kirchmair. Drug Metabolism Prediction, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2014.

57. Q. Zhang, K. S. Raheem, N. P. Botting, A. M. Z. Slawin, C. D. Kay, D. O'Hagan. Flavonoid metabolism: the synthesis of phenolic glucuronides and sulfates as candidate metabolites for bioactivity studies of dietary flavonoids. Tetrahedron 68 (2012) 4194-4201.

58. J. M. Young, W. Xiaodong, E. M. Marilyn. Dietary flavonoids: Effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. Toxicol In Vitro 20 (2006) 187-210.

59. Y. Kimura, H. Ito, R. Ohnishi, T. Hatano. Inhibitory effects of polyphenols on human cytochrome P450 3A4 and 2C9 activity. Food Chem Toxicol 48 (2010) 429-435.

60. C. D Sohl, Q. Cheng, F. P. Guengerich. Chromatographic assays of drug oxidation by human cytochrome P450 3A4. Nat Protoc 4 (2009) 1252-1257.

61. R Core Team (2017). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL https://www.R-project.org/

62. Andrej-Nikolai Spiess (2014). propagate: Propagation of Uncertainty. R package version 1.0-4. URL https://CRAN.R-project.org/package=propagate

63. H. Rimac. Interakcije flavonoida i odabranih ksenobiotika pri vezanju na humani serumski albumin. Doktorski rad. Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb, 2017.

64. R Core Team, R: A language and environment for statistical computing, (2018). URL https://www.R-project.org/.

65. RStudio, RStudio: Integrated development environment for R, (2018).

66. G. M. Morris, R. Huey, W. Lindstrom, M. F. Sanner, R. K. Belew, D. S. Goodsell, et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. J Comput Chem 30 (2009) 2785-2791.

67. S. Sansen, J. K. Yano, R. L. Reynald, G. A. Schoch, K. J. Griffin, C. D. Stout, et al. Adaptations for the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons exhibited by the structure of human P450 1A2. J Biol Chem 282 (2007) 14348-14355.

68. L. R. A. Rougée, M. A. Mohutsky, D. W. Bedwell, K. J. Ruterbories, S. D. Hall. The impact of the hepatocyte-to-plasma pH gradient on the prediction of hepatic clearance and drug-drug interactions for CYP2C9 and CYP3A4 substrates. Drug Metab Dispos 45 (2017) 1008-1018.

69. C.-M. Ionescu, D. Sehnal, F. L. Falginella, P. Pant, L. Pravda, T. Bouchal, et al. AtomicChargeCalculator: Interactive web-based calculation of atomic charges in large biomolecular complexes and drug-like molecules. J Cheminform 7 (2015) 1-13.

70. R. Huey, G. M. Morris, A. J. Olson, D. S. Goodsell. A semiempirical free energy force field with charge-based desolvation. J Comput Chem 28 (2007) 1145-1152.

71. M. Medić-Šarić, V. Rastija, M. Bojić. Recent Advances in the Application of High Performance Liquid Chromatography in the Analysis of Polyphenols in Wine and Propolis. J AOAC Int 94 (2011) 32-42.

72. M. Barbarić, K. Mišković, M. Bojić, M. Baus Lončar, A. Smolčić-Bubalo, Ž. Debeljak, M. Medić-Šarić. Chemical composition of the ethanolic propolis extracts and its effect on HeLa cells. J Ethnopharmacol 135 (2011) 772-778.

73. R. Kostiainen, T. J. Kauppila. Effect of eluent on the ionization process in liquid chromatography-mass spectrometry. J Chromatogr A 1216 (2009) 685-699.

74. F. Cuyckens, M. Claeys. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. J Mass Spectrom 39 (2004) 1-15.

75. J. K. Prasain, C.-C. Wang, S. Barnes. Flavonoids and Isoflavones (Photoestrogens): Absorption, Metabolism, and Bioactivity. Free Radic Biol Med 37 (2004) 1324-1350.

76. R. Flamini, P. Traldi. Mass spectrometry in grape and wine chemistry. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2010.

77. D. Tsimogiannis, M. Samiotaki, G. Panayotou, V. Oreopoulou. Characterization of Flavonoid Subgroups and Hydroxy Substitution by HPLC-MS/MS. Molecules 12 (2007) 593-606.

78. B. C. Roberts, R. L. Mancera. Ligand-protein docking with water molecules. J Chem Inf Model 48 (2008) 397-408.

79. C. De Graaf, P. Pospisil, W. Pos, G. Folkers, N. P. E. Vermeulen. Binding mode prediction of cytochrome P450 and thymidine kinase protein-ligand complexes by consideration of water and rescoring in automated docking. J Med Chem 48 (2005) 2308-2318.

80. M. S. Faber, A. Jetter, U. Fuhr. Assessment of CYP1A2 activity in clinical practice: why, how, and when?. Basic Clin Pharmacol Toxicol 97 (2005) 125-134.

81. X. Wen, T. Walle. Methylation protects dietary flavonoids from rapid hepatic metabolism. Xenobiotica 36 (2006) 387-397.

82. Y. Otake, F. Hsieh, T. Walle. Glucuronidation versus oxidation of the flavonoid galangin by human liver microsomes and hepatocytes. Drug Metab Dispos 30 (2002) 576-581.

83. Y. Moon, S. Y. Kim, H. Y. Ji, Y. K. Kim, H.-J. Chae, S.-W. Chae, H. S. Lee. Characterization of cytochrome P450s mediating ipriflavone metabolism in human liver microsomes. Xenobiotica 37 (2007) 246-259.

84. J. Y. Reginster. Ipriflavone: Pharmacological properties and usefulness in postmenopausal osteoporosis. Bone Miner 23 (1993) 223-232.

85. K. A. Head. Ipriflavone: An important bone-building isoflavone. Altern Med Rev 4 (1999) 10-22.

86. S. Benvenuti, A. Tanini, U. Frediani, S. Bianchi, L. Masi, R. Casano, L. Bufalino, M. Serio, M. L. Brandi. Effects of ipriflavone and its metabolites on a clonal osteoblastic cell line. J Bone Miner Res 6 (1991) 987-996.

87. S. L. Cheng, S. F. Zhang, T. L. Nelson, P. M. Warlow, R. Civitelli. Stimulation of human osteoblast differentiation and function by ipriflavone and its metabolites. Calcif Tissue Int 55 (1994) 356-362.

88. C. T. Bassleer, P. P. Franchimont, Y. E. Henrotin, N. M. Franchimont, V. G. Geenen, J. Y. Reginster. Effects of ipriflavone and its metabolites on human articular chondrocytes cultivated in clusters. Osteoarthritis Cartilage 4 (1996) 1-8.

89. M. Giossi, P. Caruso, M. Civelli, S. Bongrani. Inhibition of parathyroid hormone-stimulated resorption in cultured fetal rat long bones by the main metabolites of ipriflavone. Calcif Tissue Int 58 (1996) 419-422.

90. H. Zhou, P. D. Josephy, D. Kim, F. P. Guengerich. Functional characterization of four allelic variants of human cytochrome P450 1A2. Arch Biochem Biophys 422 (2004) 23-30.

91. Z. F. Cui, P. He, M. Luo, S. Q. Xia, M. C.Wu. Phenacetin *O*-deethylation in extrahepatic tissues of rats. Eur J Drug Metab Pharmacokinet 27 (2002) 107-111.

92. A. Ghosal, S. K. Chowdhury, W. Tong, N. Hapangama, Y. Yuan, A.-D. Su, S. Zbaida. Identification of human liver cytochrome P450 enzymes responsible for the metabolism of lonafarnib (Sarasar). Drug Metab Dispos 34 (2006) 628-635.

93. Public summary of opinion on orphan designation. Committee for Orphan Medicinal Products EMA/COMP/18107/2014.

94. T. Walle, U. K. Walle, P. V. Halushka. Carbon dioxide is the major metabolite of quercetin in humans. J Nutr 131 (2001) 2648-2652.

95. L. A. Griffiths, A. Barrow. Metabolism of flavonoid compounds in germ-free rats. Biochem J 130 (1972) 1161-1162.

9 PRILOZI

Ovaj dodatak sadrži dva znanstvena rada objavljena u časopisima zastupljenima u bazi *Web of Science Core Collection* koji obrađuju problematiku iznesenu u ovom doktorskom radu:

1. **G. Benković**, H. Rimac, Ž. Maleš, S. Tomić, Z. Lončar, M. Bojić. Characterization of *O*-demethylations and aromatic hydroxylations mediated by cytochromes P450 in the metabolism of flavonoid aglycons. Croat Chem Acta 92 (2019) 115-123.
2. **G. Benković**, M. Bojić, Ž. Maleš, S. Tomić. Screening of flavonoid aglycons' metabolism mediated by the human liver cytochromes P450. Acta Pharm 69 (2019) 541-562.

PRILOG 1

G. Benković, H. Rimac, Ž. Maleš, S. Tomić, Z. Lončar, M. Bojić. Characterization of *O*-demethylations and aromatic hydroxylations mediated by cytochromes P450 in the metabolism of flavonoid aglycons. Croat Chem Acta 92 (2019) 115-123.

ORIGINAL SCIENTIFIC PAPER

CROATICA CHEMICA ACTA

Croat. Chem. Acta **2019**, 92(1), 115–123
Published online: July 3, 2019
DOI: 10.5562/cca3528

Characterization of *O*-demethylations and Aromatic Hydroxylations Mediated by Cytochromes P450 in the Metabolism of Flavonoid Aglycons

Goran Benković,[1] Hrvoje Rimac,[2] Željan Maleš,[3] Siniša Tomić,[1] Zoran Lončar,[4] Mirza Bojić[2,*]

[1] Agency for Medicinal Products and Medical Devices, Kuavenska cesta 4, HR-10000 Zagreb, Croatia
[2] University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry, Department of Pharmaceutical Chemistry, A. Kovačića 1, HR-10000 Zagreb, Croatia
[3] University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry, Department of Pharmaceutical Botany, Schrottova 39, HR-10000 Zagreb, Croatia
[4] Clinic of Traumatology, Clinical Hospital Center Sisters of Charity, Draškovićeva 19, HR-10000 Zagreb, Croatia
* Corresponding author's e-mail address: mbojic@pharma.hr

RECEIVED: June 1, 2019 ★ REVISED: June 18, 2019 ★ ACCEPTED: June 24, 2019

Abstract: One of the most important groups of metabolic enzymes is cytochrome P450 superfamily. These enzymes are important in terms of the catalytic diversity and the large number of xenobiotics that are detoxified or activated by converting to reactive metabolites. Flavonoids are xenobiotics to which humans are exposed through diet. Data on their oxidative metabolism mediated by cytochromes P450 are limited. The aim of this study was to determine the enzymatic kinetics of *O*-demethylation and aromatic hydroxylation of flavonoid aglycons on recombinant cytochrome P450 enzymes and human liver microsomes systems. The study was performed on ten flavonoids, namely 3,7-dihydroxyflavone, 7-hydroxyflavone, acacetin, apigenin, flavone, galangin, kaempferol, naringenin, sakuranetin, and tangeretin using liquid chromatography coupled with mass spectrometry and UV detector. Most relevant enzyme involved in metabolism of flavonoid aglycons is CYP1A2, and its catalytic effectiveness ranges from 0.5 to 2.9×10^6 M^{-1} min^{-1}. Having in mind high expression and involvement of CYP1A2 in metabolism of xenobiotics including drugs, and its intraindividual differences in expression and activity, potential of drug-flavonoid competitive interactions/inhibitions should be considered when consuming dietary supplement and foods rich in flavonoids.

Keywords: flavonoids, human liver microsomes, cytochromes P450, enzyme kinetics.

INTRODUCTION

METABOLISM is one of the ways by which human organisms protect themselves from foreign substances i.e. xenobiotics. Xenobiotics are usually biotransformed to more soluble metabolites susceptible to elimination.[1] One of the most important groups of metabolic enzymes is cytochrome P450 superfamily. These enzymes are important in terms of the catalytic diversity and the large number of xenobiotics that are detoxified or activated by converting to reactive metabolites.[1,2] Although present in all tissues, the highest concentration of cytochrome P450 involved in biotransformation of xenobiotics is found in liver endoplasmic reticulum (microsomes).

The liver microsomal cytochrome P450 have important role in determining the intensity and duration of the drug effect and also play a key role in the detoxification of xenobiotics.[2] The total number of cytochrome P450 substrates reaches several thousand. Such a wide spectrum of substrates is partly due to high number of cytochromes (57 in humans), and promiscuity in substrate selection. On one side, the cytochrome P450 enzyme system has a role in the metabolism of specific endogenous substrates such as fatty acids, steroid hormones and eicosanoids. While this is mainly attributed to mitochondrial cytochrome P450, microsomal cytochromes P450 have a main purpose to clean the body from ingested foreign substances such as terpenes, alkaloids, pyrolysis products, and other xenobiotics.[1–3]

Cytochromes P450 are major enzymes involved in drug metabolism. Metabolism of 75 % of all known small molecule drugs is mediated by cytochromes P450. Out of

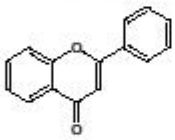
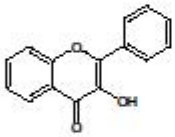
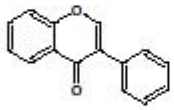
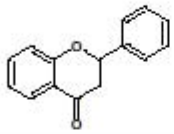
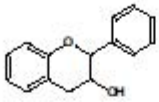
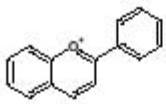
This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.

that number 90 % of oxidoreductions is mediated by CYP3A4/5, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2C8, and CYP1A2.[4]

Flavonoids are xenobiotics to which we are exposed through diet. They represent low molecular weight polyphenol compounds characterized by the benzo-γ-pyrone (chromane) structure. Based on the modifications of benzo-γ-pyrone core, flavonoids are divided into six major subgroups (Table 1).[5–10]

Most of the beneficial effects of flavonoids on human health are attributed to their antioxidant and healing properties. Flavonoids exhibit unique cardio-protective effects due to their ability to inhibit lipid-mediated low density lipoproteins (LDL) oxidation. The protective role of diet rich in flavonoids has been demonstrated in several major prognostic studies. For example, it has been shown that a greater intake of flavonoids in the body lowers mortality due to coronary heart disease and lower incidence of myocardial infarction in older males. In postmenopausal women, the risk of coronary heart disease was reduced by 38 %.[9] Flavonoids can affect platelet aggregation at concentrations that can be achieved in the blood after consumption of foods rich in polyphenols.[11] Flavonoids can also interfere the results of

Table 1. Clasification, examples, structural characteristics and dietary sources of flavonoids. Flavonoids marked in bold have been analysed in this study

Class	Basic structure	Flavonoid	Substituents	Food sources
Flavones		**Acacetin** **Apigenin** Baikalein Chrysin Diosmetin Luteolin **Tangeretin**	5,7-OH-4'-OCH_3 5,7,4'-OH 5,6,7-OH 5,7-OH 5,7,3'-OH-4'-OCH_3 5,7,3',4'-OH 5,6,7,8,4'-OCH_3	fruits, parsley, celery, red peppers, tomato sauce, honey, propolis
Flavonols		**Galangin** **Kaempferol** Morin Myricetin Quercetin	3,5,7-OH 3,5,7,4'-OH 3,5,7,2',4'-OH 3,5,7,2',3',4'-OH 3,5,7,3',4'-OH	green leek,, kale, broccoli, salad, grapefruit, black tea, red onion, black wine, apple, berry fruits
Isoflavones		Genistein Diadzein Formononetin	5,7,4'-OH 7,4'-OH 7-OH-4'-OCH_3	peas, soya and other legumes
Flavanones		Eriodictyol Hesperetin Homoeriodictyol **Naringenin**	5,7,3',4'-OH 5,7,3'-OH-4'-OCH_3 5,7,4'-OH-3'-OCH_3 5,7,4'-OH	citruses (grapefruit, lemon, orange)
Flavanols		Catechin Epicatechin	3,5,7,3',4'-OH 3,5,7,3',4'-OH	tea (black and green), cocoa, chocolate, blueberry, black wine, hazelnut
Anthocyanidins		Cyanidin Apigenidin	3,5,7,3',4'-OH 5,7,4'-OH	coloured fruits, cherry, raspberry, strawberry

diagnostic functional assays (platelet aggregation induced by ristocetine and arachidonic acid), and show antitumoral, antioxidative and vasodilatory effects.[13–16] There are numerous other pharmacological effects of flavonoids described in the literature such as positive effects on capillary permeability and hypolipemic, antihypertensive, antimicrobial, antiviral, antiallergic, anti-inflammatory, antineoplastic, and hepatoprotective effects.[7,17]

Although the number of known flavonoids is extremely high, over 4000, most flavonoids have not been characterized in terms of biological effects, and knowledge about metabolism is known only for the most common dietary flavonoids.[18–33] In the previous study, screening of metabolic reactions mediated by cytochrome P450 was conducted on thirty flavonoid aglycons, most commonly found in medicinal plants and propolis.[34] Flavonoid aglycons are subject to *O*-demethylation and aromatic hydroxylation reactions, and their metabolism includes cytochrome P450, predominantly CYP1A2.[34] The aim of this study was to determine the enzymatic kinetics of *O*-demethylation and aromatic hydroxylation of flavonoid aglycons that have been shown to be susceptible to the metabolism mediated by human liver cytochromes P450 in the previously reported screening analysis.[34] The study was performed on ten flavonoids, namely 3,7-dihydroxyflavone, 7-hydroxyflavone, acacetin, apigenin, flavone, galangin, kaempferol, naringenin, sakuranetin, and tangeretin using the recombinant cytochrome P450 enzymes and human liver microsomes. Reactions were monitored using the liquid chromatography coupled with mass spectrometer and UV detector.

EXPERIMENTAL SECTION

Chemicals and Enzymes

Flavonoids used in this study (3,7-dihydroxyflavone, 7-hydroxyflavone, acacetin, apigenin, galangin, kaempferol, naringenin, pinocembrin, sakuranetin, and tangeretin) were acquired commercially from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Human liver microsomes (HLM), and recombinant cytochromes P450 (CYP3A4, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2C8, and CYP1A2) coexpressed with NADPH cytochrome P450 reductase and cytochrome b_5 in baculosomes were obtained from Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA.

Glucose-6-phosphate (G6P), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) and NADP disodium salt were purchased from Sigma Aldrich. Potassium phosphate (p.a.) and concentrated hydrochloric acid (p.a.) were purchased from Kemika d.d. (Zagreb, Croatia). Acetonitrile for chromatography was purchased from Merck KGaA (Darmstadt, Germany). Ultra-pure water was produced using Arium comfort combined water production system from Sartorius AG (Goettingen, Germany).

Incubations for Characterization of Metabolic Reactions Mediated by Human Liver Microsomes

Evaluation of enzyme kinetics was conducted using human liver microsomes (HLM) as source of enzyme. A range of concentrations from 2 to 200 μM flavonoid aglycons (2–800 μM in experiment with 3,7-dihydroxyflavone and 7-hydroxyflavone) was prepared; appropriate aliquots of 20 mM flavonoid methanolic solution were transferred to glass tubes and evaporated to dryness on a water bath equipped with mechanical shaking. After evaporation of the solvent, a 100 μL incubation mixture was prepared in each of the tubes by adding human liver microsomes (HLM, amount corresponding to 100 pmol cytochrome P450 enzyme), 50 mM potassium phosphate buffer pH 7.4 and ultra-pure water. Generating system containing glucose-6-phosphate, $NADP^+$ and glucose-6-phosphate dehydrogenase in a ratio of 100:50:2 (*V*/*V*/*V*) was used as a source of coenzyme, and its addition marked the beginning of the reaction (15 % volume in final incubation, *V*/*V*). In the negative control, 15 μL of ultra-pure water was added instead of generating system. After 15 minutes at 37 °C of incubation in water bath with mechanical shaking, the reaction was stopped by adding 60 μL of a mixture of acetonitrile and 25 % hydrochloric acid solution in a ratio of 5:1 (*V*/*V*). After stopping the reaction, each incubation mixture was centrifuged at 10,000 rpm for 10 minutes in a MiniSpin centrifuge (Eppendorf AG, Hamburg, Germany). The pure supernatant was transferred to the HPLC vial and analyzed on LC/MS/UVD.

Incubations for Characterization of Metabolic Reactions Mediated by Recombinant Cytochromes P450

Incubations with recombinant cytochromes P450 were conducted in the same manner as with the human liver microsomes. Instead of human liver microsomes, cytochromes P450 were used in incubations (10 pmol of CYP3A4 and CYP2D6 in experiment with 7-hydroxyflavone and CYP2C19 in the experiment with galangin; otherwise 3 pmol). Other incubation components were used in the same concentrations as stated above i.e. 50 mM potassium phosphate buffer pH 7.4, and 15 % volume of generating system. Volume of ulta-pure water was adjusted to final volume of 100 μL. Reaction was stopped and samples prepared for the LC/MS/UVD analysis, as described above.

HPLC-MS-UV Analysis

High performance liquid chromatography (HPLC) coupled

with ultraviolet detector (UV) and mass spectrometer (MS) was performed on the Agilent 1200 RR (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) LC system coupled to Agilent 6530 Accurate Mass Q-TOF LC/MS Agilent Technologies (Waldbronn, Germany) using an electrospray ionization (ESI) interface. Separation was achieved on the Poroshell EC-C18 column (100 × 3.0 mm i.d., 2.7 µm particle size, Agilent). The temperature of column was set to 40 °C. The flow rate was 0.4 mL/min; mobile phase A consisted of water, methanol and formic acid at a ratio of 93:5:2 (*V*/*V*/*V*) while the ratio of the same components in mobile phase B was 3:95:2 (*V*/*V*/*V*). The gradient elution method was carried out according to the following timetable: 0 min, 40 % B; 14 min, 80 % B; 15 min, 80 % B; 16 min, 40 % B; 20 min, 40 % B. The UV detector was set at 350 nm. Mass spectrometry data collection was performed in MS High Resolution mode, ESI source was set to the positive ionization mode and mass spectra were recorded in *m*/*z* range of 100 to 1000. Operating conditions of the MS detector were as follows: drying gas flow 8 L/min at 40 psi nebulizer gas pressure and drying gas temperature at 200 °C, sheath gas flow was 11 L/min with sheath gas temperature set at 300 °C. The time-of-flight (TOF) analyzer was used with the following settings: the voltage of the fragment, skimmer and the octapol were 175 V, 65 V, and 750 V. All data were collected and processed using Agilent MassHunter Workstation Software Program (Agilent Technologies, United States). Identification of the metabolites was based on a comparison of exact molecular mass and time of metabolite retention relative to the comparative solution. Quantification of the detected metabolites was performed on the basis of the signals measured by the UV detector.

Determination of Enzyme Kinetic Parameters

All incubations were conducted in triplicate. The results were expressed as the amount of generated metabolite based on LC-MS-UVD analysis (*vide supra*). Based on these results reaction rates were determined and used for calculation of the major parameters of enzymatic kinetics based on the Michaelis-Menten equation. In addition to the parameters of Michaelis-Menten kinetics (Michaelis-Menten constants, K_m, and maximal rate of reaction, V_{max}), k_{cat} was calculated as V_{max}/enzyme concentration, as well as ratios k_{cat}/K_m (or V_{max}/K_m). Program R (The R Project for Statistical Computing, Vienna, Austria) was used for calculations of enzyme kinetic parameters.

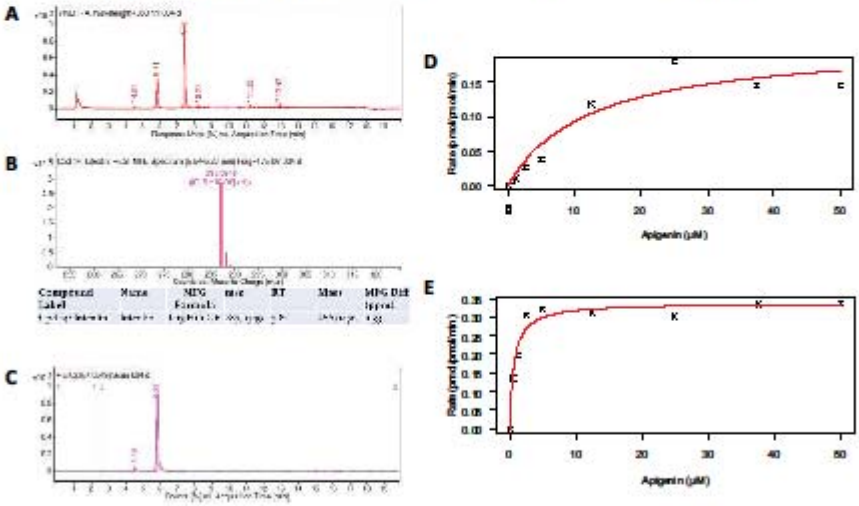


Figure 1. Methodology used for characterization of aromatic hydroxylation reaction. An example of apigenin, that is biotransformed into luteolin, is given. This is observed with human liver microsomes incubations analyzed by UVD (A), and identity of metabolite is confirmed by high resolution mass spectrometry (luteolin *m*/*z* = 287.0549, t_r = 5.8 min) (B). In apigenin incubations with CYP1A2 enzyme, apigenin is transformed to luetolin (t_r = 5.8 min) as shown by extracted ion chromatogram *m*/*z* = 287.0549 (C). Based on incubations with different concentrations of substrate, apigenin, Michealis-Menten equation paramters are calculated for the human liver microsomes incubations (k_{cat} = 0.2 min^{-1}, K_m = 12.4 µM) (D), as well as recombinant CYP1A2 enzyme (k_{cat} = 0.3 min^{-1}, K_m = 0.7 µM) (E).

RESULTS

In this study enzyme kinetics was determined for 3,7-dihydroxyflavone, 7-hydroxyflavone, acacetin, apigenin, flavone, galangin, kaempferol, naringenin, sakuranetin, and tangeretin. These were flavonoids that showed metabolite formation in the amount of at least 10 % (*m/m*) in comparison with the amount of substrate in the human liver microsomes screening experiments.[34] An example of methodology used to determine kinetic parameters is provided in Figure 1.

Enzyme kinetics was determined for 10 flavonoids on human liver microsomes and for 8 flavonoids it was also characterized on recombinant cytochromes P450. Summarized results are presented in Table 2.

Kinetic parameters were determined for the reaction of aromatic hydroxylation of 3,7-dihydroxyflavone in which 3,7,4'-trihydroxyflavone is generated. In case of human liver microsomes V_{max} was 5.9 ± 1.1 min^{-1} and K_m of 492 ± 163 μM was calculated. The catalytic effectiveness (k_{cat}/K_m) for this reaction was (0.012 ± 0.005) × 10^6 M^{-1} min^{-1}. While human liver microsomes catalyze the aromatic hydroxylation of the ring B, CYP1A2 catalyses the aromatic hydroxylation at the ring A with catalytic effectiveness of (1.5 ± 0.9) × 10^6 M^{-1} min^{-1}.

7-hydroxyflavone is hydroxylated at the postions 6, 8, or 4'; major metabolilic pathway being conversion to 6,7-dihydroxyflavone. In the experiments with the human liver microsomes V_{max} of the 6-hydroxylation was 1.9 ± 0.1 min^{-1} and K_m 43.5 ± 13.3 μM, catalytic effectiveness (k_{cat}/K_m) being (0.043 ± 0.014) × 10^6 M^{-1} min^{-1}. Reaction at the position 8 was ten times less effectively catalyzed (V_{max} = 0.40 ± 0.05 min^{-1}, K_m = 104 ± 37 μM, k_{cat}/K_m = (0.004 ± 0.002) × 10^6 M^{-1} min^{-1}). Overall catalytic effectiveness of aromatic hydroxylation of 7-hydroxyflavone mediated by human liver microsomes was (0.050 ± 0.016) × 10^6 M^{-1} min^{-1}. Major enzyme involved in hydroxylation at the position 6 was CYP3A4 in appropriate incubations with catalytic effectiveness of (0.054 ± 0.020) × 10^6 M^{-1} min^{-1}. Similar results were obtained for the reaction of aromatic hydroxylation at the position 8 with catalytic effectiveness of (0.052 ± 0.014) × 10^6 M^{-1} min^{-1}. Overall catalytic effectiveness of 7-hydroxyflavone aromatic hydroxylation mediated by CYP3A4 was (0.10 ± 0.03) × 10^6 M^{-1} min^{-1}. Interestingly, aromatic hydroxylation at the position 6 (but not at the position 8) was also mediated by CYP1A2 and CYP2D6. The catalytic effectiveness (k_{cat}/K_m) of CYP1A2 was (1.5 ± 0.3) × 10^6 M^{-1} min^{-1}, and for CYP2D6 this value was (0.06 ± 0.01) × 10^6 M^{-1} min^{-1}. While catalytic effectiveness of CYP1A2 is greater compared to CYP3A4, overall CYP3A4 contribution to the metabolism of 7-hydroxyflavone in human liver microsomes is more significant as CYP3A4 is more expressed compared to CYP1A2.

Acacetin undergoes demethylation to apigenin followed by aromatic hydroxylation to luteolin. Overall catalytic effectiveness in human liver microsomes system for both reactions was (0.06 ± 0.02) × 10^6 M^{-1} min^{-1}. Major enzyme involved in this metabolic conversion, both demethylation and aromatic hydroxylation, was CYP1A2 having the catalytic effectiveness of (2.9 ± 1.5) × 10^6 M^{-1} min^{-1}. Interestingly, CYP2D6 only catalyzed demethylation reaction with the catalytic effectiveness of (0.16 ± 0.05) × 10^6 M^{-1} min^{-1}.

As shown on Figure 1, apigenin undergoes aromatic hydroxylation to luteolin and as expected from experiments with acacetin this conversion is mediated by CYP1A2. The catalytic effectiveness determined on human liver microsomes was (0.017 ± 0.009) × 10^6 M^{-1} min^{-1}, and in case of recombinant CYP1A2 this value was (0.5 ± 0.1) × 10^6 M^{-1} min^{-1}.

In case of flavone enzyme kinetic parameters could not be determined, as the formation of flavone metabolite was linearly dependent to the concentration used in this experiment (higher concentration of flavone could not be used due to solubility issue in physiological water media). While V_{max} and K_m values could not be determined, catalytic effectiveness could be extrapolated as a slope value of linear regression (under low concentrations of substrate rate of metabolite production is linearly dependent to substrate concentration).[35] Thus, catalytic effectiveness of 4'-hydroxylation of flavone catalyzed by human liver microsomes was (0.0015 ± 0.0001) × 10^6 M^{-1} min^{-1}. Minor products of aromatic hydroxylation are also generated at the positions 6 and 7, and overall catalytic effectiveness was (0.0028 ± 0.0002) × 10^6 M^{-1} min^{-1}.

Galangin undergoes sequential hydroxylation to quercetin through kaempferol. In case of human liver microsomes, overall catalytic effectiveness of this biotransformation was (0.11 ± 0.06) × 10^6 M^{-1} min^{-1}. Biotransformation of galangin to kaempferol is catalyzed by CYP2C19 with a catalytic effectiveness of (0.004 ± 0.001) × 10^6 M^{-1} min^{-1}.

Aromatic hydroxylation of kaempferol to quercetin was individually studied. In human liver microsomes catalytic effectiveness was (0.024 ± 0.010) × 10^6 M^{-1} min^{-1}, as determined in human liver microsomes system.

Naringenin is metabolized to eriodictyol in the reaction of aromatic hydroxylation catalyzed by cytochrome P450 HLM in appropriate incubations. The catalytic effectiveness constant was (0.025 ± 0.009) × 10^6 M^{-1} min^{-1}. CYP1A2 is major cytochrome P450 involved in this reaction with catalytic effectiveness of (0.003 ± 0.002) × 10^6 M^{-1} min^{-1}. Since this is a slow reaction characterized by low efficiency, a very small amount of metabolite is formed in the incubations and the error of measurement is more pronounced in the results of the kinetic parameters.

Table 2. Results of enzyme kinetics of metabolic reactions mediated by cytochromes P450 observed in human liver microsomes (HLM), and determined on the HLM and recombinant cytochromes P450.

Substrate	Product	Reaction	Enzyme system	k_{cat} / min^{-1}	K_m / μM	(k_{cat}/K_m) / 10^{-6} min^{-1} M^{-1}
3,7-dihydroxyflavone	3,7,4'-trihydroxyflavone	hydroxylation	HLM	5.9 ± 1.1	492 ± 163	0.012 ± 0.005
	3,6,7-trihydroxyflavone or 3,7,8-trihydroxyflavone	hydroxylation	CYP1A2	6.1 ± 0.7	4.2 ± 2.6	1.5 ± 0.9
7-hydroxyflavone	6,7-dihydroxyflavone + 7,8-dihydroxyflavone + 7,4'-dihydroxyflavone	hydroxylation	HLM	2.7 ± 0.2	54.9 ± 16.7	0.050 ± 0.016
	6,7-dihydroxyflavone	hydroxylation	HLM	1.9 ± 0.1	43.5 ± 13.3	0.043 ± 0.014
	7,8-dihydroxyflavone	hydroxylation	HLM	0.40 ± 0.05	104 ± 37	0.004 ± 0.002
	7,4'-dihydroxyflavone	hydroxylation	HLM	0.50 ± 0.04	82.0 ± 21.7	0.006 ± 0.002
	6,7-dihydroxyflavone + 7,8-dihydroxyflavone	hydroxylation	CYP3A4	3.9 ± 0.3	37.8 ± 10.3	0.10 ± 0.03
	6,7-dihydroxyflavone	hydroxylation	CYP3A4	2.6 ± 0.3	47.9 ± 16.4	0.054 ± 0.020
	7,8-dihydroxyflavone	hydroxylation	CYP3A4	1.4 ± 0.1	26.2 ± 6.6	0.052 ± 0.014
	6,7-dihydroxyflavone	hydroxylation	CYP2D6	1.60 ± 0.08	26.0 ± 4.8	0.06 ± 0.01
	6,7-dihydroxyflavone	hydroxylation	CYP1A2	14.2 ± 0.7	9.7 ± 2.0	1.5 ± 0.3
acacetin	apigenin + luteolin	demethylation + hydroxylation	HLM	0.62 ± 0.07	9.5 ± 3.3	0.06 ± 0.02
	apigenin + luteolin	demethylation + hydroxylation	CYP1A2	3.8 ± 0.4	1.3 ± 0.6	2.9 ± 1.5
	apigenin	demethylation	CYP2D6	3.7 ± 0.5	22.7± 7.0	0.16 ± 0.05
apigenin	luteolin	hydroxylation	HLM	0.20 ± 0.03	12.4± 6.0	0.017 ± 0.009
	luteolin	hydroxylation	CYP1A2	0.30 ± 0.01	0.7 ± 0.1	0.5 ± 0.1
flavone	4'-hydroxyflavone + 6-hydroxyflavone + 7-hydroxyflavone	hydroxylation	HLM	/	/	0.0028 ± 0.0002
	4'-hydroxyflavone	hydroxylation	HLM	/	/	0.0015 ± 0.0001
galangin	kaempferol + quercetin	hydroxylation	HLM	3.3 ± 0.5	31.6 ± 16.0	0.11 ± 0.06
	kaempferol	hydroxylation	CYP2C19	0.022 ± 0.003	5.4 ± 1.4	0.004 ± 0.001
kaempferol	quercetin	hydroxylation	HLM	0.082 ± 0.009	3.4 ± 1.5	0.024 ± 0.010
naringenin	eriodyctiol	hydroxylation	HLM	1.1 ± 0.2	45.2 ± 14.9	0.025 ± 0.009
	eriodyctiol	hydroxylation	CYP1A2	0.021 ± 0.003	7.3 ± 5.6	0.003 ± 0.002
sakuranetin	5,3',4'-trihydroxy-7-methoxyflavanone + naringenin + eriodiktiol	hydroxylation + demethylation + hydroxylation	HLM	5.4 ± 1.0	293 ± 82	0.019 ± 0.006
	naringenin + eriodiktiol	demethylation + hydroxylation	HLM	3.1 ± 0.3	152 ± 31	0.020 ± 0.005
	5,3',4'-trihydroxy-7-methoxyflavanone	hydroxylation	HLM	/	/	0.0022 ± 0.0002
	5,3',4'-trihydroxy-7-methoxyflavanone	hydroxylation	CYP3A4	2.2 ± 0.4	39.8 ± 20.1	0.06 ± 0.03
	5,3',4'-trihydroxy-7-methoxyflavanone	hydroxylation	CYP1A2	8.3 ± 1.1	12.2 ± 6.8	0.7 ± 0.4
tangeretin	X-demethylated product (ring A)	demethylation	HLM	2.2 ± 0.3	97.3 ± 29.2	0.023 ± 0.008
	4'-hydroxy-5,6,7,8-tetramethoxyflavone + 3',4'-dihydroxy-5,6,7,8-tetramethoxyflavone	demethylation + hydroxylation	CYP1A2	8.7 ± 0.5	9.1 ± 2.3	1.0 ± 0.2
	4'-hydroxy-5,6,7,8-tetramethoxyflavone	demethylation	CYP1A2	6.2 ± 0.3	12.9 ± 2.6	0.5 ± 0.1
	3',4'-dihydroxy-5,6,7,8-tetramethoxyflavone	hydroxylation (demethylation)	CYP1A2	2.4 ± 0.1	4.5 ± 1.0	0.5 ± 0.1
	X-demethylated product (ring A)	demethylation	CYP3A4	13.8 ± 0.8	65.4 ± 9.9	0.21 ± 0.03
	4'-hydroxy-5,6,7,8-tetramethoxyflavone	demethylation	CYP3A4	6.4 ± 0.4	59.3 ± 9.0	0.11 ± 0.02
	4'-hydroxy-5,6,7,8-tetramethoxyflavone	demethylation	CYP2D6	/	/	0.0058 ± 0.0001

Therefore, the obtained results can be taken as a rough estimate of the kinetics for this reaction.

Sakuranetin undergoes sequential biotransformation, first demethylation to naringenin, then aromatic hydroxylation to eriodictyol. At the same time, minor product of direct aromatic hydroxylation of sakuranetin is formed i.e. 5,3',4'-trihydroxy-7-methoxyflavanone. Both metabolic pathways are observed in incubations with human liver microsomes and sequential biotransformation is 10 times more catalytic effective ((0.020 ± 0.005) × 10^6 M^{-1} min^{-1}) when compared to hydroxylation at the positon 3' ((0.0022 ± 0.0002) × 10^6 M^{-1} min^{-1}). Interestingly, only minor reaction was directly linked with cytochromes P450 used in this study i.e. CYP3A4 and CYP1A2 for which catalytic effectiveness constants were (0.06 ± 0.03) × 10^6 M^{-1} min^{-1} and (0.7 ± 0.4) × 10^6 M^{-1} min^{-1}, respectively.

Because of the interferences of metabolites on the UV detector in enzyme kinetics incubations with human liver microsomes, it was not possible to follow the main metabolic pathway of tangeretin in which tangeretin is demethylated to 4'-hydroxy-5,6,7,8-tetramethoxyflavone and then hydroxylated to 3',4'-dihydroxy-5,6,7,8-tetramethoxyflavone. However, these interferences were not present in incubations with recombinant enzymes. The most important enzyme for this metabolic pathway was CYP1A2 with catalytic effectiveness of (1.0 ± 0.2) × 10^6 M^{-1} min^{-1}. Kinetic parameters were determined on HLM for the reaction of single demethylation of tangeretin on ring A for the metabolite at t_R = 10.85 min. The catalytic effectiveness constant for this reaction was (0.023 ± 0.008) × 10^6 M^{-1} min^{-1}. This reaction was mediated by CYP3A4 (k_{cat}/K_m = (0.21 ± 0.03) × 10^6 M^{-1} min^{-1}). Demethylation of tangeretin at the position 4' is catalyzed by CYP3A4 (k_{cat}/K_m = (0.11 ± 0.02) × 10^6 M^{-1} min^{-1}), and to a lesser extent with CYP2D6 (k_{cat}/K_m = (0.0058 ± 0.0001) × 10^6 M^{-1} min^{-1}).

DISCUSSION

In this study we have characterized kinetic parameters of *O*-demethylations and aromatic hydroxylations to which flavonoid aglycons are susceptible. The range of values for rate constant k_{cat} was 0.021 to 14.2 min^{-1}. The Michaelis-Menten constants, K_m, was obtained in the range of 0.7 to 492 μM, and calculated catalytic effectiveness, k_{cat}/K_m, was in the range from 0.0015 to 2.9 × 10^6 M^{-1} min^{-1}. The range of results obtained for all kinetic parameters is very wide, and within a three-orders of magnitude. If we have in mind the structural homogeneity of the analyzed compounds, these results indicate a relatively high selectivity of human liver cytochrome P450 to certain substrates from this group of compounds. This conclusion is supported by the fact that only a few recombinant cytochromes P450 (CYP1A2, CYPC19, CYP2D6 and CYP3A4) catalyze the observed metabolic reactions of the analyzed flavonoids.

The enzyme that is most efficient is CYP1A2. With the exception of metabolic conversion of naringenin to eriodictyol, CYP1A2 catalytic effectiveness, k_{cat}/K_m, was in the range from 0.5 to 2.9 × 10^6 M^{-1} min^{-1}, indicating the high catalytic specificity or efficacy of this cytochrome P450 in flavonoid metabolism. This result is in agreement with published data on the metabolism of flavonoids mediated by cytochromes P450, in which most authors of the studies concluded that CYP1A2 plays a major role in the oxidative metabolism of flavonoids in *in vitro* conditions.[19,20,22,23,25,26,28,30,32]

Given the low concentrations generally achieved by oral intake of flavonoids, a very important kinetic parameter to consider is the K_m value. This is especially important in sense that flavonoids are known to have very low solubility in water and, most importantly, poor bioavailability after oral administration. Consequently, the usual concentrations achieved in the blood after the flavonoids consumption from different sources are nanomolar to micromolar, with large interindividual differences, and most often do not exceed 10 μM values.[34] Flavonoids for which the low K_m value has been determined have a higher chance of being metabolized *in vivo* after their oral administration compared to those having higher catalytic conversion rate (k_{cat}) and high K_m. In that sense, flavonoids that have higher potential of competitive interactions with other xenobiotics are: apigenin, acacetin, kaempferol, 3,7-dihydroxyflavone and galangin; all having K_m values bellow 10 μM (Table 2).

Out of ten analyzed flavonoids, seven of them are susceptible to the metabolism mediated by CYP1A2 (Table 2), which further confirms the hypothesis that this cytochrome P450 is the most important for the metabolism of flavonoids in humans. However, for a better estimate of the possible clinical significance of these metabolic reactions, it is not enough to consider only the K_m parameter. This parameter needs to be put in relation to the rate constant (k_{cat}) to provide k_{cat}/K_m ratio known as catalytic effectiveness. E.g. kaempferol, galagnin, and naringenin, have low K_m values, but given the relatively low rate of catalyst constant, it is expected that the extent of these reactions will not be so significant.

The range of the k_{cat}/K_m values of the studied reactions catalyzed by human liver microsomes was (0.0015 – 2.9) × 10^6 M^{-1} min^{-1}. It has been previously pointed out that the values of k_{cat}/K_m ratio catalyzed by CYP1A2 enzymes ranged from 0.003 to 2.9 × 10^6 M^{-1} min^{-1}. Therefore, it is not surprising that reactions with the highest catalytic efficiency are catalyzed by CYP1A2. Tangeretin demethylation reactions catalyzed by CYP3A4

and CYP2D6 are only secondary metabolic pathways of this flavonoid, while major metabolic pathways are catalyzed by CYP1A2. Considering that CYP1A2 is one of the most commonly found cytochromes P450 in the liver and one of the most important enzyme involved in drug metabolism,[9] potential of interactions of drug-flavonoid interaction cannot be ruled out, especially in case of acacetin, 3,7-dihydroxyflavone, 7-hydroxyflavone, tangeretin, sakuranetin, apigenin, and galangin, with drugs that are primarily metabolized by CYP1A2 such as clozapine, duloxetine, fluvoxamine, haloperidol, imipramine, naproxen, olanzapine, zolmitriptan, etc.[15] When considering these interactions, it is important to keep in mind the great interindividual differences observed in CYP1A2 expression and activity, which ranges up to 40 folds.[8,17]

It has already been pointed out that very little information on the metabolism of flavonoids mediated by cytochrome P450 is available in the literature. Data on kinetics of flavonoid metabolism is even less available. Bursztyka *et al.* and Hu *et al.* have studied kinetics of aromatic hydroxylation of genistein mediated by human liver microsomes and CYP1A2.[30,31] Wen and Walle studied the kinetics of demethylation of 5,7-dimethoxyflavone and 3',4'-dimethoxyflavone mediated by HLM.[18] Gradolatto *et al.* investigated the kinetics of aromatic hydroxylation of apigenin and the formation of luteolin in the incubation with rat liver microsomes.[21] Galangin metabolism and the kinetics of its conversion to kaempferol mediated by HLM were studied by Otake and Walle, and Otake *et al.*[26,39] The latter group of authors also studied the same reaction using CYP1A1, CYP1A2 and CYP2C9 enzymes. In all of these studies there is a common problem that makes it difficult to interpret the results of the enzyme kinetics. All incubations based on which the kinetic parameters were determined, lack the exact molar concentrations of the cytochrome P450 enzyme used in incubations. Instead of the molar concentration, the authors of the aforementioned studies used the protein mass unit in the incubations to express the results of these kinetic parameters. In these cases, k_{cat}/K_m constants included amounts of protein expressed in mg. This parameter is termed intrinsic clearance, which, according to Guengerich, is not good for comparison as it causes confusion.[16] The term "clearance" has a specific meaning in the *in vivo* pharmacokinetics.

In the literature only two studies have reported the kinetics of the metabolic reactions of flavonoids in which the actual parameters of their enzymatic kinetics k_{cat} and k_{cat}/K_m were comparable to the results obtained in this study. Androutsopulos *et al.* studied kinetics of diosmetin metabolism and its conversion into luteolin by the CYP1A1, CYP1A2 and CYP1B1 enzymes.[22] The kinetic parameters of this reaction were determined and the catalytic effectiveness constant was 8.1×10^6 M^{-1} min^{-1}. However, our previous results do not indicate extensive metabolism of diosmetin which could be due to different enzyme sources used in these studies. Another extensive study of the ipriflavone metabolism was conducted by Moon *et al.* using recombinant CYP1A2, CYP3A4, CYP2C9, and CYP2C19.[23] Values of catalytic effectiveness were in the range of $(0.02 - 0.22) \times 10^6$ M^{-1} min^{-1}, and these are comparable to the results we obtained in our study.

CONCLUSION

Kinetics of *O*-demethylation and aromatic hydroxylation reactions of ten flavonoids were characterized on human liver microsomes cytochrome P450 system. For eight of them characterization was also conducted on recombinant cytochromes P450. Most relevant enzyme involved in metabolism of flavonoid aglycons is CYP1A2, and it catalyzes biotransformation of acacetin, 3,7-dihydroxyflavone, 7-hydroxyflavone, tangeretin, sakuranetin, apigenin and galangin (aligned according to the catalytic effectiveness). Having in mind high expression and involvement of CYP1A2 in metabolism of xenobiotics including drugs, and its intraindividual differences in expression, potential of drug-flavonoid competitive interactions/inhibitions should be considered when consuming dietary supplement and foods rich in flavonoids.

Acknowledgment. This research was supported by the Croatian Science Foundation under the project UIP-2014-09-5704 (M. B.).

REFERENCES

[1] M. Lozić, H. Rimac, M. Bojić, *Farm. Glas.* **2016**, *72*, 747–760.

[2] S. Rendić, F. P. Guengerich, *Chem. Res. Toxicol.* **2015**, *28*, 38–42. https://doi.org/10.1021/tx500444e

[3] F. P. Guengerich in *Principles and Methods of Toxicology, 5th Ed.* (Ed.: A. W. Hayes), Informa Healthcare Inc., New York, **2014**.

[4] F. P. Guengerich in *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry, 4th Ed.* (Ed.: P. R. Ortiz de Montellano), Springer, Chambridge, **2015**.

[5] J. Xiao, P. Högger, *Curr. Drug Metab.* **2013**, *14*, 381–391. https://doi.org/10.2174/1389200211314040003

[6] C. Manach, A. Scalbert, C. Morand, C. Rémésy, L. Jiménez, *Am. J. Clin. Nutr.* **2004**, *79*, 727–747. https://doi.org/10.1093/ajcn/79.5.727

[7] B. H. Havsteen, *Pharmacol. Therapeut.* **2002**, *96*, 67–202. https://doi.org/10.1016/S0163-7258(02)00298-X

[8] Y. J. Moon, X. Wang, M. E. Morris, *Toxicol. In Vitro* **2006**, *20*, 187–210. https://doi.org/10.1016/j.tiv.2005.06.048
[9] K. E. Heim, A. R. Tagliaferro, D. J. Bobilya, *J. Nutr. Biochem.* **2002**, *13*, 572–584. https://doi.org/10.1016/S0955-2863(02)00208-5
[10] A. N. Panche, A. D. Diwan, S. R. Chandra, *J. Nutr. Sci.* **2016**, *5*, 1. https://doi.org/10.1017/jns.2016.41
[11] M. Bojić, Ž. Debeljak, M. Tomičić, M. Medić-Šarić, S. Tomić, *Nutr. J.* **2011**, *10*, 73. https://doi.org/10.1186/1475-2891-10-73
[12] M. Bojić, Ž. Debeljak, M. Medić-Šarić, M. Tomišić, *Clin. Chem. Lab. Med.* **2012**, *50*, 1403–1408. https://doi.org/10.1515/cclm-2011-0960
[13] M. Barbarić, K. Mišković, M. Bojić, M. Baus Lončar, A. Smolčić-Bubalo, Ž. Debeljak, M. Medić-Šarić, *J. Ethnopharmacol.* **2011**, *135*, 772–778. https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.04.015
[14] V. Rastija, M. Medić-Šarić, *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 400–408. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2008.03.001
[15] V. Rastija, M. Medić-Šarić, *Med. Chem. Research.* **2009**, *18*, 579–588. https://doi.org/10.1007/s00044-008-9151-y
[16] I. Mudnić, D. Modun, V. Rastija, J. Vuković, I. Brizić, V. Katalinić, B. Kozina, M. Medić-Šarić, M. Boban, *Food Chem.* **2010**, *119*, 1205–1210. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.08.038
[17] J. A. Yáñez, P. K. Andrews, N. M. Davies, *J. Chromatogr. B* **2007**, *848*, 159–181. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.10.052
[18] V. P. Androutsopoulos, A. Papakyriakou, D. Vourloumis, D. A. Spandidos, *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 2842–2849. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2011.03.042
[19] S. E. Nielsen, V. Breinholt, U. Justesen, C. Cornett, L. O. Dragsted, *Xenobiotica* **1998**, *28*, 389–401. https://doi.org/10.1080/004982598239498
[20] V. M. Breinholt, E. A. Offord, C. Brouwer, S. E. Nielsen, K. Brøsen, T. Friedberg, *Food Chem. Toxicol.* **2002**, *40*, 609–616. https://doi.org/10.1016/S0278-6915(01)00125-9
[21] A. Gradolatto, M. C. Canivenc-Lavier, J. P. Basly, M. H. Siess, C. Teyssier, *Drug Metab. Dispos.* **2004**, *32*, 58–65. https://doi.org/10.1124/dmd.104.000893
[22] V. Androutsopoulos, N. Wilsher, R. R. J. Arroo, G. A. Potter, *Cancer Lett.* **2009**, *274*, 54–60. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.08.032
[23] V. P. Androutsopoulos, K. Ruparelia, R. R. J. Arroo, A. M. Tsatsakis, D. A. Spandidos, *Toxicology* **2009**, *264*, 162–170. https://doi.org/10.1016/j.tox.2009.07.023
[24] S. E. Nielsen, V. Breinholt, C. Cornett, L. O. Dragsted, *Food Chem. Toxicol.* **2000**, *38*, 739–746. https://doi.org/10.1016/S0278-6915(00)00072-7
[25] V. M. Breinholt, S. E. Rasmussen, K. Brøsen, T. H. Friedberg, *Pharmacol. Toxicol.* **2003**, *93*, 14–22. https://doi.org/10.1034/j.1600-0773.2003.930102.x
[26] Y. Otake, T. Walle, *Drug Metab. Dispos.* **2002**, *30*, 103–105. https://doi.org/10.1124/dmd.30.2.103
[27] S. E. Kulling, D. M. Honig, M. Metzler, *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 3024–3033. https://doi.org/10.1021/jf0012695
[28] S. E. Kulling, D. M. Honig, T. J. Simat, M. Metzle, *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 4963–4972. https://doi.org/10.1021/jf000524i
[29] S. E. Kulling, L. Lehmann, M. Metzler, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2002**, *777*, 211–218. https://doi.org/10.1016/S1570-0232(02)00215-5
[30] M. Hu, K. Krausz, J. Chen, X. Ge, J. Li, H. L. Gelboin, F. J. Gonzalez, *Drug Metab. Dispos.* **2003**, *31*, 924–931. https://doi.org/10.1124/dmd.31.7.924
[31] J. Bursztyka, E. Perdu, J. Tulliez, L. Debrauwer, G. Delous, C. Canlet, G. De Sousa, R. Rahmani, E. Benfenati, J. P. Cravedi, *Food Chem. Toxicol.* **2008**, *46*, 939–948. https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.10.023
[32] K. M. Atherton, E. Mutch, D. Ford, *Biochem. Pharmacol.* **2006**, *72*, 624–631. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2006.05.015
[33] H. Doostdar, M. D. Burke, R. T. Mayer, *Toxicology* **2000**, *144*, 31–38. https://doi.org/10.1016/S0300-483X(99)00215-2
[34] G. Benković, M. Bojić, Ž. Maleš, S. Tomić, *Acta Pharm.* **2019**, *submitted*.
[35] M. Bojić, C. A. Sedgeman, L. D. Nagy, F. P. Guengerich, *Eur. J. Pharm. Sci.* **2015**, *72*, 49–56. https://doi.org/10.1016/j.ejps.2015.03.015
[36] C. Manach, G. Williamson, C. Morand, A. Scalbert, C. Rémésy, *Am. J. Clin. Nutr.* **2005**, *81*, 230–242. https://doi.org/10.1093/ajcn/81.1.230S
[37] M. S. Faber, A. Jetter, U. Fuhr, *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **2005**, *97*, 125–134. https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2005.pto_973160.x
[38] X. Wen, T. Walle, *Xenobiotica* **2006**, *36*, 387–397. https://doi.org/10.1080/00498250600630636
[39] Y. Otake, F. Hsieh, T. Walle, *Drug Metab. Dispos.* **2002**, *30*, 576–581. https://doi.org/10.1124/dmd.30.5.576

PRILOG 2

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

Acta Pharm. 69 (2019) 541–562
https://doi.org/10.2478/acph-2019-0039

Original research paper

Screening of flavonoid aglycons' metabolism mediated by the human liver cytochromes P450

GORAN BENKOVIĆ[1]
MIRZA BOJIĆ[2,*]
ŽELJAN MALEŠ[3]
SINIŠA TOMIĆ[1]

[1] *Agency for Medicinal Products and Medical Devices, HR-10000 Zagreb Croatia*

[2] *University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry Department of Medicinal Chemistry HR-10000 Zagreb, Croatia*

[3] *University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry Department of Pharmaceutical Botany HR-10000 Zagreb, Croatia*

Biological effects of flavonoids have been extensively studied in the last 80 years. As flavonoids represent a rather large group of compounds, data on metabolic biotransformations of these compounds is relatively limited to those well studied. The objective of this study was to screen the metabolism of 30 selected flavonoid aglycons mediated by the most relevant metabolic enzymes, human liver cytochromes P450. For this purpose, *in vitro* experiments with human liver microsomes and recombinant enzymes were conducted. To evaluate flavonoid's metabolism and structure of the products, high-performance liquid chromatography coupled with high-resolution mass spectrometry was used. Out of 30 flavonoids, 15 were susceptible to oxidative metabolism mediated by cytochromes P450. Dominant reactions were aromatic hydroxylation and *O*-demethylation, or a combination of these reactions. The dominant enzyme responsible for the observed metabolic reactions is CYP1A2, whereas other human liver cytochromes P450, namely, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 and CYP3A4, contribute to flavonoid metabolism to a lesser degree. These results, to some extent, contribute to the understanding of the metabolism of constituents found in antioxidant dietary supplements and their possible interactions with other xenobiotics, *i.e.*, medicinal products.

Accepted July 23, 2019
Published online September 10, 2019

Keywords: flavonoids, human liver cytochromes P450, metabolism, HPLC, MS

In 1936 professor Szent-Györgyi isolated a reducing agent, co-factor in reactions of peroxidase and vitamin C. This agent was named vitamin P and later on was identified as rutin (1). To this date, more than 4000 different compounds have been identified and classified as flavonoids (2). Flavonoids are low molecular polyphenols containing benzo-γ-pyrone core in their structure (Fig. 1).

A significant number of pharmacological effects of flavonoids has been described, *e.g.*, antithrombotic, antihypertensive, hypolipemic, antimicrobial, antiallergic, antineoplastic,

* Correspondence, e-mail: mbojic@pharma.hr

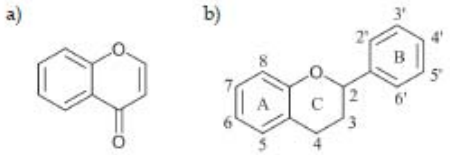


Fig. 1. Structures of: a) benzo-γ-pyrone, and b) flavonoid core.

anti-inflammatory, and hepatoprotective effect (1, 3). Although the amount of available data on their positive health benefits based on *in vitro* experiments is overwhelming, there are differences between effects observed *in vivo* and *in vitro* (4).

To some extent, this is related to the lack of information on flavonoids' metabolism, that has been characterized for a relatively small number of compounds. Major enzymes that contribute to the metabolism of xenobiotics, including flavonoids, are cytochromes P450. Cytochromes P450 participate in the metabolism of nearly ¾ of all small drugs and other xenobiotics. Most significant cytochrome P450 is 3A4 that participates in the metabolism of over 50 % of xenobiotics, whereas flavonoids are mainly metabolized with cytochrome P450 1A2 (5). Knowing the cytochrome P450 enzymes involved in the metabolism of flavonoids contributes to the understanding of their bioavailability, pharmacokinetics, and consequently pharmacodynamics, as well as potential interactions with other concomitantly used medications.

The data on pharmacokinetics and metabolism of flavonoids is limited (6–20). Research articles on the metabolism of individual flavonoid used in this study are referenced in Table I. These are often limited to observatory studies of induction and inhibition of cytochromes P450 (21, 22). Flavonoids mainly undergo cytochrome P450 reactions of aromatic hydroxylation and *O*-demethylation (Fig. 2).

Thus, the objective of this research was to determine human liver cytochromes P450 involved in the metabolism of 30 selected flavonoid aglycons. The set used represents most commonly found flavonoid aglycons in plant species rich in polyphenols. For this purpose, experiments were conducted using commercially available human liver microsomes and recombinant cytochromes P450. Metabolism was monitored by high-performance liquid chromatography (HPLC) coupled with diode array detector (DAD) and high-resolution mass spectrometer (MS).

EXPERIMENTAL

Chemicals

Methanol and formic acid (LC-MS grade) were purchased from Honeywell Specialty Chemicals Seelze GmbH, Germany, and Merck KGaA, Germany, resp. Ultra-pure water was produced using Arium comfort combined water production system from Sartorius AG, Germany. Flavone, flavanone, 6-hydroxyflavone, 7-hydroxyflavone, chrysin, 3,6-dihydroxyflavone, 3,7-dihydroxyflavone, pinocembrin, tectochrysin, apigenin, galangin, genistein, pinocembrin-7-methylether, naringenin, kaempferol, sakuranetin, catechin, diosmetin, morin, quercetin, hesperetin, isorhamnetin, tamarixetin, rhamnetin, myricetin, and

Table I. Structural features of flavonoids used in the screening of cytochromes P450 mediated metabolisma

No.	Flavonoid	C5	C6	C7	C8	C2′	C3′	C4′	C5	Metabolic reaction (literature source)*
	Flavones (C2–Ph, C2=C3, C4=O)									
1	Acacetin	OH	H	OH	H	H	H	OCH_3	H	4′-demethylation (6)
2	Apigenin	OH	H	OH	H	H	H	OH	H	3′-hydroxylation (7–9)
3	Diosmetin	OH	H	OH	H	H	OH	OCH_3	H	4′-demethylation (10)
4	Flavone	H	H	H	H	H	H	H	H	
5	6-Hydroxyflavone	H	OH	H	H	H	H	H	H	
6	7-Hydroxyflavone	H	H	OH	H	H	H	H	H	
7	Chrysin	OH	H	OH	H	H	H	H	H	6-hydroxylation (7–9)
8	Chrysin-dimethyl ether	OCH_3	H	OCH_3	H	H	H	H	H	
9	Luteolin	OH	H	OH	H	H	OH	OH	H	
10	Tangeretin	OCH_3	OCH_3	OCH_3	OCH_3	H	H	OCH_3	H	4′-demethylation (7, 11, 12)
11	Techtocrysin	OH	H	OCH_3	H	H	H	H	H	
	Flavonoles (C2–Ph, C2=C3, C3–OH, C4=O)									
12	3,6-Dihydroxyflavone	H	OH	H	H	H	H	H	H	
13	3,7-Dihydroxyflavone	H	H	OH	H	H	H	H	H	
14	Galangin	OH	H	OH	H	H	H	H	H	4′-hydroxylation (7, 13)
15	Isorhamnetin	OH	H	OH	H	H	OCH_3	OH	H	
16	Kaempferol	OH	H	OH	H	H	H	OH	H	3′-hydroxylation (7, 8)
17	Morin	OH	H	OH	H	OH	H	OH	H	
18	Myricetin	OH	H	OH	H	H	OH	OH	OH	
19	Quercetin	OH	H	OH	H	H	OH	OH	H	
20	Rhamnetin	OH	H	OCH_3	H	H	OH	OH	H	
21	Tamarixetin	OH	H	OH	H	H	OH	OCH_3	H	4′-demethylation (7, 8)
	Isoflavones (C2=C3, C3–Ph, C4=O)									
22	Genistein	OH	H	OH	H	H	H	OH	H	6-hydroxylation, 8-hydroxylation, 3′-hydro-xylation (14-19) 3′-hydroxylation (14-19)
23	Prunetin	OH	H	OCH_3	H	H	H	OH	H	4′-demethylation (15)
	Flavanones (C2-Ph, C2–C3, C4=O)									
24	Flavanone	H	H	H	H	H	H	H	H	
25	Hesperetin	OH	H	OH	H	H	OH	OCH_3	H	4′-demethylation (7, 8, 20)
26	Naringenin	OH	H	OH	H	H	H	OH	H	3′-hydroxylation (7, 8)
27	Pinocembrin	OH	H	OH	H	H	H	H	H	
28	Pinocembrin-7--methylether	OH	H	OCH_3	H	H	H	H	H	
29	Sakuranetin	OH	H	OCH_3	H	H	H	OH	H	
	Flavanole (C2–Ph, C2–C3, C3–OH, C4=O)									
30	Catechin			H	OH	H	H	OH	OH	

*Previous data on most dominant metabolic reactions of individual flavonoids reported under literature column, if available.

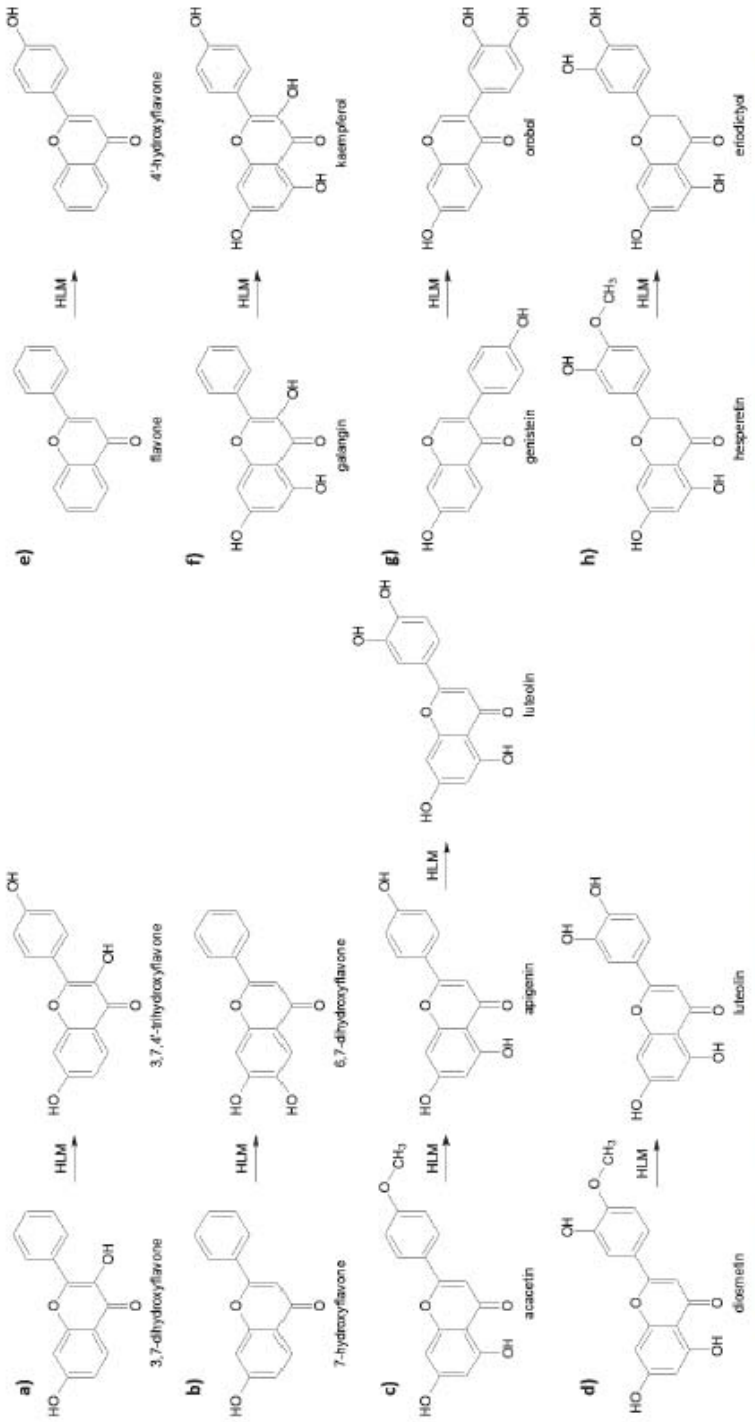


Fig. 2. Metabolic reactions of flavonoid aglycons catalyzed by cytochromes P450 as determined on human liver microsomes (HLM) enzyme system. Following flavonoids showed metabolism mediated by HLM cytochromes P450: a) 3,7-dihydroxyflavone, b) 7-hydroxyflavone, c) acacetin, d) diosmetin, e) flavone, f) galangin, g) genistein, h) hesperetin, i) kaempferol, j) chrysin, k) naringenin, l) prunetin, m) sakuranetin, n) tangeretin.

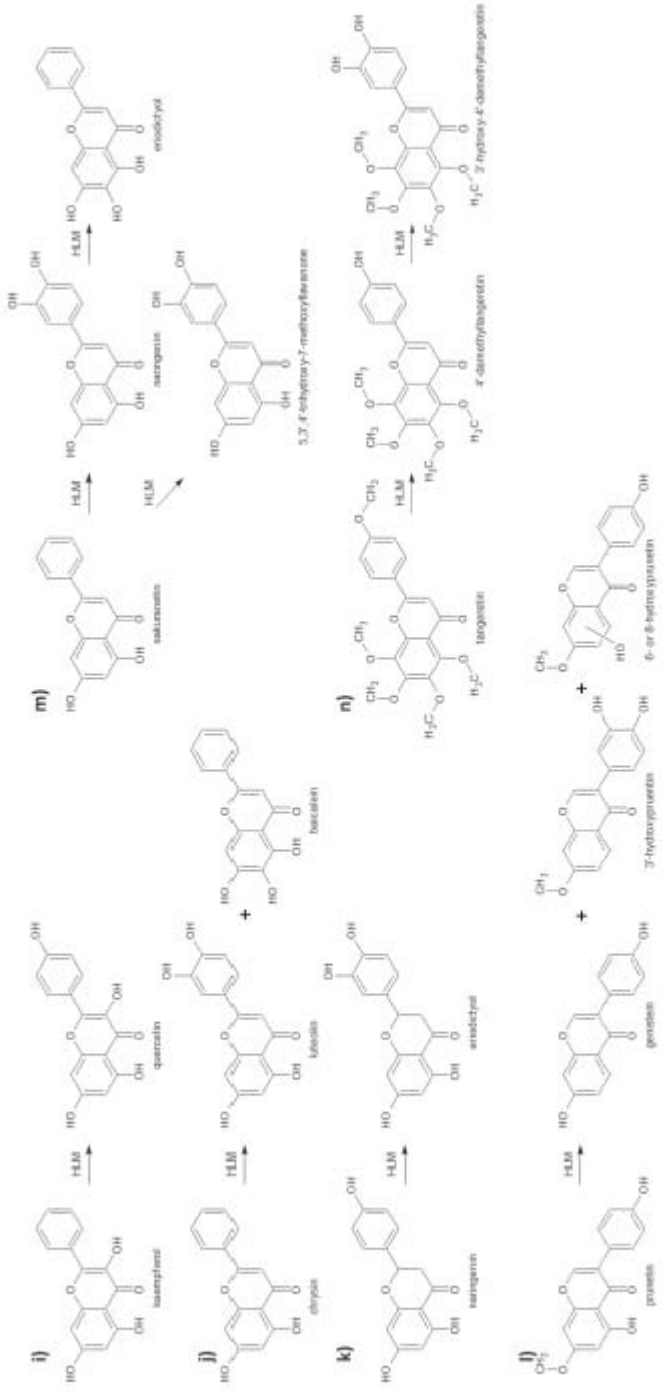


Fig. 2. Continued

tangeretin were purchased from Extrasynthese, France. 3,7,4′-Trihydroxyflavone, 6,7-dihydroxyflavone, 7,8-dihydroxyflavone, 4′-hydroxyflavone, 2′-hydroxyflavone, 5,3′,4′-trihydroxy-7-methoxyflavanone were obtained from TransMIT GmbH, Project Division for Plant Metabolites and Chemicals, Germany, and eriodictyol from Biovit Ltd., Croatia. Human liver microsomes (HLM) and recombinant cytochrome P450 expressed in baculosomes were obtained from Thermo Fisher Scientific, USA. Glucose-6-phosphate (G6P), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) and NADP disodium salt were purchased from Sigma Aldrich, USA. Potassium phosphate and concentrated hydrochloric acid were purchased from Kemika d.d., Croatia. Acetonitrile for chromatography was purchased from Merck KGaA.

Incubation

Each flavonoid stock solution was individually prepared as 20 mmol L^{-1} methanol solution. To achieve the desired final concentration during the incubation, an aliquot of the stock solution was transferred to a glass tube and dried to remove the organic solvent. In this way, an appropriate amount of flavonoid was added to the tube and organic solvent was removed from the incubation process as it can interfere with the enzyme activity. Each incubation medium contained 100 pmol of human liver microsomes (HLM, amount relates to cytochrome P450 enzyme). The pH of the incubation medium was set to physiological (7.4) using the potassium phosphate buffer solution (final concentration 50 mmol L^{-1}). The reaction was initiated by adding 15 μL of the generating system (GS) consisting of glucose-6-phosphate, $NADP^+$, and glucose-6-phosphate dehydrogenase in a ratio of 100:50:2 (*V/V/V*, the final amount in the incubation 15 %). In the negative control (blind test), 15 μL of ultrapure water was added to this step instead of GS. The total volume of each incubation mixture was 100 μL.

After 15 min of incubation at 37 °C in a water bath with mechanical shaking, the reaction was stopped by adding 60 μL of a mixture of acetonitrile and 25 % hydrochloric acid solution (5:1, *V/V*). The final volume of the incubation mixture, after stopping the reaction, was 160 μL and the concentration of flavonoids 125 μmol L^{-1}. After stopping the reaction, the incubation mixture was centrifuged at 10,000 rpm for 10 min in a MiniSpin centrifuge (Eppendorf AG, Germany). The clear supernatant was transferred to the HPLC vial and analyzed by HPLC/MS.

To verify which cytochrome P450 is involved in the metabolism, specific inhibitors were used in combination with human liver microsomes, or pure recombinant cytochrome P450 was used for analysis replacing HLM. Incubations with recombinant cytochromes P450 were conducted using 3 pmol of the enzyme (CYP1A2, CYP2A6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 or CYP3A4). Specific inhibitors of cytochromes P450 were 1 μmol L^{-1} α-naphthoflavone for CYP1A2, 2 μmol L^{-1} methoxalen for CYP2A6, 5 μmol L^{-1} ticlopidin for CYP2B6, 50 μmol L^{-1} quercetin for CYP2C8, 5 μmol L^{-1} sulfaphenazole for CYP2C9, 10 μmol L^{-1} fluconazole for CYP2C19, 2 μmol L^{-1} ketoconazole for CYP3A4, 2 μmol L^{-1} quinidine for CYP2D6, and 100 μmol L^{-1} 4-methylpyrazole for CYP2E1 (23). The concentration of inhibitor refers to the final concentration of the inhibitor in the incubation mixture.

Liquid chromatography coupled with diode array detector and mass spectrometer

Liquid chromatography (LC) coupled with diode array detector (DAD) and mass spectrometer (MS) was performed on the Agilent 1200 RR (Agilent Technologies, Germany) LC

system coupled to Agilent 6530 Accurate Mass Q-TOF HPLC/MS using electrospray ionization (ESI) interface. The column Poroshell EC-C18 (100 × 3.0 mm i.d., 2.7 μm particle size, Agilent) used for separation was set at the temperature of 40 °C. The flow rate was set at 0.4 mL min^{-1} and the injection volume was 5 μL. Mobile phase A consisted of water, methanol and formic acid at a ratio of 93:5:2 (*V/V/V*) whereas the ratio of the same components in mobile phase B was 3:95:2 (*V/V/V*). The gradient was carried out according to the following scheme: 0 min, 40 % B; 14–15 min, 80 % B; 16–20 min, 40 % B. The DAD was set at 350 nm. Mass spectrometry data collection was performed in MS high-resolution mode, ESI source was set to the positive ionization mode and mass spectra were recorded in *m/z* range of 100 to 1000. Operating conditions of the MS detector were as follows: drying gas flow 8 L min^{-1} at 275.8 kPa nebulizer gas pressure and drying gas temperature at 200 °C, sheath gas flow was 11 L min^{-1} with sheath gas temperature set at 300 °C. The time-of-flight (TOF) analyzer was used with the following settings: the voltage of the fragment, skimmer and the octapol were 175, 65 and 750 V, resp. All data were collected and processed using Agilent MassHunter Workstation Software Program (Agilent Technologies, USA). Identification of the metabolites was based on a comparison of exact molecular mass and time of metabolite retention relative to the reference standards. Quantification of the detected metabolites was performed on the basis of the signals measured by the UV detector.

RESULTS AND DISCUSSION

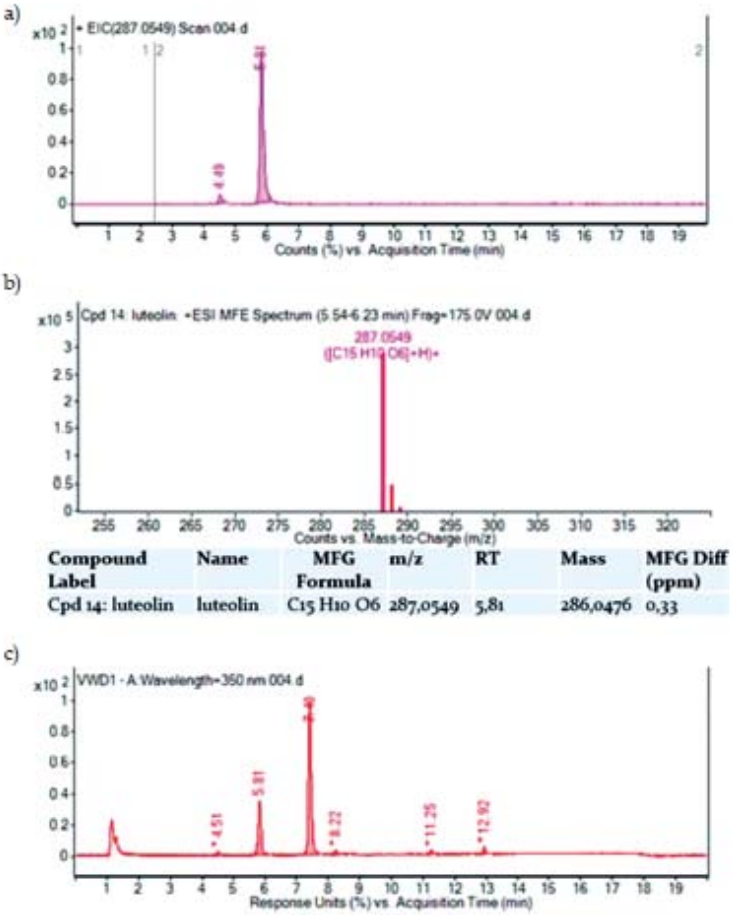
Development of the HPLC/MS method for the identification and determination of flavonoid metabolites

Development of HPLC/MS method for identification and determination of the metabolites of selected flavonoid aglycons was based on the optimization of the HPLC method used for the analysis of phenolic acids and flavonoids in various wine and propolis samples, published and described in the literature (24, 25). The method was chosen primarily because of its wide separation window and mobile phase composition suitable for analysis with the MS detector.

The TOF analyzer allowed accurate mass determination and calculation of the molecular formula for the detected ions of flavonoids based on their specific isotopic patterns, enabling simple identification in conjugation with the retention time. If metabolite was not commercially available, MS/MS spectra were recorded enabling determination of the ring in the flavonoid skeleton that undergoes biotransformation. Possible site of reaction could be elucidated, although the exact structure of unknown metabolite could not be established solely on the basis of MS and MS/MS data. This is in accordance with the previously reported cases of Tsimogiannis *et al.* (26) and Cuyckens and Claeys (27).

Fig. 3 shows the methodology of identification and determination of flavonoid metabolites using the example of aromatic hydroxylation to which apigenin is susceptible, generating luteolin as a metabolite.

Screening of selected flavonoid aglycons that underwent metabolism mediated by human liver cytochromes P450 was performed using HLM. Biotransformation was observed in 15 out of 30 analyzed flavonoids (Table II). Detected metabolites were generated by reactions of aromatic hydroxylation and *O*-demethylation, or a combination of these reactions.



Compound Label	Name	MFG Formula	m/z	RT	Mass	MFG Diff (ppm)
Cpd 14: luteolin	luteolin	C15 H10 O6	287,0549	5,81	286,0476	0,33

Fig. 3. The methodology of identification and determination of metabolites. Data used for detection of selected flavonoids and their metabolites: retention time, exact mass, molecular formula. An example of an apigenin metabolite is given in the figure. The chromatogram in c) refers to the dominant metabolite with a retention time of 5.81 min. In b) the peak mass spectrum is shown at 5.81 min, and in a) the chromatogram of the separated ion corresponding to the same retention time. Based on comparison with pure standard data stored in the database, an unknown metabolite identified as luteolin.

In the incubations with 6-hydroxyflavone, a mass change of 2.014545 g mol^{-1} was recorded and the molecular formula $C_{15}H_{12}O_3$ was calculated on the basis of MS data. These data indicate the formation of dihydroxychalcone by the opening of the ring C (cleavage of the bond O1-C2, see Fig. 2). The change in mass of –15.99491 was also observed, and based on MS data calculated molecular formula was $C_{15}H_{12}O_2$. This indicates degradation (opening) of the ring C and the formation of monohydroxychalcone. Both of these reactions were observed in incubations without the addition of a generating system, indicating a non-enzymatic reaction. Since the same changes observed in the incubations with the

added generating system could not be unequivocally attributed to the action of the cytochrome P450 enzyme, and the other changes attributable to the cytochrome P450 activity were not related to the original flavonoid 6-hydroxyflavone, the 6-hydroxyflavone results were not taken into further consideration.

Determination of flavonoid metabolism mediated by human liver microsomes

In the incubations of 3,7-dihydroxyflavone with human liver microsomes, the formation of hydroxylated metabolites was detected (Fig. 2a). The main product was identified as 3,7,4′-trihydroxyflavone. The second product, present in a much smaller amount, due to the lack of commercially available standard, could not be identified, but, based on the MS and MS/MS data it was further characterized as the A ring hydroxylated product (either at the position 6 or 8).

In the incubations of 7-hydroxyfavone with human liver microsomes, two metabolites were detected – hydroxylated products at positions 6 and 8. The main product was identified as 6,7-dihydroxyflavone (Fig. 2b), and the other product, present in much less quantity, was identified as 7,8-dihydroxyflavone.

Two metabolites of acacetin generated by human liver microsomes were detected: apigenin and luteolin (Fig. 2c). The finding of apigenin and luteolin as metabolism products indicates the sequential formation of the metabolites by the action of cytochromes P450. First, the demethylation at the position 4′ of ring B occurred, generating apigenin which is subsequently hydroxylated at the position 3′ of ring B producing luteolin. Apigenin is the most abundant metabolic product, indicating that the acacetin demethylation is the major metabolic pathway catalyzed by cytochromes P450. Similarly, in the incubations of apigenin with human liver microsomes, the metabolite identified was luteolin (Fig. 2c).

Disometin is metabolized to luteolin in the incubations with human liver microsomes as it undergoes *O*-demethylation at 4′-position of the B ring (Fig. 2d).

In the incubation of flavone with human liver microsomes, metabolite identified as 4′-hydroxyflavone was detected using a UV detector (Fig. 2e). Additional hydroxylated products with different elution times were detected. However, they were generated in negligible quantities. Among them, 6-hydroxyflavone and 7-hydroxyflavone have been identified.

Galangin was metabolized to kaempferol indicating aromatic hydroxylation of galangin at position 4′ of ring B as a major metabolic pathway (Fig. 2f).

In the incubation of genistein with human liver microsomes, orobol was detected as a metabolite (Fig. 2g). The finding of orobol as a metabolic product points to the aromatic hydroxylation of the genistein substrate at position 3′ of the ring B.

When hesperetin was incubated with human liver microsomes the formation of a metabolite identified as eriodictyol was observed (Fig. 2h). Thus, a major metabolic reaction was *O*-demethylation of the hesperetin substrate at position 4′ of the ring B.

In the incubation of kaempferol with human liver microsomes (HLM), quercetin was identified (Fig. 2i). The finding of quercetin as a metabolic product indicates aromatic hydroxylation of kaempferol at position 3′ of the ring B as the major metabolic reaction.

Chrysin generated two metabolites, baicalein and luteolin (Fig. 2j). Both products were generated by aromatic hydroxylation: at position 6 of ring A (baicalein) and double

aromatic hydroxylation of ring B at positions 3′ and 4′ (luteolin). Although dihydroxylated product (luteolin) was observed, monohydroxylated products were not found (*e.g.*, apigenin), not even in traces. Thus, chrysin biotransformation to luteolin included two consecutive hydroxylation reactions without the release of monohydroxylated products from the enzyme. In all previous cases where a combined reaction (double hydroxylation or demethylation with hydroxylation) was observed, it was found to be sequentially carried out over a single hydroxylated or demethylated intermediate. Both metabolites were represented in approximately equal amounts indicating that none of these metabolic pathways catalyzed by cytochrome P450 is favored.

The absence of oxidative metabolism of luteolin was also observed by Nielsen *et al.* (7), although it should be emphasized that the authors in this experiment used rat liver microsomes while in our study human liver microsomes were used.

In the incubation of naringenin with human liver microsomes, eriodictyol was identified as a metabolite (Fig. 2k). Eriodictyol was generated by aromatic hydroxylation of the naringenin at the position 3′ of the ring B.

Prunetin was transformed into three metabolites when incubated with human liver microsomes (Fig. 2l). The most abundant metabolite was identified as genistein, suggesting that *O*-demethylation is a preferred metabolic pathway. In approximately equal and slightly smaller quantities compared to genistein, two aromatic hydroxylated products were generated by separate pathways, one by hydroxylation at position 3′ of B ring (known as santal), and the other at position 6 of the ring A.

In the incubations of sakuranetin with human liver microsomes the formation of three metabolites was observed (Fig. 2m). The finding of naringenin and eriodictyol as metabolic products indicates the sequential formation of the metabolite by the action of cytochrome P450. First, the parent flavonoid sakuranetin is demethylated at the position 7 of the ring A to form naringenin, and then naringenin is hydroxylated at the position 3′ of the ring B, thereby producing eriodictyol. The third product of the sakuranetin metabolism was formed by aromatic hydroxylation at the position 3′ of the ring B, *i.e.*, 5,3′,4′-trihydroxy-7-methoxyflavanone was formed.

Tangeretin generated more than 10 metabolites in the incubations with human liver microsomes. The largest number of detected metabolites refers to single and double demethylated tangeretin derivatives in various combinations and at different positions on the rings A and B. Most of these metabolites could not be identified because commercially available standards of potential metabolites were not available. The absence of single demethylation at ring A, and the absence of double demethylation, could be determined solely by LC-MS and LC-MS/MS analysis. Therefore, these products were characterized up to the level of reaction type that was catalyzed by cytochrome P450 under experimental conditions used. However, the two major metabolites, most commonly found in tangeretin incubations with HLM, were indirectly identified based on data obtained by LC-MS/MS analysis (Fig. 2n). MS/MS spectra showed a mass loss of 14.01564 g mol^{-1} on the ring B with t_R of 9.52 min. Since only one methoxy group at position 4′ is present in the tangeretin ring structure B, this metabolite is characterized as a 4′-demethylated tangeretin derivative, *i.e.*, 4′-hydroxy-5,6,7,8-tetramethoxyflavone. Similarly, the structure of the second most commonly found metabolite detected at t_R = 7.83 min showed a mass increase of 1.9799 g mol^{-1} that is located on ring B (based on MS/MS analysis), indicating demethylation at the 4′ position and hydroxylation at the positions 2′ or 3′. Based on the literature data (Table I),

Table II. Metabolism of selected flavonoid aglycons mediated by human liver cytochrome P450

Substrate (S)	Molecular formula (S)	Product (P)	Molecular formula (P)	Reaction	Enzyme	Retention time (min) (P)	Precise mass (P)	Mass accuracy (ppm)
3,7-Dihydroxyflavone	$C_{15}H_{10}O_4$	3,7,4′-Trihydroxyflavone	$C_{15}H_{10}O_5$	aromatic hydroxylation	HLM/CYP2E1[a]	5.4	270.0529	–0.16
		3,6,7-Trihydroxyflavone or 3,7,8-Trihydroxyflavone	$C_{15}H_{10}O_5$	aromatic hydroxylation	HLM/CYP1A2	9.0	270.0527	0.39
7-Hydroxyflavone	$C_{15}H_{10}O_3$	6,7-Dihydroxyflavone	$C_{15}H_{10}O_4$	aromatic hydroxylation	HLM/CYP3A4/CYP1A2/CYP2D6	7.6	254.0577	0.83
		7,8-Dihydroxyflavone	$C_{15}H_{10}O_4$	aromatic hydroxylation	HLM/CYP3A4	5.6	254.0578	0.34
Acacetin	$C_{16}H_{12}O_5$	Apigenin	$C_{15}H_{10}O_5$	*O*-demethylation	HLM/CYP1A2/CYP2D6	7.4	270.0528	0.04
		Luteolin	$C_{15}H_{10}O_6$	*O*-demethylation and aromatic hydroxylation	HLM	5.8	286.0477	0.20
Apigenin	$C_{15}H_{10}O_5$	Luteolin	$C_{15}H_{10}O_6$	aromatic hydroxylation	HLM/CYP1A2	5.8	286.0478	–0.29
Diosmetin	$C_{16}H_{12}O_6$	Luteolin	$C_{15}H_{10}O_6$	*O*-demethylation	HLM	5.8	286.0475	0.71
Flavone	$C_{15}H_{10}O_2$	4′-Hydroxyflavone	$C_{15}H_{10}O_3$	aromatic hydroxylation	HLM/CYP1A2	8.2	238.0629	0.45
Galangin	$C_{15}H_{10}O_5$	Kaempferol	$C_{15}H_{10}O_6$	aromatic hydroxylation	HLM/CYP2C19	7.1	286.0480	–0.94
Genistein	$C_{15}H_{10}O_5$	Orobol (3′-OH) or 2′-OH	$C_{15}H_{10}O_6$	aromatic hydroxylation	HLM	4.3	286.0470	2.62
Hesperetin	$C_{16}H_{14}O_6$	Eriodictyol	$C_{15}H_{12}O_6$	*O*-demethylation	HLM	4.0	288.0648	–5.02
Kaempferol	$C_{15}H_{10}O_6$	Quercetin	$C_{15}H_{10}O_7$	aromatic hydroxylation	HLM/CYP1A2	5.2	302.0425	0.37
Chrysin	$C_{15}H_{10}O_4$	Baicalein (6-OH) or norvogonin (8-OH)	$C_{15}H_{10}O_5$	aromatic hydroxylation	HLM	8.4	270.0542	5.16
		Luteolin	$C_{15}H_{10}O_6$	aromatic hydroxylation	HLM	5.8	286.0475	0.96
Naringenin	$C_{15}H_{12}O_5$	Eriodictyol	$C_{15}H_{12}O_6$	aromatic hydroxylation	HLM/CYP1A2	4.0	288.0635	–0.30
Prunetin	$C_{16}H_{12}O_5$	Genistein	$C_{15}H_{10}O_5$	*O*-demethylation	HLM	6.3	270.0515	4.82
		Santal (3′-OH) or (2′-OH)	$C_{16}H_{12}O_6$	aromatic hydroxylation	HLM	8.4	300.0626	2.53
		6-OH-Prunetin or 8-OH-prunetin	$C_{16}H_{12}O_6$	aromatic hydroxylation	HLM	5.0	300.0640	–2.07
Sakuranetin	$C_{16}H_{14}O_5$	5,3,4′-Trihydroxy-7-methoxyflavanone	$C_{16}H_{14}O_6$	aromatic hydroxylation	HLM/CYP1A2/CYP3A4	7.9	302.0791	–0.13
		Naringenin	$C_{15}H_{12}O_5$	*O*-demethylation	HLM/CYP1A2/CYP2E1[a]	5.6	272.0683	0.49
		Eriodictyol	$C_{15}H_{12}O_6$	*O*-demethylation and aromatic hydroxylation	HLM	4.0	288.0635	–0.30
Tangeretin	$C_{20}H_{20}O_7$	4′-Hydroxy-5,6,7,8-tetramethoxyflavone[b]	$C_{19}H_{18}O_7$	*O*-demethylation	HLM/CYP1A2/CYP3A4/CYP2D6	9.5	358.1053	–0.21
		3,4′-Dihydroxy-5,6,7,8-tetramethoxyflavone[c]	$C_{19}H_{18}O_8$	*O*-demethylation and aromatic hydroxylation	HLM/CYP1A2	7.8	374.0999	0.67

CYP – cytochrome P450, HLM – human liver microsomes, P – product, S – substrate

[a] The enzyme involvement in the reaction was indirectly confirmed in the inhibition with specific cytochrome P450 inhibitors.

[b] The metabolite is characterized by MS/MS data.

[c] The metabolite is characterized by MS/MS data. It is assumed that C3 is most likely the site of aromatic hydroxylation.

as well as other results presented in this paper, if a flavonoid is already hydroxylated at the position 4′, the subsequent aromatic hydroxylation will occur at the position 3′ of the ring B. Therefore, the metabolite at t_R = 7.83 min was characterized as the most probable 4′-demethylated and 3′-hydroxylated tangeretin derivative, *i.e.*, 3′,4′-dihydroxy-5,6,7,8-tetramethoxyflavone. This metabolite is most likely sequentially formed by aromatic hydroxylation at the position 3′ of the ring B after primary O-demethylation at the position 4′ of the ring B.

Determination of cytochromes P450 involved in the metabolism of flavonoid aglycons

Flavonoids that underwent metabolic changes in human liver microsomes (HLM) incubations were further investigated in incubations with individual recombinant cytochromes P450. The experiments using recombinant cytochromes P450 were only conducted for those flavonoids that showed metabolite formation in the amount of at least 10 % (*m/m*) compared to the amount of substrate in the HLM experiments. Therefore, the metabolism mediated by individual recombinant cytochrome P450 is reported for the following 10 flavonoid aglycons: 3,7-dihydroxyflavone, 7-hydroxyflavone, acacetin, apigenin, flavone, galangin, kaempferol, naringenin, sakuranetin and tangeretin (Table II).

Incubations with individual recombinant cytochrome P450s indicate that the 3,7-dihydroxyflavone metabolism is mediated by CYP1A2 enzyme. This enzyme was the only one involved in the metabolic conversion of 3,7-dihydroxyflavone but did not catalyze the major metabolic reaction of aromatic hydroxylation at the 4′ position of the B ring observed in the HLM experiments (Fig. 2a), rather the secondary hydroxylation reaction on the ring A at positions 6 or 8, producing the only metabolite 3,6,7-trihydroxyflavone or 3,7,8-trihydroxyflavone (t_R = 8.95 min). The major metabolic conversion of 3,7-dihydroxyflavone to 3,7,4′-trihydroxyflavone was not catalyzed by any of the enzymes tested.

7-Hydroxyflavone metabolism (Fig. 2b) is mediated by CYP1A2, CYP2D6 and CYP3A4. Both hydroxylated metabolites (6,7-dihydroxyflavone and 7,8-dihydroxyflavone), observed in the HLM experiment, were generated only by CYP3A4. In the incubations with CYP1A2 and CYP2D6, only 6,7-dihydroxyflavone was detected, the major metabolite which was found in the HLM experiments. Although CYP3A4 catalyzed both metabolic pathways observed in the HLM experiment, the overall contribution is smaller than that of CYP1A2 and CYP2D6. Based on these results, it can be concluded that all three cytochrome P450 enzymes are equally important for the oxidative metabolism of 7-hydroxyflavone.

Acacetin biotransformation (Fig. 2c) is mediated by CYP1A2 and CYP2D6 enzymes. In the experiment with CYP1A2, both metabolic products were observed similarly to the HLM incubations; namely, apigenin and luteolin, while CYP2D6 catalyzed only the demethylation of acacetin producing apigenin. In both experiments, the main product of apigenin was generated in approximately equal amounts.

Apigenin metabolism (Fig. 2c) is mediated exclusively by CYP1A2 enzyme. Just as in the experiments with HLM, incubations with CYP1A2 resulted in the formation of luteolin, suggesting that this enzyme catalyzes the aromatic hydroxylation of apigenin at the position 3′ of the ring B.

Incubations with individual recombinant cytochrome P450s indicate that the flavone (Fig. 2e) metabolism is mediated by the CYP1A2 enzyme. Similarly to the HLM experiment, the dominant metabolite was 4′-hydroxyflavone (t_R = 8.59 min). Several other hydroxylated

products with different elution times were detected using MS detector, but in negligible quantities. This also applies to the peak at t_R = 6.76 min on the chromatogram which was characterized as a double hydroxylated flavone derivative. The finding of 4′-hydroxyflavone as the main product in CYP1A2 incubation suggests that aromatic hydroxylation of the flavone substrate at the 4′ position of the B ring is catalyzed by this enzyme.

CYP2C19 and CYP2D6 enzymes were found to be responsible for galangin metabolism (Fig. 2f). Just as in the experiments with HLM, incubations of CYP2C19 and CYP2D6 showed the formation of one metabolite – kaempferol, suggesting that this enzyme catalyzes the aromatic hydroxylation of galangin at the position 4′ of the ring B. It should be noted that in both experiments, small amounts of kaempferol were produced in both cases, much less than in HLM experiments. Kaempferol is metabolized by CYP1A2 enzyme (Fig. 2i). In incubations with CYP1A2, similar to the HLM experiment, the only detected metabolite was quercetin (t_R = 5.60 min).

Incubations with individual recombinant cytochrome P450s indicate that the metabolism of naringenin is mediated by CYP1A2 enzyme (Fig. 2k). In the incubations with CYP1A2, similar to the HLM experiment, the only detected metabolite was hydroxylated eriodictyol (t_R = 3.90 min).

CYP1A2 and CYP3A4 were found to be major enzymes responsible for the metabolism of the sakuranetin (Fig. 2m). Two metabolites were detected in CYP1A2 incubations: 5,3′,4′-trihydroxy-7-methoxyflavanone (t_R = 7.77 min) and naringenin (t_R = 5.53 min). The finding of these two metabolites suggests that CYP1A2 catalyzes the conversion of sakuranetin through *O*-demethylation and aromatic hydroxylation as determined by the HLM experiments, but their ratios suggest that, unlike the HLM experiment, pure enzyme CYP1A2 favored aromatic hydroxylation of the sakuranetin at the position 3′ of the ring B when compared to *O*-demethylation at the position 7 of the ring A. In the incubations with CYP3A4 two metabolites were also detected: 5,3′,4′-trihydroxy-7-methoxyflavanone at t_R = 7.75 min, and an unknown compound with mass difference of –2,0155 g mol^{-1} compared to the substrate sakuranetin, and molecular formula $C_{16}H_{12}O_5$ (t_R = 11.74 min). Moreover, this was the predominant metabolic product in CYP3A4 incubations, while the 3′-hydroxylated derivative of sakuranetin was produced in a somewhat smaller amount. Aromatic hydroxylation of sakuranetin at the position 3′ of the ring B is favored compared to the *O*-demethylation at position 7 of the ring A by both CYP3A4 and CYP1A2. The latter metabolic pathway was not catalyzed by CYP3A4 at all. It has to be noted that the sequential aromatic hydroxylation of naringenin, the primary metabolite of sakuranetin in the HLM experiments, and its conversion to the eriodictyol was not catalyzed by any of the enzymes tested.

Tangeretin metabolism was mediated by CYP1A2, CYP2D6, and CYP3A4 enzymes (Fig. 2n). Based on the amount of metabolite produced, it can be concluded that the most important enzymes are CYP1A2 and CYP3A4. However, the role of CYP1A2 is more important as it catalyzes tangeretin's major metabolic reaction observed in the HLM experiment, *i.e.*, 4′-demethylation followed by hydroxylation at the position 3′ of the ring B (t_R = 7.81 min). CYP3A4 catalyzed only the reaction of 4′-demethylation of tangeretin (t_R = 9.40 min), without further conversion to the 3′-hydroxylated product. However, the 4′-demethylated derivative was just the second most commonly found metabolite with CYP3A4, while the major metabolite was a single-demethylated derivative of tangeretin at the ring A (t_R = 10.85 min). CYP2D6 catalyzed only the conversion of tangeretin to the 4′-demethylated derivative (t_R = 9.46 min) in smaller amounts.

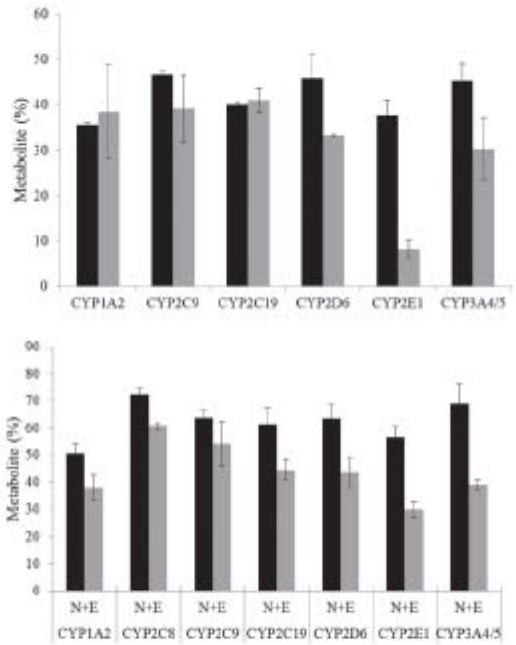


Fig. 4. Inhibition assays for the reactions: a) 3,7-dihydroxyflavone → 3,7,4'-trihydroxyflavone and b) sakuranetin → naringenin (N) + eriodictyol (E). Black columns represent the percentage of metabolite/s generated in control without the specific inhibitor of cytochrome P450 and grey columns with the addition of the inhibitor. Results represent the mean ± standard error ($n = 3$).

None of the recombinant cytochromes P450 used in the present study catalyzed biotransformation of 3,7-dihydroxyflavone and sakuranetin. As the metabolism of 3,7-dihydroxyflavone and sakuranetin was observed in experiments with the human liver microsomes, further experiments were conducted on the human liver microsomes using specific inhibitors of cytochromes P450. The reaction of biotransformation of 3,7-dihydroxyflavone to 3,7,4'-trihydroxyflavone was inhibited in the incubations with the specific CYP2E1 inhibitor (4-methylpyrazole, 80 % inhibition, $p < 0.05$) (Fig. 4).

In the experiment with sakuranetin, the inhibition of the combined reaction of *O*-demethylation of sakuranetin at the 7-position of ring A and of the aforementioned aromatic hydroxylation resulting in naringenin production was observed, when specific inhibitors of cytochromes P450 were used. The observed amounts of metabolites produced were determined by the UV detector. The reaction can be schematically written as: sakuranetin → naringenin → eriodictyol (Fig. 2m). Obtained results indicate a moderate and statistically significant ($p < 0.05$) inhibition of observed metabolic response in incubations with the specific CYP2E1 inhibitor. Moderate inhibition of 15 % was observed in incubations with the specific CYP2C8 inhibitor (quercetin, $p < 0.05$) for the total amount of metabolites produced, but not for individual metabolites. Given the very slight inhibition indicated by the results for CYP2C8 and the fact that incubations with the recombinant enzyme did not indicate the metabolism of sakuranetin, this enzyme cannot be regarded as the most important

one for the metabolism of sakuranetin. However, it can be concluded that among the examined cytochromes P450, CYP2E1 enzyme is only important for catalyzing the observed reaction of sakuranetin → naringenin → eriodictyol, although the inhibition of 50 % suggests that there could be other cytochromes P450 that may be, to a certain extent, responsible for this metabolic conversion (not analyzed in this study).

Metabolism of flavones

Acacetin undergoes demethylation and hydroxylation reactions in which CYP1A2 and CYP2D6 enzymes are involved. Androutsopoulos *et al.* (6) conducted experiments on recombinant CYP1A1 and CYP1B1 enzymes. These enzymes have been investigated primarily because of their potential role in carcinogenesis, but their share in healthy liver metabolism of xenobiotics is virtually negligible (28). Because of all this, it can be said that our study is the first one to describe the metabolism of acacetin mediated by cytochromes P450, which have a relevant meaning for the general population. The results of our study indicate that the oxidative metabolism of acacetin is characterized by two metabolic reactions in which two metabolites are formed: apigenin and luteolin. This is a combined reaction of *O*-demethylation followed by sequential aromatic hydroxylation and can be schematically shown as follows: acacetin → apigenin → luteolin (Fig. 2c). A complete combined reaction is catalyzed by human liver microsomes and CYP1A2, while CYP2D6 catalyzes only the reaction of demethylation of acacetin to produce apigenin. The results of our study suggest that oxidative metabolism of apigenin is characterized by an aromatic hydroxylation in which luteolin metabolite is formed. This reaction is catalyzed by human liver microsomes and CYP1A2. Androutsopoulos *et al.* (6) determined the same type of metabolic reaction of apigenin using the CYP1A1 and CYP1B1 enzymes. Although two products were detected in their study, only one was characterized as scutellarein. Scutellarein is the product of the aromatic hydroxylation at position 3 of apigenin, and it was not detected in the herein presented study. Lack of scutellarein as a metabolic product can be attributed to cytochromes P450 used in research due to different objectives of the studies (enzymes involved in carcinogenesis *versus* enzymes expressed in healthy population; *vide supra*).

Diosmetin undergoes *O*-demethylation reaction at position 4′ of the ring B generating luteolin (Fig. 2d). This reaction is catalyzed by human liver microsomes (HLM), and since less than 10 % (*m/m*) of the metabolite is produced in comparison to the substrate concentration, the metabolism of diosmetin was not further characterized. The results obtained in this study agree with those previously published by Androutsopoulos *et al.* who conducted *in vitro* experiments with recombinant cytochrome P450 and MCF-7 breast cancer cell lines (10) as well as cell lines of breast adenocarcinoma MDA-MB 468 and normal breast tissue MCF-10A (29) showing that the main route of diosmetin metabolism was the same as suggested in this study. Authors of aforementioned studies (10, 29) further determined that CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, and CYP3A5 are not responsible for this reaction and that the major role in the oxidative metabolism of diosmetin is attributed to CYP1A2 and, to a lesser extent, CYP3A4.

Oxidative metabolism of flavone is characterized by aromatic hydroxylation that generates a metabolite, identified as 4′-hydroxyflavone (Fig. 2e). Minor products of aromatic hydroxylation were detected only by MS detector, but in relatively negligible quantities. The finding of 4′-hydroxyflavone as the main metabolite product suggests that aromatic hydroxylation

of unsubstituted flavone is mediated by a cytochrome P450 enzyme, namely, CYP1A2. Metabolism of flavone has not been described in the available literature so far, so the results obtained in this paper are the first reported data on its metabolism.

Metabolism of 7-hydroxyflavone is characterized by two metabolic reactions in which two metabolites are formed: 6,7-dihydroxyflavone and 7,8-dihydroxyflavone (Fig. 2a). These are hydroxylated metabolites generated in incubations with human liver microsomes and CYP3A4. In the incubations with CYP1A2 and CYP2D6, only 6,7-dihydroxyflavone, the major metabolite in the HLM experiments, was detected. Although CYP3A4 catalyzed both metabolic pathways observed in the HLM experiment, the overall contribution to the metabolism was somewhat lower than that of CYP1A2 and CYP2D6. The metabolism of 7-hydroxyflavone has not been described in the available literature so far, so the results obtained in this paper are the first report on its metabolism.

Chrysin undergoes two oxidative reactions in which two metabolites are formed: baicalein and luteolin (Fig. 2j). Baicalein is generated by the aromatic hydroxylation at the position 6 of the ring A, and dual aromatic hydroxylation at the positions 3′ and 4′ of the ring B results in the formation of luteolin. This reaction is catalyzed by HLM, and since less than 10 % (*m/m*) of metabolites are produced compared to the substrate concentration, the chrysin metabolism was not further characterized.

Most of the detected tangeretin metabolites in human liver microsomes incubations could not be identified due to the lack of appropriate standards. The majority of detected metabolites were single or double demethylated tangeretin derivatives. As tangeretin possesses five methoxy groups, different methoxy groups could undergo demethylation reactions, resulting in various metabolites all of which were detected in smaller amounts. However, the two main metabolites, most commonly found in tangeretin incubations with HLM, were indirectly identified on the basis of data obtained by LC-MS/MS analysis. These were 4′-hydroxy-5,6,7,8-tetramethoxyflavone and 3′,4′-dihydroxy-5,6,7,8-tetramethoxyflavone. Major metabolites were formed sequentially by primary *O*-demethylation at the position 4′ of the ring B followed by aromatic hydroxylation at the position 3′ of the ring B: tangeretin → 4′-hydroxy-5,6,7,8-tetramethoxyflavone → 3′,4′-dihydroxy-5,6,7,8-tetramethoxyflavone (Fig. 2n). Incubations with individual recombinant cytochrome P450s indicate that tangeretin metabolism is mediated by CYP1A2, CYP2D6, and CYP3A4 enzymes. Based on the amount of metabolites produced, it can be concluded that the most important role is attributed to CYP1A2 and CYP3A4. CYP1A2 is the most important enzyme for the oxidative metabolism of tangeretin since it catalyzed its major metabolic reaction observed in the HLM experiments. The results obtained are well related to the already published tangeretin metabolism data (Table I). The main metabolite with the highest content, in this case, was 4′-hydroxy-5,6,7,8-tetramethoxyflavone. Experiments with recombinant cytochrome P450 showed that enzymes CYP1A2, CYP3A4, and CYP2D6 were involved in the oxidative metabolism of tangeretin, but it was not accurately determined which enzyme was responsible for each individual metabolic reaction. As in this study, it has been shown that the major enzyme CYP1A2 is responsible for demethylation at the position 4′ of the ring B, as well as post hydroxylation at position 3′ of the ring B of the demethylated product. The same biotransformation was observed with CYP3A4, but to a lesser extent. The results for CYP3A4 are partially in discrepancy with the fact that no further oxidation of the 4′-demethylated product in CYP3A4 incubations has been observed in this study. However, Breinholt *et al.* (12) observed oxidation of the 4′-demethylated product in low quantities. This minor difference

between the herein presented and literature data could be attributed to differences in experimental conditions. It is particularly important to note that the quantity of cytochrome P450 used in their study is not disclosed. Finally, we can conclude that the results presented herein confirmed the main route of tangeretin metabolism mediated by human liver cytochrome P450 and the major role of CYP1A2 in this biotransformation.

Metabolism of flavonols

In this paper 10 flavonoids belonging to the flavonol group were tested. For seven of them, information about metabolism can be found in the literature (galangin, isorhamnetin, kaempferol, quercetin, myricetin, morin, and tamarixetin) (Table I). For the remaining three tested flavonoids from this group (3,6-dihydroxyflavone, 3,7-dihydroxyflavone, and rhamnetin), this is the first report on cytochrome P450 mediated metabolism. Metabolism mediated by human liver cytochrome P450 under experimental conditions described in this paper was not recorded for the following flavonols: 3,6-dihydroxyflavone, isorhamnetin, quercetin, myricetin, morin, rhamnetin, and tamarixetin. This result confirmed data published by Nielsen *et al.* (7) who also determined the absence of metabolism of isorhamnetin, quercetin, myricetin, and morin in incubation with rat cytochromes P450.

While in our study tamarixetin metabolism was not detected, its metabolism was noted in the previous studies by Nielsen *et al.* (7) and Breinholt *et al.* (8) who determined the metabolic conversion of tamarixetin into quercetin by the reaction of demethylation at the position 4′ of the ring B mediated by the enzyme CYP1A2. When comparing the enzyme systems, HLM and recombinant cytochromes P450, two evident differences in the studies have been noticed. Breinholt *et al.* (8) used markedly greater enzyme concentration (up to 30-fold) relative to incubation in our study. At the same time concentrations of the enzyme in human liver microsomes incubations were not reported.

Incubations with individual recombinant cytochrome P450s indicate that the 3,7-dihydroxyflavone metabolism is mediated by CYP1A2 enzyme. This enzyme was the only tested enzyme involved in the metabolic conversion of 3,7-dihydroxyflavone but it did not catalyze the major metabolic reaction – aromatic hydroxylation at the 4′ position of the B ring observed in the HLM experiments. However, CYP1A2 did catalyze the secondary hydroxylation reaction on the ring A at the positions 6 or 8, forming only one metabolite, 3,6,7-trihydroxyflavone or 3,7,8-trihydroxyflavone. The major metabolic conversion of 3,7-dihydroxyflavone to 3,7,4′-trihydroxyflavone was not catalyzed by any of the enzymes tested. Based on the results of the inhibition assays with specific cytochrome P450 inhibitors, the major reaction was attributed to the CYP2E1 enzymes. The results of the 3,7-dihydroxyflavone metabolism are particularly interesting because it is the only example in which purified enzyme (CYP1A2) catalyzed the secondary reaction to a greater extent when compared to the major reaction catalyzed by HLM.

Oxidative metabolism of galangin is characterized by a metabolic reaction in which a kaempferol metabolite is formed. This reaction is catalyzed by human liver microsomes, CYP2C19 and CYP2D6. Under the experimental conditions, small amounts of kaempferol were produced in pure enzyme incubations, much less when compared to the HLM experiment. Otake and Walle (13) found that CYP1A2 had a dominant role in this metabolic conversion and CYP2C9 to some extent. Based on the small differences in the experiment conditions, it is not possible to find a clear explanation for the observed difference when comparing the results to our study. Otake and Walle (13) investigated galangin metabolism

with three relevant recombinant pure enzymes CYP1A2, CYP2C9, and CYP3A4. Although the main role of CYP1A2 has been found, based on inhibition assays using specific inhibitors where the metabolism mediated by HLM was inhibited by 40 % with a specific CYP1A2 inhibitor, the authors determined that other specific cytochrome P450 enzymes may be involved in this metabolism as well.

Kaempferol metabolism is characterized by aromatic hydroxylation at the position 3′ of the ring B in which quercetin is formed. This metabolic conversion was catalyzed by human liver microsomes and CYP1A2. Kaempferol metabolism has been described in the literature in the work of Breinholt *et al.* (8) and the results of our study are fully consistent with these results.

Metabolism of isoflavones

In this study, two representatives of isoflavones were tested: genistein and prunetin. For both flavonoids, oxidative metabolism mediated by human cytochrome P450 is well described in the literature and particularly well documented for genistein (Table I).

The results of this study indicate that the oxidative metabolism of genistein is characterized by a single metabolic reaction in which an orobol metabolite is formed by aromatic hydroxylation at the position 3′ of the ring B. This reaction is catalyzed by human liver microsomes (HLM), and since less than 10 % (*m/m*) of metabolites is produced in comparison to the substrate concentration, the metabolism of genistein was not further characterized. The results obtained in this study agree with the previously published literature; the aforementioned reaction is the dominant reaction reported in the literature (14–19).

Oxidative metabolism of the prunetin is characterized by three metabolic reactions in which the following metabolites are formed: genistein, 6-hydroxyprunetin and 3′-hydroxyprunetin. *O*-demethylation is a somewhat preferred metabolic pathway of prunetin biotransformation by cytochromes P450. However, it should be noted that the remaining two hydroxylated products were found in similar amounts, which were lower when compared to the amount of genistein. All three reactions are catalyzed by human liver microsomes, to the extent less than 10 % (*m/m*); consequently, the metabolism of the prunetin was not further characterized. The results obtained in this study agree with the previously published research of Hua *et al.* (17), who described the observed metabolic reaction as a very rapid conversion of prunetin to genistein, but at the same time did not report any other metabolic pathway of prunetin. The largest difference between the two studies was again in the incubation enzyme concentration; Hua *et al.* used markedly higher concentrations, about 3 times greater than in the HLM experiments in our study.

Metabolism of flavanones

In this study, six flavonoids belonging to the flavanone group were subjected to cytochrome P450 catalyzed reactions. In the primary scientific literature, only hesperetin and naringenin metabolism is described to some extent (7, 8, 20). For the remaining four examined flavonoids from this group (flavanon, pinocembrin, pinocembrin-7-methylether and sakuranetin), this is the first report on cytochrome P450 mediated metabolism.

Hesperetin undergoes *O*-demethylation reaction at the position 4′ of the ring B generating eriodictyol. This reaction is catalyzed by human liver microsomes to a lesser extent

(less than 10 %, *m/m*) and was not further characterized. The results obtained in this study agree with those previously published by Nielsen *et al.* (7) and Breinholt *et al.* (8) who conducted incubations with rat liver microsomes, HLM and recombinant CYP1A2 showing that the major route of hesperetin metabolism was identical to the one suggested in our research. Authors of the aforementioned studies (7, 8) also determined that CYP2C9, CYP2D6 and CYP3A4 are not responsible for this reaction, and that the major role in hesperetin oxidative metabolism is attributed to CYP1A2. These two studies as well as ours are contrary to the results of Doostdar *et al.* (20) who did not detect metabolism of hesperetin mediated by cytochromes P450, which is most likely due to too low concentrations of flavonoids used in incubation mixtures (up to 1.5 μmol L^{-1}).

Naringenin is biotransformed to eriodictyol in the reaction of aromatic hydroxylation at the position 3′ of the ring B. This reaction was observed in experiments with human liver microsomes, and attributed to CYP1A2. The result of the metabolism of naringenin obtained in this study agrees with the literature data with regard to the reaction catalyzed by human liver cytochrome P450, in which the main metabolite produced is eriodictyol. Conclusions regarding the specific cytochrome P450 enzymes dominantly responsible for the catalysis of this reaction are, however, to some extent different from those published. While Breinholt *et al.* (8) found that CYP1A2 had a dominant role in this metabolic conversion, our study showed that CYP3A4 did not metabolize naringenin under experimental conditions and that CYP1A2 was only a secondary enzyme responsible for the observed naringenin metabolism. The enzyme dominantly responsible for this metabolic reaction was not found and was not among the tested group of enzymes (CYP1A2, CYP2A6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 and CYP3A4).

The results of the herein presented study suggest that there are two metabolic pathways of sakuranetin biotransformation mediated by the human liver cytochromes P450. Sakuranetin is metabolized to naringenin, eriodictyol, and 5,3′,4′-trihydroxy-7-methoxyflavanone; enzymes responsible for the metabolism are CYP1A2 and CYP3A4. In the incubations with CYP1A2 two metabolites were detected: 5,3′,4′-trihydroxy-7-methoxyflavanone and naringenin. The finding of these two metabolites suggests that CYP1A2 catalyzes the conversion of sakuranetin through *O*-demethylation and aromatic hydroxylation as determined by the HLM experiments but their ratios suggest that, unlike the HLM experiment, CYP1A2 enzyme favored aromatic hydroxylation of the sakuranetin at the position 3′ of the ring B *vs.* *O*-demethylation at the position 7 of the ring A. In the incubations with CYP3A4, two metabolites were detected: again 5,3′,4′-trihydroxy-7-methoxyflavanone and an unknown compound with molecular formula $C_{16}H_{12}O_5$. Moreover, 5,3′,4′-trihydroxy-7-methoxyflavanone was the predominant metabolic product in CYP3A4 incubations, while the 3′-hydroxylated derivative of sakuranetin was produced in a somewhat smaller amount. This metabolite was also found in HLM incubations, but in much smaller amounts compared to other metabolites, suggesting that this third metabolic pathway of sakuranetin metabolism is mediated by cytochromes P450. Interestingly, the sequential aromatic hydroxylation of naringenin, the primary metabolite from the HLM experiment, and its conversion to the eriodictyol was not observed. Inhibition assays with specific cytochrome P450 inhibitors showed that CYP2E1 was the only significant enzyme involved in catalysis of the reaction sakuranetin → naringenin → eriodictyol. The sakuranetin metabolism has not been described in the available literature so far, so the results obtained in this paper are the first known data on its metabolism.

CONCLUSIONS

Hydroxylation of flavones is catalyzed by human cytochrome P450 at position 3′ and 4′ of ring B, with position 4′ being favored on unsubstituted ring B. Hydroxylation is also possible at positions 6 and 8 of the ring A. Aromatic hydroxylation of an unsubstituted flavone is preferred at the position 4′ of the ring B, but that hydroxylation is also possible at other positions in the flavone structure. *O*-demethylation of the methoxy group in flavone is favored at position 4′ of ring B, although tangeretin is an example for which demethylation is also possible on ring A. The enzyme dominantly responsible for the observed metabolic reactions of the flavone class is CYP1A2. Although the majority of the flavonoids from flavones class were examined (eleven), half of them did not show oxidative metabolism mediated by cytochromes P450.

Similarly to flavones, flavonols undergo aromatic hydroxylation catalyzed by human liver cytochrome P450 at the ring B, positions 3′ and 4′, whereas position 4′ is favored on unsubstituted ring B. However, in the case of 3,7-dihydroxyflavone metabolism, it can be seen that hydroxylation is also possible on ring A at positions 6 and 8, position 6 being favored in relation to position 8. The presence of two or more hydroxyl groups on the B ring of the flavonols appears to prevent further metabolism mediated by human liver cytochromes P450. Although several mono-methylated flavonols representatives were tested, *O*-demethylation was not observed in this flavonoid class of compounds. The enzyme that is dominantly responsible for the observed flavonols metabolism is CYP1A2, but its role is not expressed to such a degree as in the case of flavones, whereas in the case of 3,7-dihydroxyflavone it is shown that some other specific cytochrome P450 (*i.e.*, CYP2E1) has a more important role in its metabolism.

A sample of the examined isoflavones in this study is too small to extract general conclusions about their oxidative metabolism mediated by human liver cytochrome P450, but it can be noted that results are consistent with the genistein and prunetin data already reported in the literature. Likewise, the observed aromatic hydroxylation at the position 3′ of the ring B of genistein and prunetin fits well into overall results for tested flavonoids, especially for the flavone group structurally closest to isoflavones. Thus, isoflavone ring B hydroxylation is favored at position 3′, if a hydroxyl group at position 4′ is already present in the structure. In the example of prunetin it is shown that *O*-demethylation is possible at position 7 of the ring A and that aromatic hydroxylation is possible at position 6 of the ring A in isoflavone skeleton.

Flavanone results were in good agreement with those reported for hesperetin and naringenin. The observed aromatic hydroxylation at the position 3′ of the ring B of naringenin and sakuranetin fits well with the overall results for tested flavonoids. Flavanone undergoes hydroxylation of the ring B that is favored at the position 3′, if a hydroxyl group at the position 4′ is already present in the structure. The importance of this hydroxyl group for the oxidative metabolism of flavanone is further underlined by the absence of metabolism of flavanone pinocembrin and pinocembrin-7-methylate having an unsubstituted ring B. In the example of hesperetin and sakuranetin it is shown that *O*-demethylation is possible at the position 4′ of the ring B and at the position 7 of the ring A. CYP1A2 is dominantly responsible for observed flavanone metabolism, whereas other specific cytochrome P450 (*i.e.*, CYP2E1 or CYP3A4) plays an important role in the metabolism of sakuranetin and naringenin.

The overall conclusion of this study is that flavonoid aglycons undergo two types of oxidative reactions: aromatic hydroxylations and *O*-demethylations catalyzed mainly by cytochrome P450 1A2. Aromatic hydroxylation is favored at the position 4′ of B ring, and in 3′ if a hydroxyl group at the position 4′ is already present in the structure. Moreover, the presence of two or more hydroxyl groups on the B ring of the flavanols appears to prevent further metabolism mediated by human liver cytochromes P450. *O*-demethylation of the methoxy group is favored at position 4′ of ring B. These results, to some extent, contribute to the understanding of the metabolism of constituents found in antioxidant dietary supplements and their possible interactions with other xenobiotics, *i.e.*, interactions with drugs metabolized by the same cytochromes P450 as flavonoids.

Acknowledgements. – This research was supported by the Croatian Science Foundation under the project UIP-2014-09-5704 (M. B.). The authors thank anonymous reviewers, whose suggestions have improved the manuscript.

REFERENCES

1. J. A. Yáñez, P. K. Andrews and N. M. Davies, Methods of analysis and separation of chiral flavonoids, *J. Chromatogr. B* **848** (2007) 159–181; https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.10.052
2. J. Xiao and P. Högger, Metabolism of dietary flavonoids in liver microsomes, *Curr. Drug Metab.* **14** (2013) 381–391; https://doi.org/10.2174/1389200211314040003
3. B. H. Havsteen, The biochemistry and medical significance of the flavonoids, *Pharmacol. Therapeut.* **96** (2002) 67–202; https://doi.org/10.1016/S0163-7258(02)00298-X
4. J. Viskupičová, M. Ondrejovič and E. Šturdík, Bioavailability and metabolism of flavonoids, *J. Food Nutr. Res.* **47** (2008) 151–162.
5. F. P. Guengerich, Cytochrome P450 and chemical toxicology, *Chem. Res. Toxicol.* **21** (2008) 70–83; https://doi.org/10.1021/tx700079z
6. V. P. Androutsopoulos, A. Papakyriakou, D. Vourloumis and D. A. Spandidos, Comparative CYP1A1 and CYP1B1 substrate and inhibitor profile of dietary flavonoids, *Bioorg. Med. Chem.* **19** (2011) 2842–2849; https://doi.org/10.1016/j.bmc.2011.03.042
7. S. E. Nielsen, V. Breinholt, U. Justesen, C. Cornett and L. O. Dragsted, *In vitro* biotransformation of flavonoids by rat liver microsomes, *Xenobiotica* **28** (1998) 389–401; https://doi.org/10.1080/004982598239498
8. V. M. Breinholt, E. A. Offord, C. Brouwer, S. E. Nielsen, K. Brøsen and T. Friedberg, *In vitro* investigation of cytochrome P450-mediated metabolism of dietary flavonoids, *Food Chem. Toxicol.* **40** (2002) 609–616; https://doi.org/10.1016/S0278-6915(01)00125-9
9. A. Gradolatto, M. C. Canivenc-Lavier, J. P. Basly, M. H. Siess and C. Teyssier, Metabolism of apigenin by rat liver phase I and phase II enzymes and by isolated perfused rat liver, *Drug Metab. Dispos.* **32** (2004) 58–65; https://doi.org/10.1124/dmd.32.1.58
10. V. Androutsopoulos, N. Wilsher, R. R. J. Arroo and G. A. Potter, Bioactivation of the phytoestrogen diosmetin by CYP1 cytochromes P450, *Cancer Lett.* **274** (2009) 54–60; https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.08.032
11. S. E. Nielsen, V. Breinholt, C. Cornett and L. O. Dragsted, Biotransformation of the citrus flavone tangeretin in rats. Identification of metabolites with intact flavane nucleus, *Food Chem. Toxicol.* **38** (2000) 739–746; https://doi.org/10.1016/S0278-6915(00)00072-7
12. V. M. Breinholt, S. E. Rasmussen, K. Brøsen and T. H. Friedberg, *In vitro* metabolism of genistein and tangeretin by human and murine cytochrome P450s, *Pharmacol. Toxicol.* **93** (2003) 14–22; https://doi.org/10.1034/j.1600-0773.2003.930102.x

13. Y. Otake and T. Walle, Oxidation of the flavonoids galangin and kaempferide by human liver microsomes and CYP1A1, CYP1A2 and CYP2C9, *Drug Metab. Dispos.* **30** (2002) 103–105; https://doi.org/10.1124/dmd.30.2.103

14. S. E. Kulling, D. M. Honig and M. Metzler, Oxidative metabolism of the soy isoflavones daidzein and genistein in humans *in vitro* and *in vivo*, *J. Agric. Food Chem.* **49** (2001) 3024–3033; https://doi.org/10.1021/jf0012695

15. S. E. Kulling, D. M. Honig, T. J. Simat and M. Metzler, Oxidative *in vitro* metabolism of the soy phytoestrogens daidzein and genistein, *J. Agric. Food Chem.* **48** (2000) 4963–4972; https://doi.org/10.1021/jf000524i

16. S. E. Kulling, L. Lehmann and M. Metzler, Oxidative metabolism and genotoxic potential of major isoflavone phytoestrogens, *J. Chromatogr. B* **777** (2002) 211–218; https://doi.org/10.1016/S1570-0232(02)00215-5

17. M. Hu, K. Krausz, J. Chen, X. Ge, J. Li, H. L. Gelboin and F. J. Gonzalez, Identification of CYP1A2 as the main isoform for the phase I hydroxylated metabolism of genistein and a prodrug converting enzyme of methylated isoflavones, *Drug Metab. Dispos.* **31** (2003) 924–931; https://doi.org/10.1124/dmd.31.7.924

18. J. Bursztyka, E. Perdu, J. Tulliez, L. Debrauwer, G. Delous, C. Canlet, G. De Sousa, R. Rahmani, E. Benfenati and J. P. Cravedi, Comparison of genistein metabolism in rats and humans using liver microsomes and hepatocytes, *Food Chem. Toxicol.* **46** (2008) 939–948; https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.10.023

19. K. M. Atherton, E. Mutch and D. Ford, Metabolism of the soyabean isoflavone daidzein by CYP1A2 and the extra-hepatic CYPs 1A1 and 1B1 affects biological activity, *Biochem. Pharmacol.* **72** (2006) 624–631; https://doi.org/10.1016/j.bcp.2006.05.015

20. H. Doostdar, M. D. Burke and R. T. Mayer, Bioflavonoids: selective substrates and inhibitors for cytochrome P450 CYP1A and CYP1B1, *Toxicology* **144** (2000) 31–38; https://doi.org/10.1016/S0300-483X(99)00215-2

21. J. M. Young, W. Xiaodong and E. M. Marilyn, Dietary flavonoids: Effects on xenobiotic and carcinogen metabolism, Toxicol. *In Vitro* **20** (2006) 187–210; https://doi.org/10.1016/j.tiv.2005.06.048

22. Y. Kimura, H. Ito, R. Ohnishi and T. Hatano, Inhibitory effects of polyphenols on human cytochrome P450 3A4 and 2C9 activity, *Food Chem. Toxicol.* **48** (2010) 429–435; https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.10.041

23. M. Bojić, C. A. Sedgeman, L. D. Nagy and F. P. Guengerich, Aromatic hydroxylation of salicylic acid and aspirin by human cytochromes P450, *Eur. J. Pharm. Sci.* **73** (2015) 49–56; https://doi.org/10.1016/j.ejps.2015.03.015

24. M. Medić-Šarić, V. Rastija and M. Bojić, Recent advances in the application of high performance liquid chromatography in the analysis of polyphenols in wine and propolis, *J. AOAC Int.* **94** (2011) 32–42.

25. M. Barbarić, K. Mišković, M. Bojić, M. Baus Lončar, A. Smolčić-Bubalo, Ž. Debeljak and M. Medić-Šarić, Chemical composition of the ethanolic propolis extracts and its effect on HeLa cells, *J. Ethnopharmacol.* **135** (2011) 772–778; https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.04.015

26. D. Tsimogiannis, M. Samiotaki, G. Panayotou and V. Oreopoulou, Characterization of flavonoid subgroups and hydroxy substitution by HPLC-MS/MS, *Molecules* **12** (2007) 593–606; https://doi.org/10.3390/12030593

27. F. Cuyckens and M. Claeys, Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids, *J. Mass Spectrom.* **39** (2004) 1–15; https://doi.org/10.1002/jms.585

28. F. P. Guengerich, *Human Cytochrome P450 Enzymes*, in *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry* (Ed. P. R. Ortiz de Montellano), 4th ed., Springer Int. Publ. Switzerland, Cambridge 2015; https://doi.org/10.1007/978-3-319-12108-6_9

29. V. P. Androutsopoulos, S. Mahale, R. R. J. Arroo and G. Potter, Anticancer effects of the flavonoid diosmetin on cell cycle progression and proliferation of MDA-MB 468 breast cancer cells due to CYP1 activation, *Oncol. Rep.* **21** (2009) 1525–1528; https://doi.org/10.3892/or_00000384

10 ŽIVOTOPIS

Goran Benković rođen je 7. siječnja 1982. godine u Splitu gdje završava osnovnu školu 1996. godine. Prirodoslovno-matematičku XV. gimnaziju (bivši MIOC) završava u Zagrebu 2000. godine i iste godine upisuje Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Diplomski rad prijavio je na Zavodu za farmaceutsku kemiju pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Marice Medić-Šarić s temom „Određivanje onečišćenja u preparatu Neupogen® 30 tehnikom kapilarne elektroforeze – Razvoj i validacija metode –“, a izradio ga u Istraživačkom institutu PLIVE. Diplomirao je 2006. godine s izvrsnim uspjehom te stekao titulu magistra farmacije. Iste godine zapošljava se u Agenciji za lijekove i medicinske proizvode kao analitičar u odsjeku za kromatografska ispitivanja službenog laboratorija za provjeru lijekova. Od 2012. godine član je hrvatske delegacije pri Komisiji Europske farmakopeje u Strasbourgu, a kao član stručnih grupa Europske farmakopeje sudjeluje u izradi monografija djelatnih tvari i gotovih lijekova. Od 2013. godine sudjeluje u pripremi redovitih izdanja Hrvatske farmakopeje. Od 2014. godine zamjenik je predsjednika Povjerenstva za farmakopeju, a od 2019. godine potpredsjednik Komisije Europske farmakopeje. Godine 2008. upisao je doktorski studij “Farmaceutsko-biokemijske znanosti” na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu. Nakon obavljanja pripravničkog staža magistra farmacije u ljekarni, 2014. godine položio je stručni ispit i stekao odobrenje za samostalan rad. U razdoblju od 2015. do 2017. godine educirao se prema programu specijalističkog usavršavanja magistara farmacije Ministarstva zdravstva. Godine 2017. obranio je specijalistički rad pod nazivom „Čistoća najčešće korištenih generičkih lijekova za kardiovaskularne bolesti u Republici Hrvatskoj“ i stekao titulu specijalista ispitivanja i kontrole lijekova. Autor je pet znanstvenih radova objavljenih u časopisima zastupljenima u bazama Current Contents i Web of Science Core Collection. Sudjelovao je na više međunarodnih i domaćih kongresa te je koautor sveukupno 22 posterska priopćenja.

Popis znanstevnih radova:

1. **G. Benković**, M. Sokolić, B. Čudina, R. Truban Žulj, S. Tomić. Analysis of purity profiles of generic lisinopril tablets marketed in Croatia. Coll Antropol 37 (2013) 601-606.
2. **G. Benković**, A. Škrlin, T. Madić, Ž. Debeljak, M. Medić-Šarić. Purity assessment of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in finished drug product by capillary zone electrophoresis. Electrophoresis 35 (2014) 2608–2614.

3. **G. Benković**, H. Rimac, Ž. Maleš, S. Tomić, Z. Lončar, M. Bojić. Characterization of *O*-demethylations and aromatic hydroxylations mediated by cytochromes P450 in the metabolism of flavonoid aglycons. Croat Chem Acta 92 (2019) 115-123.
4. **G. Benković**, M. Bojić, Ž. Maleš, S. Tomić. Screening of flavonoid aglycons' metabolism mediated by the human liver cytochromes P450. Acta Pharm 69 (2019) 541-562.
5. M. Bojić. M. Kondža, H. Rimac, **G. Benković**, Ž. Maleš. The effect of flavonoid aglycones on the CYP1A2, CYP2A6, CYP2C8 and CYP2D6 enzymes activity. Molecules 24 (2019) 24 3174.

11 TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu **Doktorski rad**
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Zavod za farmaceutsku kemiju
Ante Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

METABOLIZAM AGLIKONA ODABRANIH FLAVONOIDA POSREDOVAN HUMANIM JETRENIM CITOKROMIMA P450

Goran Benković

SAŽETAK

Flavonoidi su velika i heterogena skupina polifenolnih spojeva niske molekulske mase koje ljudi hranom svakodnevno unose, a organizmu predstavljaju ksenobiotike kojih se nastoji riješiti. Među najvažnijim mehanizmima koje ljudski organizam ima na raspolaganju za eliminaciju ksenobiotika jest oksidativni metabolizam koji je najvećim dijelom posredovan citokromima P450. Iako su rezultati istraživanja bioloških učinaka *in vitro* obećavajući, flavonoidi često ne ostvaruju svoj farmakološki potencijal *in vivo* zbog slabe bioraspoloživosti. Fiziološki mehanizmi djelovanja i metabolička sudbina flavonoida još su uvijek vrlo slabo istraženi.

Stoga je cilj ovoga rada bio karakterizirati oksidativni metabolizam većeg broja odabranih flavonoida posredovan humanim citokromima P450. U tu svrhu ispitano je 30 odabranih aglikona flavonoida u inkubacijama s humanim jetrenim mikrosomima i rekombinantnim citokromima P450. Nastanak metabolita praćen je tekućinskom kromatografijom spregnutom sa spektrometrijom masa visoke razlučivosti.

U 15 od 30 analiziranih flavonoida primijećen je metabolizam posredovan citokromima P450 1A2, 2C19, 2D6, 2E1 i/ili 3A4. Detektirani metaboliti nastali su reakcijama aromatske hidroksilacije ili *O*-demetilacije ili kombinacijom ovih reakcija. Vrijednosti konstante specifičnosti (k_{cat}/K_m) svih primijećenih metaboličkih reakcija kretale su se u širokom rasponu (0,0015-2,9) $\times$ 10^6 M^{-1} min^{-1} što upućuje na visoku selektivnost humanih jetrenih citokroma P450 prema flavonoidima. Enzim koji je daleko najučinkovitije metabolizirao ispitane flavonoide bio je CYP1A2 što sugerira da je zbog mogućih interakcija potreban dodatni oprez kod unosa flavonoida i istovremene primjene lijekova koji se primarno metaboliziraju putem CYP1A2. U određenoj su mjeri opisana i jedinstvena strukturna obilježja odgovorna za metabolizam posredovan citokromima P450 koja omogućuju predviđanje mogućih metaboličkih putova i za flavonoide koji nisu bili predmetom ovog istraživanja.

Dobiveni rezultati omogućuju bolje razumijevanje metabolizma flavonoida što može pomoći u prevladavanju niske bioraspoloživosti flavonoida *in vivo* i usmjeriti napore istraživača prema pronalaženju flavonoida s povoljnim terapeutskim i metaboličkim profilom.

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

Rad sadrži: 265 stranica, 103 grafička prikaza, 16 tablica i 95 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: flavonoidi, humani jetreni mikrosomi, citokromi P450, metabolizam, LC-MS, enzimska kinetika

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

Ocjenjivači: **Dr. sc. Branka Zorc**, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta

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

Dr. sc. Željko Debeljak, docent Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku Medicinskog fakulteta

Rad prihvaćen: 8. studenoga 2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

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

Doctoral thesis

METABOLISM OF THE SELECTED FLAVONOID AGLYCONES MEDIATED BY HUMAN LIVER CYTOCHROMES P450

Goran Benković

SUMMARY

Flavonoids are large and heterogeneous group of polyphenolic compounds with low molecular mass that people ingest in everyday diet, but represent xenobiotics which human organism tends to eliminate. Among most important mechanisms that human body has at disposal for elimination of xenobiotics is oxidative metabolism mainly mediated by cytochromes P450. Although results of *in vitro* studies are promising, due to low bioavailability flavonoids often do not demonstrate their pharmacological potential *in vivo*. Physiological mechanisms of act as well as metabolic fate of flavonoids are still poorly understood.

The objective of this work was to characterize oxidative metabolism mediated by human cytochromes P450 of larger number of flavonoid compounds. For that purpose, 30 selected flavonoid aglycones were examined in incubations with human liver microsomes and recombinant cytochromes P450. The formation of metabolites was monitored by liquid chromatography coupled with high resolution mass spectrometry.

Out of 30 analyzed flavonoids, 15 was susceptible to oxidative metabolism mediated by cytochromes P450 1A2, 2C19, 2D6, 2E1 and/or 3A4. The detected metabolites were formed by aromatic hydroxylation or *O*-demethylation, or combination of these reactions. The values of catalytic effectiveness (k_{cat}/K_m) of all observed metabolic reactions were obtained in very wide range from 0.0015 to 2.9×10^6 M^{-1} min^{-1} which indicates high selectivity of human liver cytochromes P450 to flavonoids. The dominant enzyme responsible for the observed metabolic reactions was CYP1A2 suggesting that potential interactions of flavonoids with drugs primarily metabolized by CYP1A2 should be considered. Specific structural characteristics responsible for metabolism mediated by cytochromes P450 were determined to some extent thus enabling prediction of possible metabolic pathways for flavonoids other than those analyzed in this study.

These results contribute to better understanding of flavonoid metabolism thus helping to overcome their low bioavailability *in vivo* and steer the efforts of researchers towards detecting flavonoids with desirable therapeutic and metabolic profiles.

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

Thesis includes: 265 pages, 103 figures, 16 tables and 95 references. Original is in Croatian language.

Keywords: flavonoids, human liver microsomes, cytochromes P450, metabolism, LC-MS, enzyme kinetics

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

Reviewers: **Branka Zorc, Ph.D.**, *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Željan Maleš, Ph.D., *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Željko Debeljak, Ph.D., *Assistant Professor*, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek Faculty of Medicine

The thesis accepted: 8th November 2019