Flavonoidi : metaboličke promjene i utjecaj na enzimske sustave

Morović, Marko

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, School of Medicine / Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:171:330124

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-23**

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET
UNIVERSITAS STUDIORUM SPALATENSIS
FACULTAS MEDICA

Repository / Repozitorij:

MEFST Repository

zir.nsk.hr

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO – TEHNOLOŠKI FAKULTET
I
MEDICINSKI FAKULTET

Marko Morović

FLAVONOIDI – METABOLIČKE PROMJENE I UTJECAJ NA ENZIMSKE SUSTAVE

Diplomski rad

Akademska godina: 2017./2018.

Mentorica:

prof. dr. sc. Marica Medić-Šarić

Split, listopad 2018.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO – TEHNOLOŠKI FAKULTET
I
MEDICINSKI FAKULTET

Marko Morović

FLAVONOIDI – METABOLIČKE PROMJENE I UTJECAJ NA ENZIMSKE SUSTAVE

Diplomski rad

Akademska godina: 2017./2018.

Mentorica:

prof. dr. sc. Marica Medić-Šarić

Split, listopad 2018.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Kemijsko-tehnološki fakultet i Medicinski fakultet
Integrirani preddiplomski i diplomski studij FARMACIJA
Sveučilište u Splitu, Republika Hrvatska

Znanstveno područje: Biomedicinske znanosti
Znanstveno polje: Farmacija
Nastavni predmet: Biokemija lijekova
Tema rada je prihvaćena na 53. sjednici Vijeća studija Farmacija te potvrđena na . sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko tehnološkog fakulteta i . sjednici fakultetskog vijeća Medicinskog fakulteta
Mentor: prof. dr. sc. Marica Medić-Šarić
Pomoć pri izradi: -

FLAVONOIDI – METABOLIČKE PROMJENE I UTJECAJ NA ENZIMSKE SUSTAVE

Marko Morović, broj indeksa 120

Sažetak: Cilj ovog diplomskog rada je opisati metabolizam različitih skupina flavonoida u ljudskom organizmu te njihov utjecaj na enzimske sustave, a ovisno o strukturnim značajkama koje flavonoidi moraju posjedovati da bi se taj učinak ostvario. Osnovna struktura flavonoida sastoji se od dva benzenska prstena povezana propanskim lancem. Obično se, prema strukturnim značajkama, flavonoidi dijele u šest glavnih skupina, a to su: antocijanidini, flavan-3-oli, flavoni, flavanoni, izoflavoni i flavonoli. Ulaskom u ljudski organizam, flavonoidi su podložni različitim metaboličkim promjenama od kojih se mogu izdvojiti reakcije hidrolize i hidroksilacije (monooksigenacije) kao reakcije prve faze metabolizma, a od reakcija druge faze značajne su: glukuronidacija, sulfokonjugacija i metilacija. Metabolizam flavonoida započinje reakcijom hidrolize kojom se iz glikozida flavonoida oslobađa aglikonski dio molekule čime se omogućava apsorpcija. Zatim slijede reakcije prve faze metabolizma koje se poglavito odvijaju u jetri pod utjecajem enzima superporodice citokrom P450, a nakon njih i reakcije druge faze. Flavonoidi uglavnom djeluju inhibicijski na različite enzimske sustave, a u ovom radu obrađeni su inhibicijski učinci na: ciklooksigenaze (COX), lipooksigenaze (LOX), enzime citokrom P450 (CYP), ksantin oksidoreduktaze (XOR), fosfodiesteraze (PDE), fosfolipazu A_2 (PLA2) i dr. Istraživanja su pokazala da inhibicijski učinci ovise o strukturnim značajkama flavonoida. Metaboličke promjene flavonoida bitno mijenjaju njihova svojstva i biološke učinke u ljudskom organizmu. Djelovanjem na enzimske sustave flavonoidi ostvaruju različite farmakološke i biokemijske učinke te stoga posjeduju veliki potencijal u prevenciji i terapiji različitih vrsta oboljenja.

Ključne riječi: flavonoidi, metabolizam, enzimski sustavi

Rad sadrži: 65 stranica, 35 slika, 2 tablice , 79 literaturnih citata

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1. red. prof. dr. sc. Darko Modun predsjednik
2. prof. dr. sc. Davorka Sutlović član
3. prof. dr. sc. Marica Medić-Šarić član-mentor

Datum obrane: 04**.** listopad 2018.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u knjižnicama Kemijsko-tehnološkog fakulteta Sveučilišta u Splitu, Split, Ruđera Boškovića 35 i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu, Split, Šoltanska 2.

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

Faculty of Chemistry and Technology and School of Medicine
Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy
University of Split, Croatia

Scientific area:	Biomedical sciences
Scientific field:	Pharmacy
Course title:	Drug Biochemistry
Thesis subject	was approved by Council of Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy, session no. 53 as well as by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. and Faculty Council of School of Medicine, session no. .
Mentor:	Marica Medić-Šarić, PhD, prof**.**
Technical assistence:	**-**

FLAVONOIDS – METABOLIC CHANGES AND EFFECT ON ENZYME SYSTEMS

Marko Morović, index N^0 120

Summary: The aim of this diploma thesis is to describe the metabolism of different flavonoid groups in human body and to describe the effect of flavonoids on the enzymatic systems and structural characteristics that flavonoids must have in order to achieve this effect. The basic structure of flavonoids consists of two benzene rings connected by propan chain. Usually, according to structural characteristics, flavonoids are divided into six major groups: anthocyanidines, flavan-3-ols, flavones, flavanones, isoflavones and flavonols. By entering into human organism, flavonoids are subject to various metabolic changes. Hydrolysis and hydroxylation (monooxygenation) reactions (first phase metabolic reactions) and glucuronidation and sulfation (second phase metabolic reactions) can be extracted. Metabolism of flavonoids begin with hydrolysis during which flavonoid glycosides are set free from aglycone part of the molecule to allow absorption. After absorption, flavonoids are transported to liver where they undergo extensive metabolism which includes first phase of metabolic reactions and also conjugation reactions (glucuronidation and sulfation). Usually, flavonoids inhibit various enzyme systems. Some of the enzymes that have been inhibited by flavonoids are: cyclooxygenase (COX), lipooxygenase (LOX), cytochrome P450 enymes (CYP), xanthine oxidoreductase (XOR), phosphodiesterase (PDE), phospholipase A2 (PLA2). Studies have shown that inhibitory effects depend on the structural characteristics of flavonoids. Metabolic changes of flavonoids significantly alter properties and biological effects in the human body. By acting on enzyme systems, flavonoids accomplish different pharmacological and biochemical effects and thus have great potential in preventing and treating various types of diseases.

Key words: flavonoids, metabolic changes, enzyme systems

Thesis contains: 65 pages, 35 figures, 2 tables, 79 references

Original in: Croatian

Defence committee:

1. Darko Modun – PhD, full prof. chair person
2. Davorka Sutlović – PhD, full prof. member
3. Marica Medić-Šarić – PhD, full prof. supervisor

Defence date: October 04th 2018.

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposed in Library of Faculty of Chemistry and Technology University of Split, Split, Ruđera Boškovića 35 and Library of School of Medicine, University of Split, Split, Šoltanska 2.

Zahvala

Od srca se zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Marici Medić-Šarić na pomoći i uloženom vremenu za izradu ovog diplomskog rada.

Također se želim zahvaliti svojoj obitelji i prijateljima na podršci i razumijevanju tijekom studiranja.

SADRŽAJ

1. UVOD 1

1.1. Flavonoidi 2

1.2. Uloga flavonoida u biljnom svijetu 2

1.3. Podjela flavonoida 3

1.3.1. Antocijanidini 3

1.3.2. Flavoni 3

1.3.3. Flavanoni 4

1.3.4. Flavan-3-oli 4

1.3.5. Flavonoli 5

1.3.6. Izoflavoni 5

2. CILJ ISTRAŽIVANJA 7

3. MATERIJALI I METODE 9

3.1. Materijali 10

3.2. Metode 12

3.2.1. Hidroliza 13

3.2.2. Hidroksilacija (monooksigenacija) 13

3.2.3. Glukuronidacija 14

3.2.4. Sulfokonjugacija 15

3.2.5. Metilacija 16

4. REZULTATI 19

4.1. Metabolizam flavonoida 20

4.1.1. Promjene u usnoj šupljini 20

4.1.2. Promjene u želucu 20

4.1.3. Metaboličke promjene u crijevima 21

4.1.3.1. Apsorpcija u tankom crijevu 21

4.1.3.2. Utjecaj crijevne mikroflore 22

4.1.4. Reakcije oksidacije enzimima superporodice citokrom P450 25

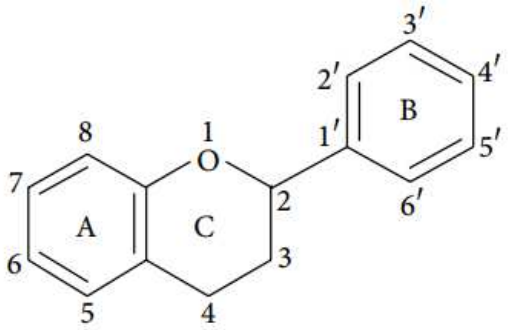
4.1.5. Reakcije konjugacije flavonoida 27
4.2. Utjecaj flavonoida na enzimske sustave 32
4.2.1. Utjecaj na oksidoreduktaze 32
4.2.1.1. Ciklooksigenaze i lipooksigenaze 32
4.2.1.2. Enzimi citokrom P450 (CYP) 35
4.2.1.3. Dehidrogenaze 36
4.2.1.4. Ksantin oksidoreduktaza (XOR) 36
4.2.1.5. Aldoza reduktaza 37
4.2.2. Utjecaj na transferaze 37
4.2.2.1. Glutation S-transferaze (GST) 37
4.2.2.2. UDP glukuronozil-transferaze (UGT) 39
4.2.2.3 Sulfoniltransferaze (SULT) 39
4.2.2.4. N-acetiltransferaze (NAT) 39
4.2.3. Utjecaj na hidrolaze 40
4.2.3.1. Fosfodiesteraze (PDE) 40
4.2.3.2. Hijaluronidaze 41
4.2.3.3. Fosfolipaza A_2 41
4.2.4. Utjecaj na lijaze 42
4.2.4.1. Sintaza masnih kiselina 42
4.2.5. Utjecaj na izomeraze 42
4.2.5.1. DNA topoizomeraze 42
4.2.6. Utjecaj na ligaze 43
4.2.6.1. D-alanin ligaza 43
5. RASPRAVA 44
5.1. Farmakoterapijski učinci flavonoida 45
5.2. Pripravci na bazi flavonoida u ljekarni 47
6. ZAKLJUČCI 50

7. POPIS CITIRANE LITERATURE 52
8. SAŽETAK 60
9. SUMMARY 62
10. ŽIVOTOPIS 64

1. UVOD

1.1. Flavonoidi

Flavonoidi su polifenolni spojevi koje nalazimo u biljkama, a sastoje se od petnaest ugljikovih atoma tipa C_6-C_3-C_6 odnosno dviju benzenskih jezgara povezanih propanskim lancem (Slika 1.). Derivati su benzo-γ-pirona (1). Glavne skupine flavonoida su: flavoni, flavanoni, flavani, flavonoli, izoflavoni i antocijanidini. Ostale manje zastupljene skupine flavonoida su: kalkoni, dihidrokalkoni, dihidroflavonoli, flavan-3,4-dioli, kumarini i auroni (2). Međusobno se razlikuju prema položaju prstena B, broju i položaju hidroksilnih i metoksi skupina, prisutnosti karbonilne skupine na C4 atomu, oksidacijskom statusu prstena C, te vrsti, broju i položaju šećernih ostataka vezanih na aglikonsku strukturu. Najčešće dolaze u obliku glikozida, osim flavanola (flavonoidi čaja) koji dolaze u obliku aglikona. Na aglikonski dio najčešće su vezani šećeri D-glukoza, D-galaktoza, L-ramnnoza, L-arabinoza, D-ksiloza, D-galakturonska kiselina i disaharid rutinoza (glukoza + ramnoza) (1). Flavonoidi su aktivni sastojci mnogih biljaka te ostvaruju različite farmakološke učinke kao što su: protuupalni, antioksidacijski, antineoplastični, antimikrobni i kardioprotektivni učinak (3, 4).



Slika 1. Osnovna struktura flavonoida (5).

1.2. Uloga flavonoida u biljnom svijetu

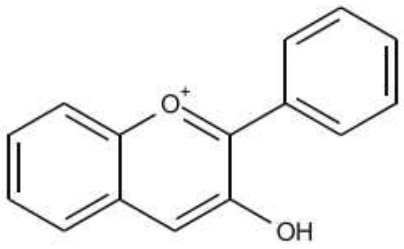
U biljkama flavonoidi predstavljaju sekundarne metabolite te obavljaju nekoliko važnih funkcija. Do sada ih je iz biljaka izolirano više od 6000 (6). Imaju sposobnost apsorpcije UV-zračenja, inhibiraju stvaranje reaktivnih kisikovih spojeva (ROS, engl. *reactive oxygen species*), a također djeluju i na već stvorene ROS. Količina antioksidacijskog kapaciteta i sposobnost apsorpcije UV-zračenja ovisi o supstituentima na prstenovima flavonoida (5). Uglavnom su obojene tvari koje daju boju laticama, plodovima i katkad listovima stoga imaju važnu ulogu u privlačenju oprašivača (3, 5). Posrednici su u simbiotskom odnosu biljaka, uglavnom mahunarki, i mikroorganizama odgovornih za fiksaciju dušika potrebnog za rast i razvoj biljaka. U ovom slučaju flavonoidi potiču

transkripciju bakterijskih gena, a time nastanak proteina potrebnih za pozitivnu bakterijsku infekciju biljaka. Također, naglašena je i obrambena uloga flavonoida u biljkama. Flavonoide važne za tu funkciju možemo podijeliti u dvije skupine i to inducibilne koji se sintetiziraju kao odgovor na ozljedu, infekciju ili traumu te već formirane, koji se skladište na strateškim mjestima na kojima bi mogli imati važnu ulogu u obrani biljnog organizma. Od ostalih uloga možemo navesti antifungalni učinak (flavonoidi ječma) te obrana od biljojeda (3).

1.3. Podjela flavonoida

1.3.1. Antocijanidini

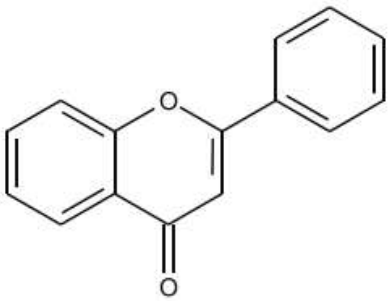
Najzastupljeniji aglikoni antocijanidina su: pelargonidin, cijanidin, delfinidin, peonidin, petunidin i malvidin, koji se međusobno razlikuju po broju i položaju hidroksilnih skupina i stupnju metilacije. Formiraju konjugate sa šećerima i organskim kiselinama koji su topljivi u vodi te su odgovorni za plavo, tamnoplavo, ljubičasto i crveno obojenje cvjetova, plodova i drugih biljnih organa (2, 4). Glavni izvori antocijanidina u prirodi su: borovnice, trešnje, jagode i crno vino (7).



Slika 2. Struktura antocijanidina (8).

1.3.2. Flavoni

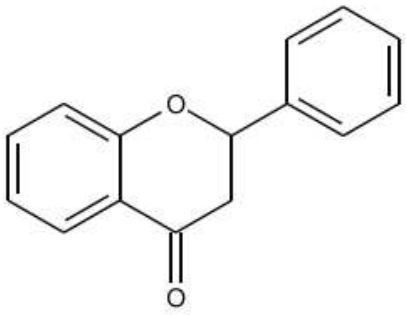
Flavoni, kao što su apigenin, luteolin, wogonin i baikalein, strukturno su slični flavonolima, a jedina razlika je ta što flavoni nemaju hidroksilnu skupinu na položaju 3. Moguće su različite supstitucije i to hidroksilne, metilne i alkilne skupine te O- i C-glikozidi (2). Općenito, flavoni nisu široko rasprostranjeni, a znatne količine ovih flavonoida nalaze se u peršinu, celeru, timijanu i ružmarinu (1, 2). Sudjeluju u stvaranju okusa i boje kod mnogih biljnih vrsta (1).



Slika 3. Struktura flavona (8).

1.3.3. Flavanoni

Flavanone, kao što su naringenin i hesperetin, karakteriziraju nedostatak C2-C3 dvostruke veze te kiralni centar na položaju 2. Uglavnom dolaze u obliku S- ili (–)-enantiomera. Dolaze u obliku hidroksiliranih, glikoziliranih i O-metiliranih derivata. Glavni izvori ovih flavonoida su citrusi pa je tako hesperetin odgovoran za okus naranče, a naringen za intenzivan gorak okus grejpfruta (2).

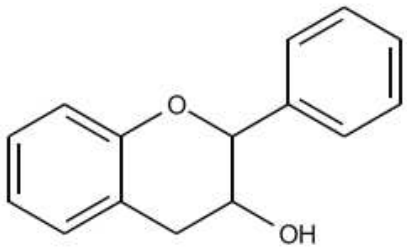


Slika 4. Struktura flavanona (8).

1.3.4. Flavan-3-oli

Flavan-3-oli su najsloženija skupina flavonoida jer dolaze u širokom rasponu od jednostavnih monomera pa preko oligomera do polimernih proantocijanidina koji su poznati i kao kondenzirani tanini. Imaju dva kiralna centra na položajima 2 i 3, stoga daju četiri izomera od kojih su dva, (+)-katehin i (–)-epikatehin, široko rasprostranjeni u prirodi. Monomerni flavan-3-oli su zastupljeni u velikim koncentracijama u zelenom čaju i to u obliku konjugata s galnom kiselinom, a to su: (–)-epigalokatehin (EGC), (–)-epigalokatehin-3-O-galat (EGCG) i (–)-epikatehin-3-O-galat (ECG). Proantocijanidini dolaze u obliku polimera koji sadrže od dvije do pedeset monomernih jedinica. Proantocijanidini koji su isključivo

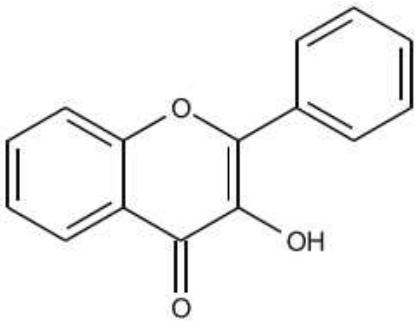
građeni od jedinica (epi)katehina, nazivaju se procijanidini te su najrasprostranjeniji proantocijanidini u biljkama (2).



Slika 5. Struktura flavan-3-ola (8).

1.3.5. Flavonoli

Flavonoli su široko rasprostranjeni u cijelom biljnom carstvu izuzev algi. Najčešći flavonoli, kempferol, kvercetin, izorhamnetin i miricetin, dolaze u obliku glikozida sa konjugatima na položajima 5, 7, 3′, 4′ i 5′. Iako je broj aglikona ograničen, postoji oko dvjesto glikozida kempferola. Žuti i crveni luk su bogati izvori flavonola i to kvercetin-4-O-glukozida te kvercetin-3,4′-O-diglukozida (2). Ostali značajni izvori ovih flavonoida su: rajčice, trešnje, jabuke te zeleni i crni čaj (7).

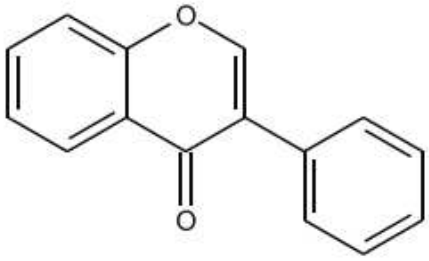


Slika 6. Struktura flavonola (8).

1.3.6. Izoflavoni

Izoflavoni, za razliku od drugih skupina flavonoida, imaju prsten B supstituiran na položaju 3 umjesto na položaju 2. Nalazimo ih isključivo u mahunarkama i to poglavito u soji gdje su najzastupljeniji genistein i daidzein. Fermentirani proizvodi soje mogu biti bogati aglikonima kao rezultat hidrolize glikozida, dok proizvodi čija proizvodnja uključuje zagrijavanje, kao što su sojino mlijeko i tofu, sadrže smanjene količine izoflavona, uglavnom

u obliku daidzein i genistein glukozida. Zbog svoje strukture slični su estrogenima pa su klasificirani kao fitoestrogeni (2).



Slika 7. Struktura izoflavona (8).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

U ovom radu su istraživani polifenolni spojevi široko zastupljeni u biljnom svijetu, s naglaskom na flavonoide kao vrlo važne sastavnice brojnih pripravaka koji se mogu naći u ljekarnama. Mnogi su od njih registrirani kao lijekovi, ali postoje i brojni pripravci koji se u ljekarnama mogu dobiti bez recepta. Iz navedenih razloga važno je poznavati njihov metabolizam i utjecaj na enzimske sustave u humanom organizmu.

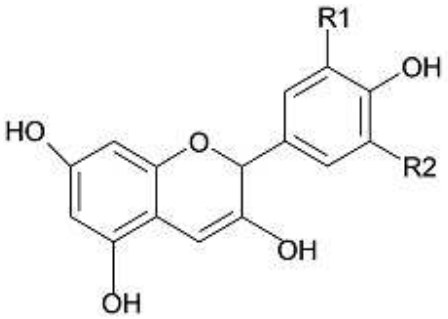
Cilj ovog diplomskog rada je prikazati i opisati glavne metaboličke putove i promjene kojima su podložni flavonoidi nakon ulaska u ljudski organizam. Kako se te promjene *in vivo* ostvaruju pod utjecajem brojnih enzimskih sustava, cilj je i opisati utjecaj različitih skupina flavonoida na enzimske sustave te opisati glavne strukturne značajke flavonoida odgovorne za te utjecaje.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

Flavonoidi predstavljaju vrlo raznoliku skupinu spojeva koji se poglavito razlikuju po svojoj strukturi. Obično se, prema strukturnim karakteristikama, dijele u šest glavnih skupina, iako se ta podjela često može proširiti na manje zastupljene skupine flavonoida. U ovom poglavlju navedeni su najznačajniji flavonoidi prema skupinama kojima pripadaju te funkcionalne skupine koje karakteriziraju njihovu strukturu:

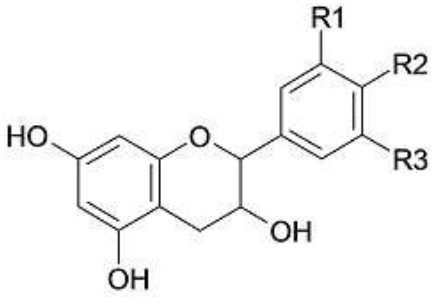
a) Antocijanidini



Antocijanidini	R_1	R_2
Cijanidin	–OH	–H
Pelargonidin	–H	–H
Delfinidin	–OH	–OH
Peonidin	$–OCH_3$	–H
Petunidin	–OH	$–OCH_3$
Malvidin	$–OCH_3$	$–OCH_3$

Slika 8. Osnovna struktura i najčešće istraživani antocijanidini.

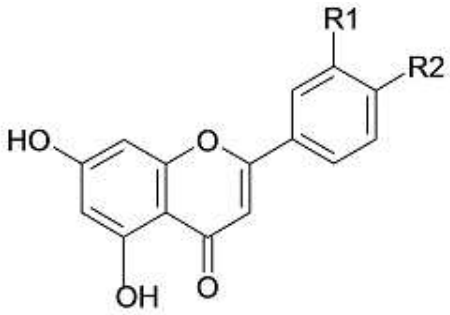
b) Flavan-3-oli



Flavan-3-oli	R_1	R_2	R_3
(+)–katehin	–OH	–OH	–OH
(-)–epikatehin	–H	–OH	–H

Slika 9. Osnovna struktura i najčešće istraživani flavan-3-oli.

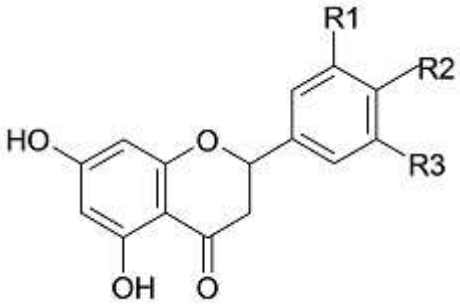
c) Flavoni



Flavoni	R_1	R_2
Luteolin	–OH	–OH
Apigenin	–H	–OH
Krizin	–H	–H
Akacetin	–H	$–OCH_3$
Diosmetin	–OH	$–OCH_3$
Krizoeriol	$–OCH_3$	–OH

Slika 10. Osnovna struktura i najčešće istraživani flavoni.

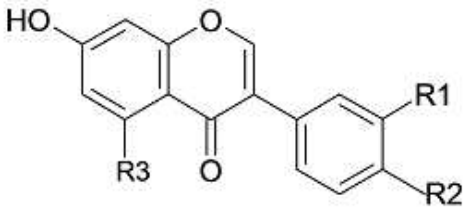
d) Flavanoni



Flavanoni	R_1	R_2	R_3
Naringenin	–H	–OH	–H
Hesperetin	–OH	$–OCH_3$	–H

Slika 11. Osnovna struktura i najčešće istraživani flavanoni.

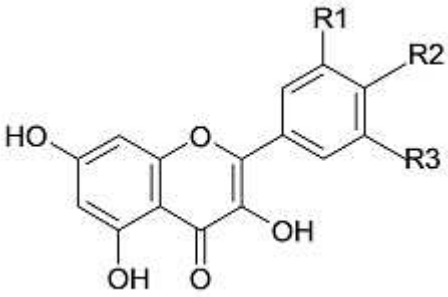
e) Izoflavoni



Izoflavoni	R_1	R_2	R_3
Genistein	–H	–OH	–OH
Daidzein	–H	–OH	–H

Slika 12. Osnovna struktura i najčešće istraživani izoflavoni.

f) Flavonoli



Flavonoli	R_1	R_2	R_3
Kempferol	–H	–OH	–H
Kvercetin	–OH	–OH	–H
Galangin	–H	–H	–H
Miricetin	–OH	–OH	–OH

Slika 13. Osnovna struktura i najčešće istraživani flavonoli.

3.2. Metode

U ovom diplomskom radu pozornost je posvećena metaboličkim promjenama flavonoida u ljudskom organizmu. Stoga su opisane najznačajnije reakcije I. i II. faze metabolizma kojima podliježe ova skupina spojeva. Od reakcija I. faze, pozornost je posvećena reakcijama hidrolize i hidroksilacije (monooksigenacije), a od reakcija II. faze biotransformacije, reakcijama glukuronidacije, sulfokonjugacije te metilacije.

3.2.1. Hidroliza

Hidroliza predstavlja reakciju endogenog ili egzogenog supstrata s nukleofilnim sastojkom stanice (H_20). Česta je reakcija biotransformacije kod metabolizma endogenih tvari (peptida, lipida, proteina i dr.) i ksenobiotika (lijekova). Reakcijom hidrolize mijenjaju se fizičko-kemijske osobine ksenobiotika kao što su topljivost, kiselost, a mijenja se i površinska napetost. Hidroliza ksenobiotika može se odvijati posredovanjem enzima ili neenzimski, što uglavnom ovisi o strukturi supstrata. Enzimi koji kataliziraju hidrolitičke reakcije nazivaju se hidrolaze koje su aktivne u svim organima i tkivima. Unutar stanice nalaze se u membranama i to endoplazmatskog retikuluma i mitohondrija te u citosolu. Hidrolaze se dijele prema strukturnim značajkama i nazivima pretežitih supstrata. Najznačajniji predstavnici ovih enzima su karboksil-esteraze, kolin-esteraze, aril-esteraze, sterol-esteraze, epoksid-hidrolaze, fosfataze i peptidaze. Najčešći supstrati hidrolaza, pri biotransformaciji, su esteri i amidi. Hidroliza estera se može odvijati i neenzimski ukoliko se u blizini esterske ili amidne veze nalazi skupina, koja privlači elektrone. Hidrolizom estera i amida nastaju karboksilne kiseline i alkoholi, odnosno amini, a nastali produkti mogu biti supstrati reakcija II. faze i zatim se izlučivati iz organizma urinom ili fecesom (9).

U metabolizmu ksenobiotika, ovisno o strukturi supstrata, manje zastupljene reakcije koje kataliziraju peptidaze i enzimi koji kataliziraju hidrolize konjugata odnosno produkata reakcije II. faze (β-glukozidaze). β-glukozidaze su smještene u endoplazmatskom retikulumu, lizosomima i krvnom serumu, a posebnu važnost imaju i one u intestinalnim bakterijama. U probavnom sustavu ovi enzimi hidroliziraju konjugate koji se izlučuju putem žuči (9).

3.2.2. Hidroksilacija (monooksigenacija)

Reakcije hidroksilacije najčešće su reakcije među reakcijama oksidacije. Ovaj tip reakcije kataliziraju enzimi citokrom P450 (CYP). Oni kataliziraju oksidativne biotransformacije lipofilnih supstrata u polarnije metabolite te su smješteni u membranama stanica gotovo svih tkiva, a osobito u endoplazmatskom retikulumu (mikrosomima) jetre. Opći prikaz reakcije hidroksilacije (monooksigenacije) katalizirane enzimima citokrom P450:

$$RH + O_2 + NADPH + H^+ \xrightarrow[[O]]{CYP} ROH + NADP^+ + H_2O$$

Atom kisika koji se uvodi u molekulu supstrata dolazi od molekulskog kisika, u stanicu ulazi disanjem, a aktivira se u reaktivan oblik nizom oksidoredukcijskih reakcija.

Oksigenaciju molekule supstrata provodi atom kisika (u reakcijama se označava s [O]), a smatra se da predstavlja intermedijarni radikalni oblik koji nastaje reakcijama na aktivnom centru enzima citokrom P450. Najčešće se hidroksiliraju ugljikovi atomi kao dijelovi alkilnih lanaca, cikličkih i aromatskih struktura, te atomi dušika, sumpora i fosfora (9).

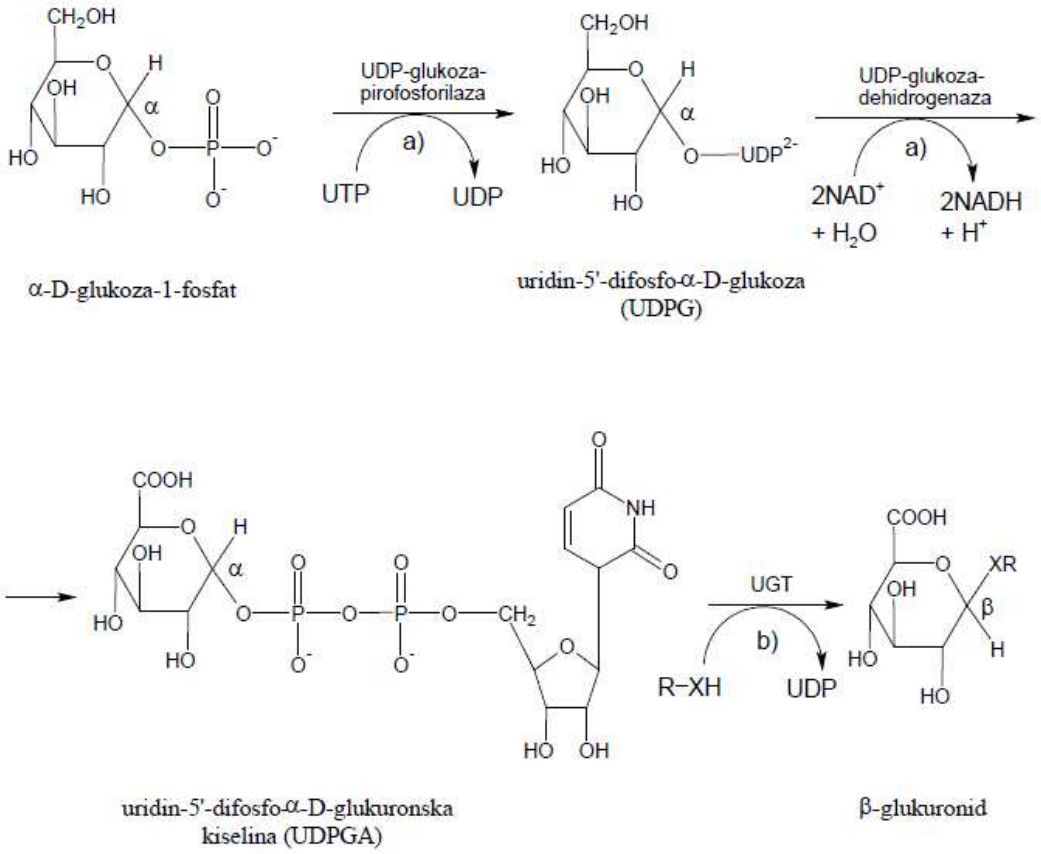
3.2.3. Glukuronidacija

Reakcije glukuronidacije su glavni put biotransformacije ksenobiotika. Pospješuju eliminaciju mnogih lipofilnih ksenobiotika i endobiotika, a karakterizira ih prijenos glikozilne skupine s uridindifosfat-glukuronske kiseline (UDPGA) na različite endogene i egzogene supstrate i njihove metabolite. Ove reakcije kataliziraju enzimi superporodice UDP-glukuronoziltransferaza (UGT), a smješteni su u endoplazmatskom retikulumu stanica jetre i drugih tkiva. Klasificirani su u četiri porodice: UGT1, UGT2, UGT3 i UGT8. Produkti reakcija glukuronidacije su glukuronidi koji se iz organizma izlučuju putem urina ili žuči. Reakcije glukuronidacije se odvijaju u dva koraka:

a) Biosinteza uridindifosfo-glukuronske kiseline iz α-D-glukoze-1-fosfata. Reakciju katalizira UDP-glukoza-pirofosforilaza pri čemu nastaje uridin-5'-α-D-glukoza koja se potom oksidira u UDPGA djelovanjem UDP-glukoza-dehidrogenaze.

b) Prijenos glukuronozilnog ostatka nukleofilnom supstitucijom na supstrat (HXR) reakcijom koju katalizira UGT.

Inverzija konfiguracije koja je rezultat nukleofilnog napada atoma bogatog elektronima je osnovna značajka reakcije glukuronidacije. UDPGA u svojoj strukturi ima α-konfiguraciju dok produkti, glukuronidi, imaju β-konfiguraciju. α-konfiguracija onemogućava djelovanje β-glukuronidaze (Slika 14.) (9).



Slika 14. Mehanizam reakcije glukuronidacije (9).

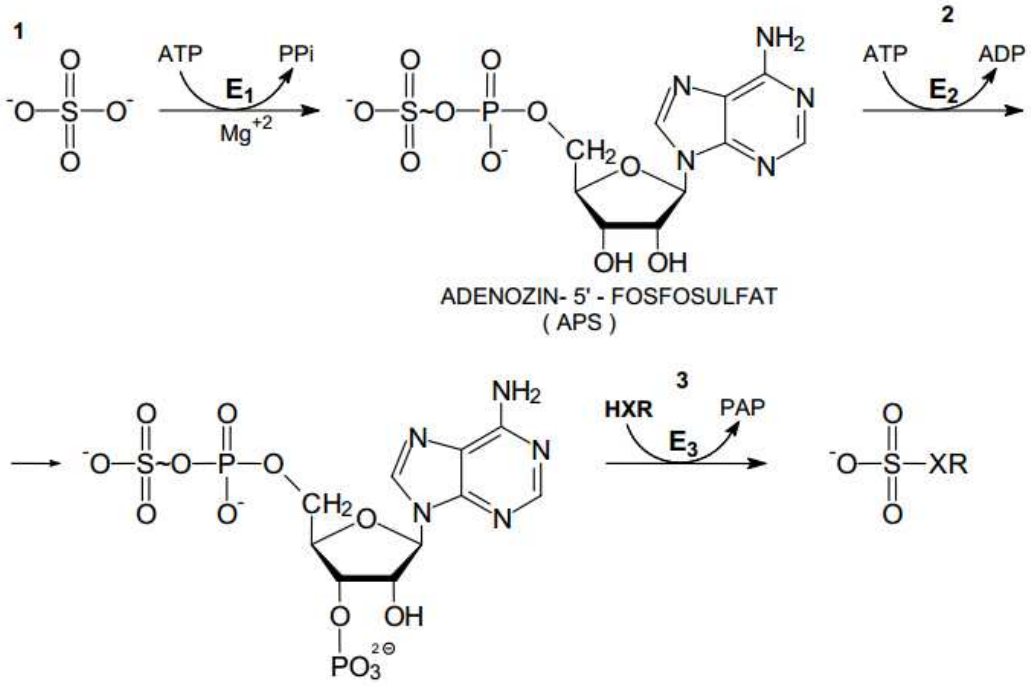
3.2.4. Sulfokonjugacija

Reakcije sulfokonjugacije su reakcije prijenosa sulfonatne skupine s 3´-fosfoadenozin-5´-fosfosulfata (PAPS) na molekulu supstrata. Supstrati u reakcijama sulfokonjugacije mogu biti različite kemijske tvari (fenoli, metaboliti policikličkih aromatskih ugljikovodika), te prirodni (resveratrol) i fiziološki supstrati (dopamin, hidroksisteroidi). Enzimi koji kataliziraju reakcije sulfokonjugacije su sulfotransferaze (SULT). To su citosolni enzimi koje nalazimo u jetri, bubrezima, probavnom traktu, plućima, mozgu i trombocitima, a dijelimo ih u pet porodica: SULT1, SULT2, SULT3, SULT4 i SULT6. Produkti reakcije sulfokonjugacije su sulfati. Reakcija sulfokonjugacije se odvija u tri koraka (Slika 15.):

a) Aktivacija anorganskog sulfata ($–SO_4^{2-}$) pomoću ATP u adenozin-5´-fosfosulfat (APS) enzimom ATP-sulfurilazom pri čemu kao produkt nastaje i pirofosfat.

b) Fosforilacija APS-a u 3´-fosfoadenozin-5´-fosfosulfat (PAPS) pomoću ATP i enzima APS-fosfokinaze. U ovoj reakciji PAPS prenosi sulfurilnu skupinu na supstrat.

c) U trećem koraku PAPS reagira sa supstratom i prenosi sulfonatnu skupinu. Sulfokonjugacija supstrata PAPS-om, odvija se katalitičkim djelovanjem enzima SULT uz oslobađanje 3´-fosfoadenozin-5´-fosfata (PAP) (9).



Slika 15. Mehanizam reakcije sulfokonjugacije (9).

3.2.5. Metilacija

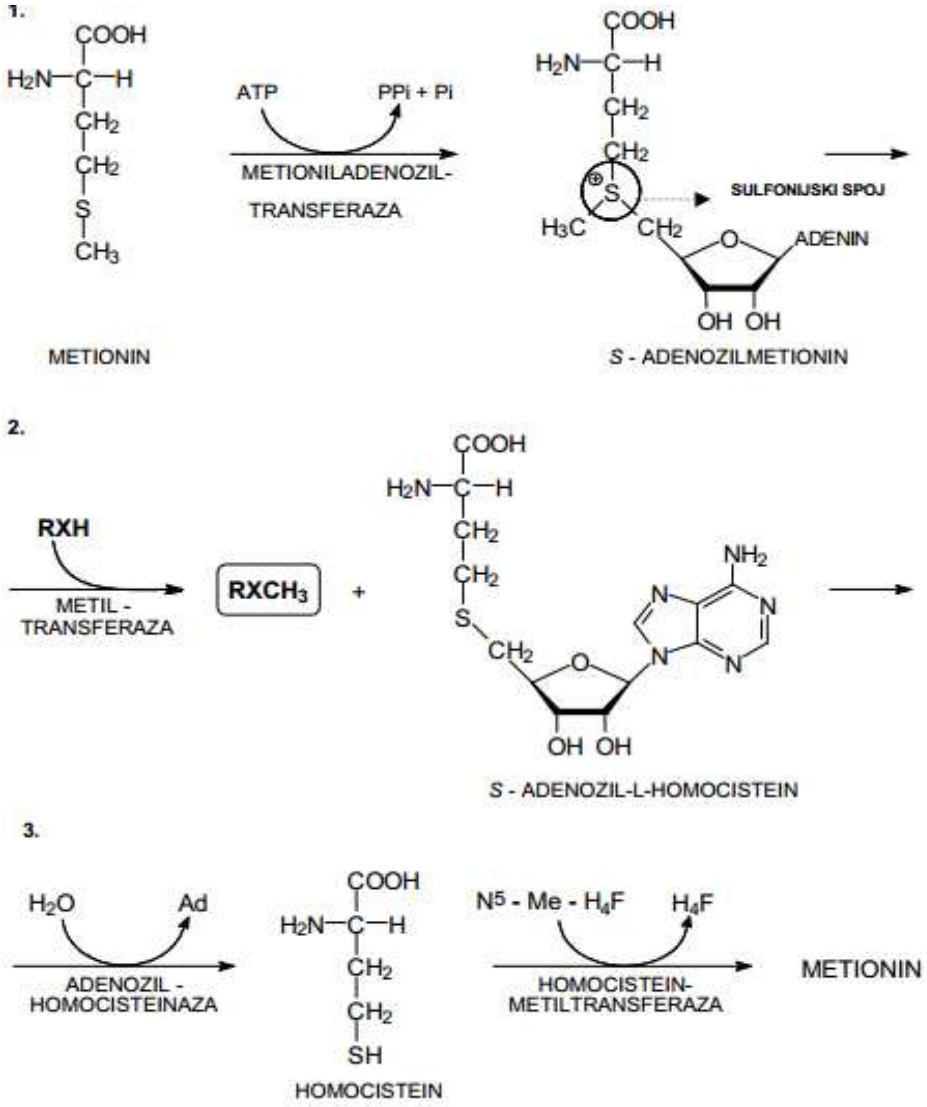
Reakcije konjugacije s metilnom skupinom kao konjugirajućim agensom, mogu se po svojim značajkama smatrati intermedijarnim reakcijama I. i II. faze. Reakcije metilacije su često reverzibilne reakcijama demetilacija, ali uz katalitičko djelovanje različitih enzima. Supstrati u reakcijama metilacije su kemijske tvari ili njihovi metaboliti sa strukturom fenola (–OH), tiola (–SH), aromatskih i alifatskih amina ($–NH_2$), azida (=NH) i tercijarnih N-atoma (–N=). Metilacijama se navedene funkcionalne skupine zaštićuju. Enzimi koji kataliziraju reakcije metilacije ksenobiotika su metiltransferaze (MT), a točan naziv dobivaju prema heteroatomu na koji se prenosi metilna skupina, kao npr. O-, N- i S-metiltransferaze. Smještene su u endoplazmatskom retikulum, ali i u citosolu ukoliko kataliziraju metilaciju endogenih tvari. Najvažniji enzimi koji kataliziraju metilacije ksenobiotika su katehol-O-metiltransferaza i feniletanolamin-N-metiltransferaza. Donori $–CH_3$ skupine u reakcijama metilacija su koenzimi S-adenozilmetionin (SAM), tetrahidrofolna kiselina (THF) i biotin (vitamin B-skupine). Produkti reakcije metilacije se značajno razlikuju od produkata ostalih

reakcija II. faze jer su lipofilniji odnosno manje polarni i manje topljivi u vodi. Reakcija se odvija u tri koraka (Slika 16.):

a) Biosinteza SAM-a iz metionina, u reakciji koju katalizira metionin-adenozintransferaza, enzim za prenošenje metilne skupine. $–CH_3$ skupina metionina nije dovoljna reaktivna pa se metaboličkim reakcijama, pomoću ATP-a, prevodi u aktivni oblik tzv. sulfonijski spoj.

b) Prijenos aktivne metilne skupine, vezane na atom sumpora (kao $–CH_3$), s donora SAM-a na heteroatom supstrata (RXH). Ovom reakcijom nastaje S-adenozilhomocistein, tioeter adenozina.

c) U ovom koraku uz adenozilhomocisteinazu najprije nastaje homocistein, odvajanjem adenozinskog ostataka koji se dalje fosforilira u ATP. Potom se regenerira metionin iz nastalog homocisteina uz enzim homocistein-metiltransferazu i aktiviranu N5-metiltetrahidrofolnu kiselinu (9).



Slika 16. Mehanizam reakcije metilacije (9).

4. REZULTATI

4.1. Metabolizam flavonoida

Većina flavonoida u prirodi dolazi u obliku glikozida koji su hidrofilni te se kao takvi ne mogu apsorbirati preko enterocita pasivnom difuzijom. Shodno tome prva reakcija metabolizma je reakcija hidrolize pomoću enzima hidrolaza. Zatim slijede reakcije prve i druge faze metabolizma koje se odvijaju u jetri, ali i u ekstrahepatičkim tkivima i to poglavito u enterocitima. Reakcije glukuronidacije i sulfatacije su najzastupljenije reakcije metabolizma flavonoida (10). Ove reakcije osim što pogoduju povećanju hidrofilnosti, a time i bržem izlučivanju iz organizma, bitno mijenjaju biološku aktivnost flavonoida (8).

4.1.1. Promjene u usnoj šupljini

Metabolizam flavonoida započinje u usnoj šupljini gdje dolazi do hidrolize glikozida. Hidroliza se odvija u epitelnim stanicama i to u citosolu pod utjecajem enzima β-glukozidaze. Osim epitelnih stanica za hidrolizu su odgovorne i bakterije u usnoj šupljini koje također posjeduju enzim β-glukozidazu. Veliki potencijal za hidrolizu imaju glikozidi kvercetina (kvercetin 4′-glukozid) i genisteina (genistein 7-glukozid) koji su vrlo brzo bili hidrolizirani kada su bili inkubirani u ljudskoj slini. Za razliku od konjugata s glukozom, konjugati rutina kvercitrina i naringina s drugim šećerima nisu bili hidrolizirani (11). Epigalokatehin galat (EGCG), flavanol iz zelenog čaja, se u usnoj šupljini pod utjecajem katehin-esteraza prevodi u epigalokatehin (EGC) te se oba katehina apsorbiraju preko sluznice (8, 12). *In vitro* studije su pokazale kako EGCG, ali i aglikoni kvercetin i genistein nastali hidrolizom u usnoj šupljini, posjeduju antiproliferacijski učinak na stanice raka usne šupljine (4, 11).

Istraživanja utjecaja tkiva sluznice usne šupljine, sline i mikroflore u usnoj šupljini na metabolizam antocijanidina iz crne maline pokazalo je kako su, osim enzima β-glukozidaze, u usnoj šupljini zastupljeni i enzimi odgovorni za reakcije konjugacije (UGT, SULT, COMT), enzim LPH te transportni proteini (SGLT1, P-gp, MRP1, MRP2). Pod utjecajem β-glukozidaze, antocijanidini se hidroliziraju do bioaktivnog aglikona cijanidina. Istraživanjem je pokazano kako su enzimi potrebni za hidrolizu, reakcije druge faze te transport prisutni, ne samo u donjem dijelu gastrointestinalnog sustava, već i u usnoj šupljini (13).

4.1.2. Promjene u želucu

Istraživanje rađeno u *in vitro* uvjetima, u želučanom soku bez pepsina, pri pH 2 tijekom 3,5 sata pokazalo je kako su oligomeri flavonola, u rasponu od dimera do dekamera poput onih izoliranih iz *Teobroma cacao*, nestabilni u uvjetima niskog pH te se razgrađuju u monomere i dimere, ali i druge oligomerne jedinice. Monomeri flavan-3-ola stabilni su u

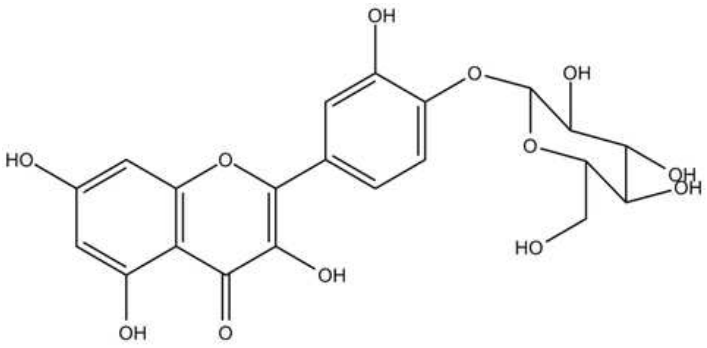
uvjetima niskog pH (12). Drugo istraživanje rađeno u *in vivo* uvjetima pokazalo je kako ne dolazi ni do kakve promjene u strukturi polimernih procijanidina u uvjetima niskog pH. Dva su razloga nepodudaranja ovih dvaju istraživanja. Prvi je taj što je u *in vivo* uvjetima izloženost želučanom soku kraća (<50min), a drugi su veće vrijednosti pH koje su nastale uslijed toga što je korišten kakao prah koji je povisio pH želučanog medija do 5,4 (14).

4.1.3. Metaboličke promjene u crijevima

4.1.3.1. Apsorpcija u tankom crijevu

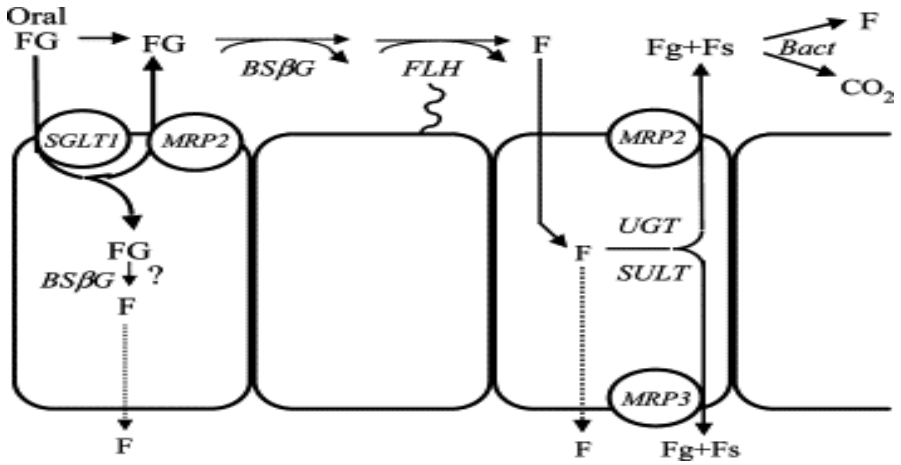
Apsorpcija flavonoida oslobođenih iz hrane ovisi o njihovim fizikalno-kemijskim osobinama kao što su molekularna masa, konfiguracija, lipofilnost, topljivost i pKa, ali i o biološkim osobinama kao što su pH lumena, permeabilnost membrane i učinak prvog prolaska kroz jetru (15).

Prvi korak važan za apsorpciju flavonoida je hidroliza glikozida. Enzimi odgovorni za hidrolizu su β-glukozidaze i to: laktazna florizin hidrolaza (LPH), glukocerebrozidaza (GBA) i citosolna β-glukozidaza (CBG) široke specifičnosti (8, 16). LPH se nalazi na luminalnoj strani epitelnih stanica te svojom aktivnošću otpušta aglikone u lumen odakle pasivnom difuzijom ulaze u citosol enterocita. Za razliku od LPH, CBG je unutarstanični enzim te zahtjeva aktivan transport hidrofilnih glikozida u stanice (17). Sljedeći korak nakon hidrolize glikozida je pasivna difuzija koja ovisi o lipofilnosti flavonoida. Međutim, određeni glikozidi flavonoida, kao što je kvercetin-4´-O-glukozid, aktivno se transportiraju u epitelne stanice pomoću o natriju ovisnom glukoznom transporteru (SGLT-1), a nakon toga se hidroliziraju pomoću enzima CBG unutar stanica (8). Osim na ovaj način, apsorpcija kvercetin-4´-O-glukozida moguća je i na način da se prvo hidrolizira pomoću enzima LPH, a zatim se pasivnom difuzijom prenosi u stanice. Za razliku od kvercetin-4´-O-glukozida, apsorpcija kvercetin-3´-O-glukozida moguća je samo preko enzima LPH i pasivne difuzije (18).



Slika 17. Struktura kvercetin-4´-O-glukozida (19).

Flavan-3-oli, kao što je epigalokatehingalat (EGCG), apsorbiraju se u usnoj šupljini i to pasivnom difuzijom čemu prethodi hidroliza do epigalokatehina pomoću katehin-esteraze (8). Osim transportera koji su odgovorni za prijenos flavonoida u stanice, postoje i transporteri koji izbacuju flavonoide natrag u lumen crijeva. Takav transporter je MRP-2 (protein odgovoran za rezistenciju lijekova) koji se nalazi na luminalnoj strani enterocita. On smanjuje transport prema bazolateralnoj strani nekih flavonoidnih glikozida poput kvercetin-4′-O-glukozida kao i glikozida koji nastaju u enterocitima. Osim MRP-2 transportera, za efluks flavonoida odgovorni su i P-glikoprotein te protein rezistencije na tumor dojke (BCRP) (20).



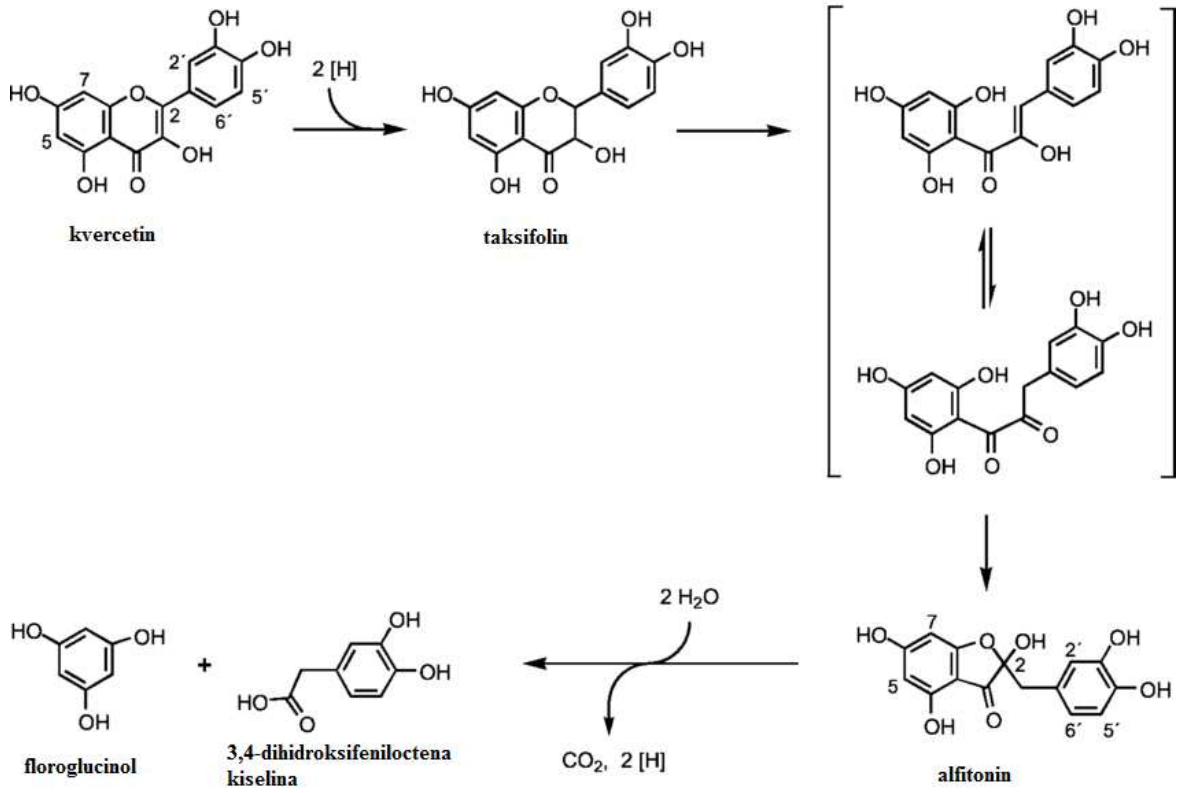
Slika 18. Transport flavonoidnih glikozida (FG), flavonoidnih aglikona (F) i konjugata (Fg i Fs) u lumenu i enterocitima (20).

4.1.3.2. Utjecaj crijevne mikroflore

Brojne bakterije koje su dio ljudske crijevne mikroflore sudjeluju u metabolizmu flavonoida. Dok jedne sudjeluju u cijelom metabolizmu, druge su uključene samo u pojedinim dijelovima metabolizma. Bakterije koje u najvećoj mjeri sudjeluju u metabolizmu flavonoida pripadaju vrstama *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* i *Firmicutes*, a posebno možemo izdvojiti vrste *Eubacterium ramulus* i *Fusobacterium plautii*. Metabolizam pod utjecajem bakterija karakteriziraju anaerobni uvjeti te shodno tome reakcije kao što su redukcija i hidroliza kojima nastaju nepolarni produkti niskih molekularnih masa. Metaboličke reakcije koje se odvijaju pod utjecajem bakterija su: hidroliza O- i C-glikozida, demetilacija, dehidroksilacija, redukcija dvostruke ugljik-ugljik veze, izomerizacija, cijepanje prstena, produženje i skraćivanje alifatskog lanca te dekarboksilacija. Dok se hidroliza O-glikozida odvija uglavnom pod utjecajem enzima smještenih u gornjim dijelovima probavnog trakta, hidroliza C-glikozida moguća je u crijevima pod utjecajem bakterijskih enzima (21). Hidrolizom

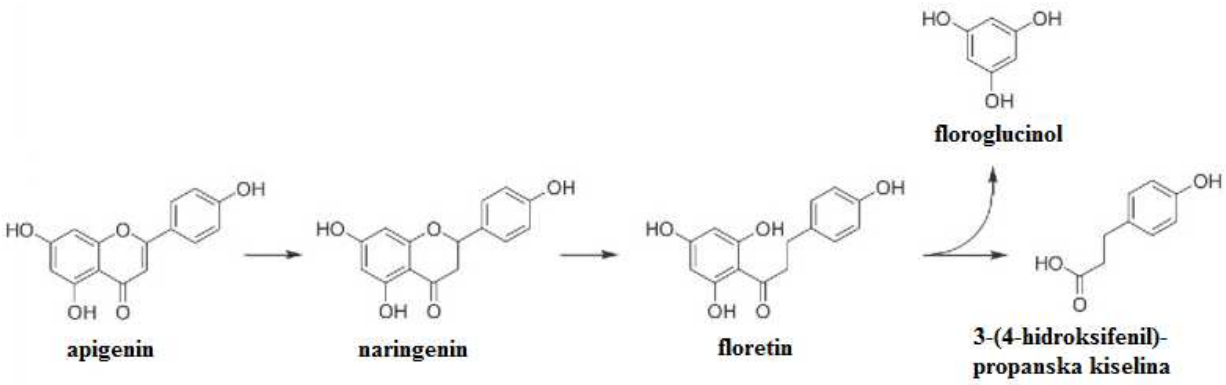
glikozida antocijanidina nastaju nestabilni aglikoni koji podliježu spontanom cijepanju prstena C što rezultira stvaranjem fenolnih kiselina i aldehida kao konačnih produkata (22). Osim β-glukozidaza, bakterije posjeduju i druge enzime kao što je α-ramnozidaza, čime je omogućena hidroliza flavonoidnih glikozida koji u svojoj strukturi posjeduju i druge šećere (23, 24).

Sljedeća reakcija koja se odvija djelovanjem crijevne mikroflore je demetilacija. O-demetilacija karakteristična je za flavone, izoflavone i flavanone, a događa se na A i B fenolnom prstenu flavonoida. Reakcija hidroksilacije karakteristična je za flavan-3-ole i flavone (21). Metabolizam flavonola i flavona započinje redukcijom dvostruke C2-C3 veze, a zatim slijedi cijepanje središnjeg heterocikličkog prstena C. Ove reakcije karakteristične su i za flavanonole kod kojih se zatim prsten B metabolizira do hidroksifeniloctene kiseline, a fenolni produkti koji nastaju iz prstena A potpuno se metaboliziraju do kratkolančanih masnih kiselina. Flavonol kvercetin se pod utjecajem bakterija *Eubacterium ramulus* i *Fusobacterium plautii* metabolizira do intermedijera taksifolina i alfitonina, a daljnjim metabolizmom iz alfitonina nastaje odgovarajući hidroksidihidrokalkon (Slika 19.) (25).



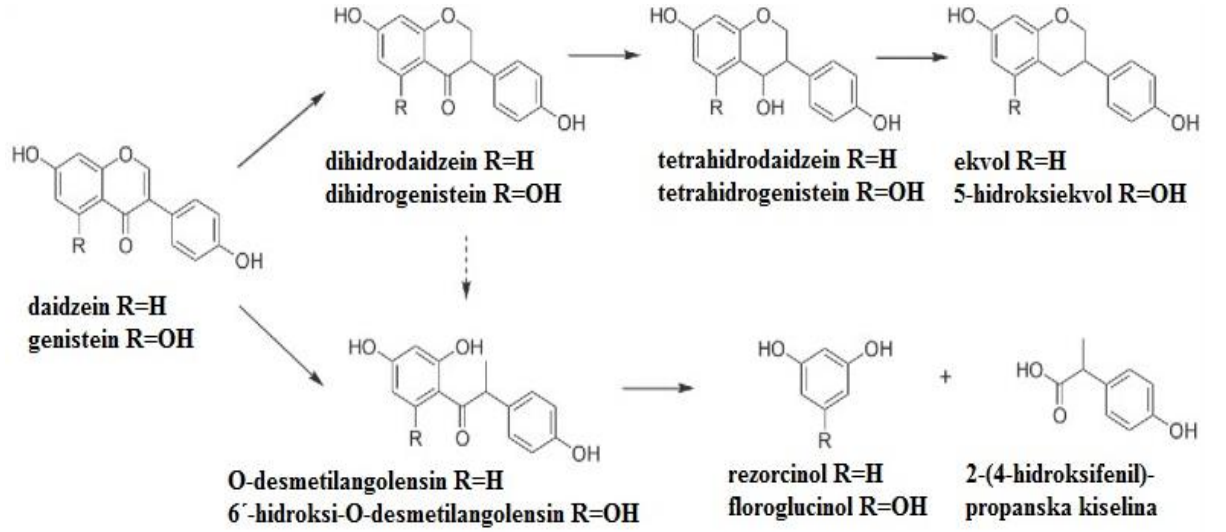
Slika 19. Metabolički put kvercetina pod utjecajem bakterije *Eubacterium ramulus* (25).

Cijepanjem prstena C flavanona nastaju kalkoni koji se dalje reduciraju do dihidrokalkona, a daljnjom hidrolizom na prstenu B nastaje hidroksifenilpropanska kiselina. Primjer ovakvog metaboličkog puta primijećen je kod flavona apigenina čijim metabolizmom nastaju intermedijeri naringenin i floretin (Slika 20.) (21).



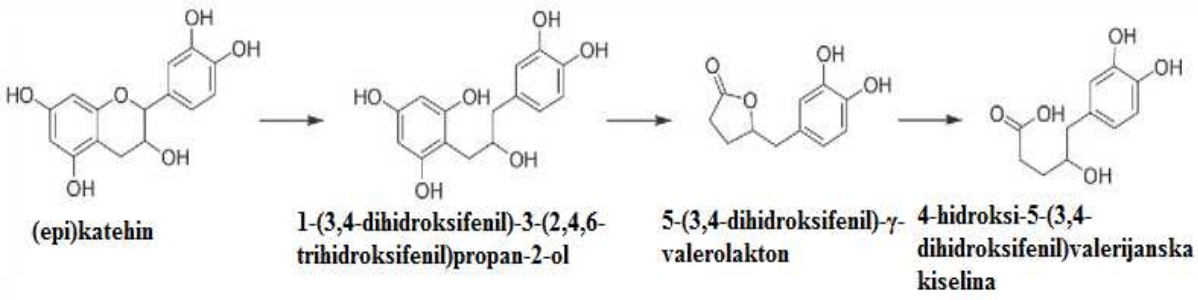
Slika 20. Metabolički put apigenina pod utjecajem crijevne mikroflore (21).

Izomerizaciju flavanona katalizira kalkon-izomeraza, redukciju enolat-reduktaza, a cijepanje dihidrokalkona floretin-hidrolaza. Sve ove enzime posjeduje *Eubacterium ramulus* (21). Dva su moguća metabolička puta kojima započinje metabolizam izoflavona. Prvi metabolički put uključuje redukciju C2-C3 veze do izoflavana, a drugi cijepanje prstena C do O-desmetilangolensina koji se dalje cijepa u manje fenolne produkte. Primjer takvog metabolizma je metabolizam daidzeina i genisteina čiji su konačni produkti rezorcinol nastao iz prstena A i 2-(4-hidroksifenil)propanska kiselina nastala iz prstena B (21). Enzimi uključeni u metabolizam daidzeina i genisteina su: daidzein reduktaza, dihidrodaidzein racemaza, dihidrodaidzein redukatza i tetrahidrodaidzein reduktaza (Slika 21.) (26).



Slika 21. Metabolički putovi daidzeina i genisteina pod utjecajem crijevne mikroflore (21).

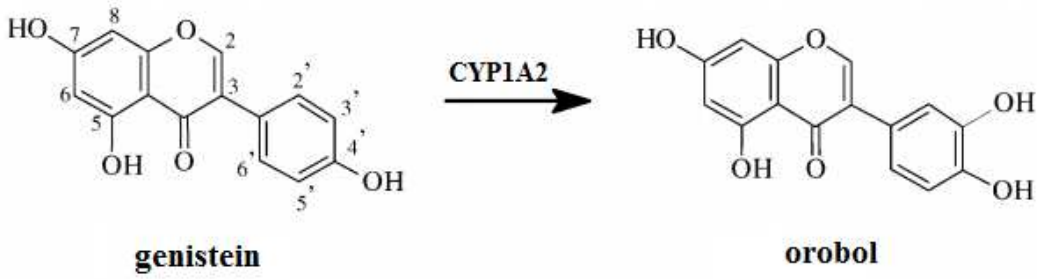
Metabolizam flavan-3-ola u crijevima pod utjecajem bakterija uključuje hidrolizu estera, redukciju prstena C i daljnju pretvorbu do 1,3-difenilpropan-2-ola. Konačni produkti metabolizma su odgovarajući valerolakton i valerijanska kiselina (21).



Slika 22. Metabolički put flavan-3-ola na primjeru (epi)katehina pod utjecajem crijevne mikroflore (21).

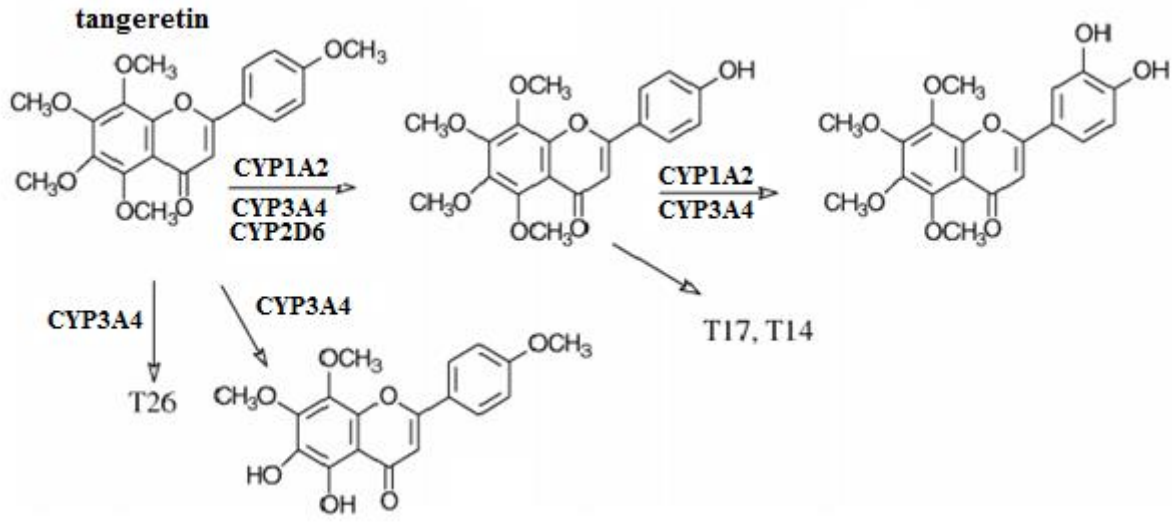
4.1.4. Reakcije oksidacije enzimima superporodice citokrom P450

Reakcije oksidacije enzimima citokrom P450 (CYP) osim što mogu utjecati na eliminaciju flavonoida, mogu također biti i reakcije kojima flavonoidi postižu biološku aktivnost (27). Također, razlike u strukturi flavonoida uvelike utječu na njihov afinitet za enzime citokrom P450 (28). U jetri se flavonoidi pod utjecajem enzima citokrom P450 uglavnom hidroksiliraju i/ili demetiliraju, pa su shodno tome glavne reakcije katalizirane sa CYP1A2 3-hidroksilacija i 4´-O-demetilacija na prstenu B. Izoforme CYP1A2 i CYP2C9 su glavni enzimi odgovorni za fazu I metabolizma flavonoida (29). Osim u jetri reakcije oksidativnog metabolizma mogu se odvijati i ekstrahepatički (27). *In vitro* istaživanje metabolizma genisteina i tangeretina s ljudskim i mišjim enzimima citokrom P450 pokazalo je kako metabolizmom genisteina enzimima citokrom P450 nastaje pet različitih metabolita. Jedan od metabolita je orobol odnosno 3´-hidroksilirani metabolit genisteina koji je jedini metabolit koji nastaje uz pomoć CYP1A2. Osim CYP1A2, važnu ulogu u metabolizmu genisteina ima i CYP1A1 (28).



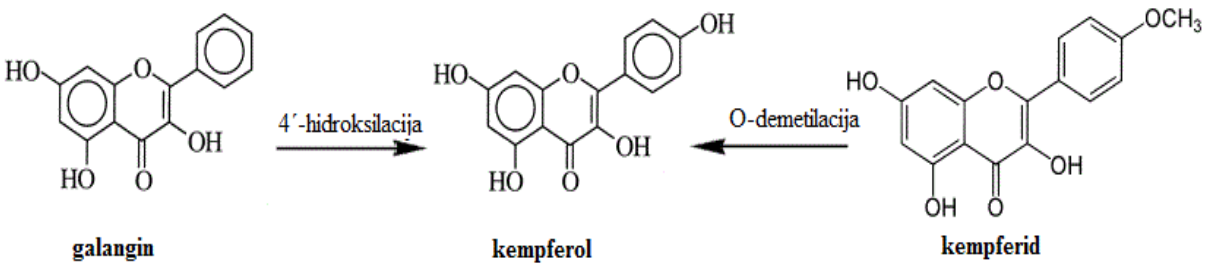
Slika 23. Hidroksilacija genisteina u orobol pomoću CYP1A2 (28).

Nakon inkubacije tangeretina s ljudskim mikrosomalnim enzimima pronađena su dva glavna metabolita: 4′-hidroksi-5,6,7,8-tetrametoksiflavon koji nastaje djelovanjem CYP1A2 i 5,6-dihidroksi-4′,7,8-trimetoksiflavon za čiji je nastanak odgovoran CYP3A4 (Slika 24.) (28, 30). Budući da razlika u strukturi flavonoida uvelike utječe na njihov afinitet za enzime citokrom P450, lipofilniji tangeretin je podložniji metaboličkim reakcijama I. i II. faze, od polarnijeg genisteina (28).



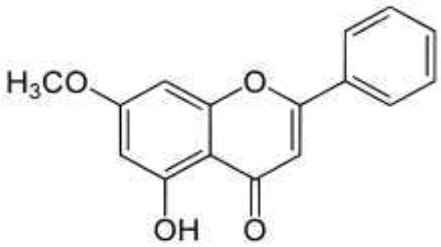
Slika 24. Metabolizam tangeretina izoformama enzima citokrom P450 (28).

Flavonoli galangin i kempferid se oksidativnim metabolizmom prevode do kempferola. Reakcija je u najvećoj mjeri katalizirana izoformom CYP1A2, ali i izoformom CYP2C9. Kempferol iz galangina nastaje reakcijom oksidacije na 4′-položaju dok isti produkt nastaje O-demetilacijom iz kempferida (27).



Slika 25. Oksidativni metabolizam galangina i kempferida do kempferola enzimima superporodice citokrom P450.

Istraživanje provedeno na metoksiliranim flavonima pokazalo je kako su na mikrosomalnu oksidaciju najosjetljiviji djelomično metoksilirani flavoni tektokrizin i kempferid. Od pet izoformi enzima CYP uključenih u istraživanje, najveću ulogu u metabolizmu metoksiliranih flavona pokazao je CYP1A1, a nakon njega slijede CYP1A2 i CYP3A4 (30).

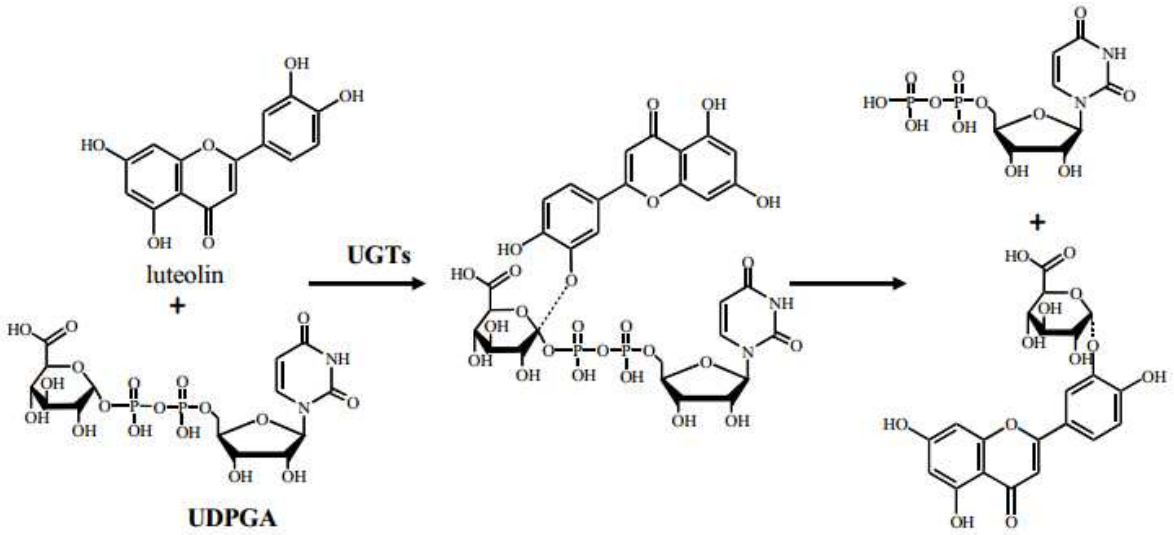


Slika 26. Struktura tektokrizina (31).

4.1.5. Reakcije konjugacije flavonoida

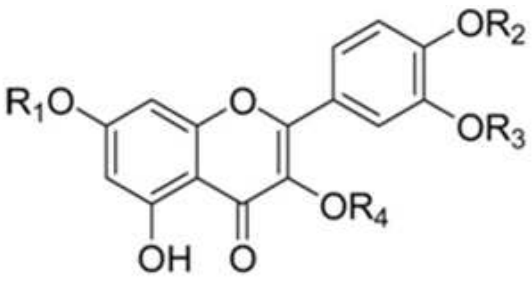
Reakcije glukuronidacije odvijaju se na luminalnoj strani endoplazmatskog retikuluma stanica jetre i drugih tkiva i to posredstvom uridindifosfoglukuronozil-transferaze (UGT). UGT superporodica enzima pokazuje iznimnu raznolikost pri prepoznavanju supstrata i kataliziraju reakciju glukuronidacije velikog broj funkcionalnih skupina (-OH, -COOH, -NH_2, -SH). Porodica UGT1A i to UGT1A1, 1A3 te 1A7-10 su glavne izoforme UGT enzima odgovorne za glukuronidaciju flavonoida *in vivo* (8, 9, 10). Dokazano je kako više UGT izoformi može biti odgovorno za glukuronidaciju jednog flavonoida. Tako se eupatilin, farmakološki aktivni flavon nađen u biljkama vrste *Artemisia*, glukuronidira pomoću UGT1A1, 1A3, 1A9 i 1A10, a luteolin i kvercetin u najvećoj mjeri pomoću UGT1A1, 1A8 i 1A9. Svaka izoforma UGT enzima pokazuje regioselektivnost u reakcijama glukuronidacije za hidroksilne skupine flavonoida. UGT1A porodica pokazuje veću selektivnost za hidroksilne skupine na položaju 3 i 7 i to UGT1A7, 1A8, 1A9 i 1A10 za hidroksilnu skupinu

na položaju 3, a UGT1A1 i 1A3 za hidroksilnu skupinu na položaju 7 (10, 32). Također, mjesto glukuronidacije ovisi i o tome o kojoj je skupini flavonoida riječ. Tako se flavonoli glukuronidiraju na 7-, 3-, 3′- ili 4′- hidroksilnoj skupini, izoflavoni na 4′- ili 7- hidroksilnoj skupini, a flavoni na hidroksilnoj skupini koja se nalazi na položaju 6, 7, 4′ ili 3′ (10). Flavonoidi koji nemaju 3′-hidroksilnu skupinu glukuronidiraju se samo na položaju 7, dok oni koji sadrže 3′-hidroksilnu skupinu formiraju 3′-O-glukuronide i ponekad 4′-O-glukuronide. Za glukuronidaciju 3′, 4′-kateholne skupine uglavnom su odgovorni UGT1A1 i UGT1A8 (32).



Slika 27. Glukuronidacija luteolina (10).

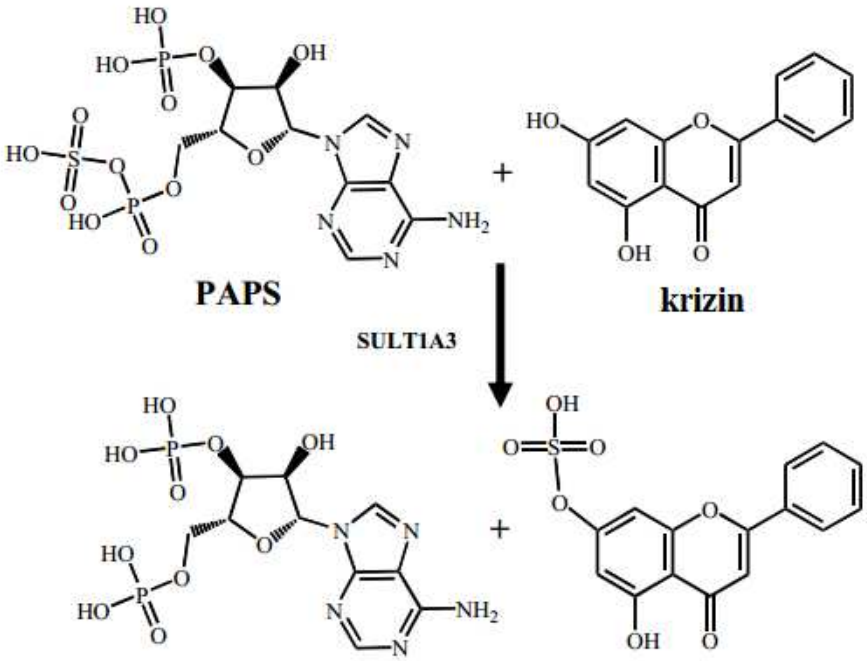
Glavna reakcija konjugacije kvercetina je reakcija glukuronidacije za koju su u najvećoj mjeri odgovorne izoforme UGT1A3 te UGT1A9. Pronađena su četiri monoglukuronida kvercetina i to 7-, 3-, 3′- i 4′-glukuronidi (33). Osim monoglukuronida za kvercetin su karakteristični i diglukuronidi te glukuronidi koji nastaju nakon reakcije metilacije (8). Položaj konjugiranih skupina kvercetina utječe na njegovu farmakološku aktivnost. Kateholne hidroksilne skupine na prstenu B odgovorne su za antioksidacijsko djelovanje kvercetina. Ukoliko se jedna od te dvije skupine konjugira, njegovo antioksidacijsko djelovanje će se smanjiti. Konjugacija na hidroksilnoj skupini na položaju 7 ne smanjuje antioksidacijsko djelovanje jer je zadržan integritet katehola. UGT1A9 pokazao je veću sposobnost glukuronidacije kvercetina na položaju 7, dok je UGT1A3 u većoj mjeri odgovoran za glukuronidaciju položaja 3′ i 4′ na prstenu B (33).



Glukuronidi kvercetina	R1	R2	R3	R4
kvercetin 3-O-β-D- glukuronid	-H	-H	-H	-GlcA
kvercetin 7-O-β-D-glukuronid	-GlcA	-H	-H	-H
kvercetin 3´-O-β-D-glukuronid	-H	-H	-GlcA	-H
kvercetin 4´-O-β-D-glukuronid	-H	-GlcA	-H	-H

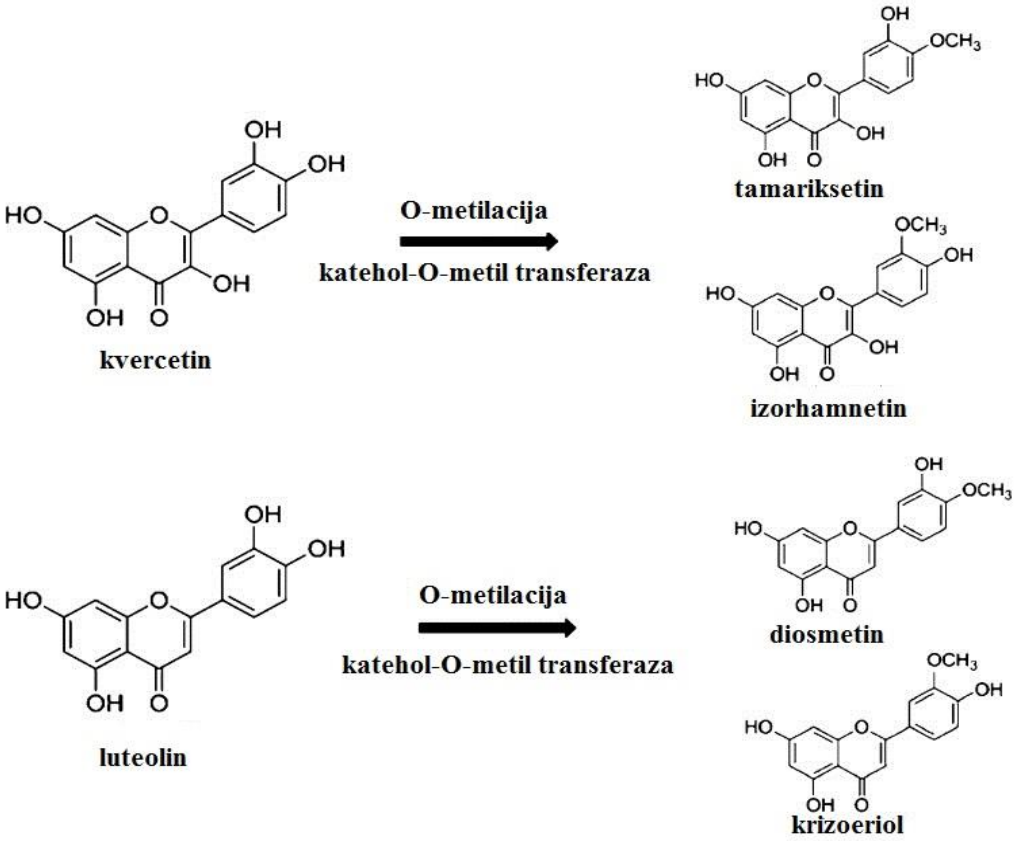
Slika 28. Struktura kvercetina i njegovih glukuronida (34).

Sulfatacija i metilacija se odvijaju u citosolu pod utjecajem sulfotransferaza (SULT) i katehol-O-metiltransferaza (COMT). SULT1A1 i SULT1A2 su uključene u sulfataciju supstrata fenolnog tipa dok su SULT1A1 i SULT1A3 odgovorne za sulfataciju (-)-epikatehina (8). Budući da sulfoniltransferaze i UDP-glukuronoziltransferaze imaju sličnu distribuciju u tkivima te obje prepoznaju hidroksilne skupine, opisan je kompetitivni metabolizam između reakcija glukuronidacije i sulfatacije u enterocitima i hepatocitima. Sulfotransferaze imaju veći afinitet za supstrat dok UDP-glukuronoziltransferaze imaju veći kapacitet. Ovisno o koncentraciji flavonoida *in vivo*, odvijat će se ili reakcija sulfatacije ili reakcija glukuronidacije. U pravilu se sulfatacija odvija pri nižim koncentracijama, a glukuronidacija pri višim koncentracijama flavonoida. Izoflavoni daidzein i genistein metaboliziraju se pomoću SULT1A1, SULT1A3, SULT1E1 i SULT2A1 izoformi. SULT1A1 i SULT2A1 pokazuju selektivnost za hidroksilne skupine na položajevima 7 i 4′, a SULT1A3 za hidroksilnu skupinu na položaju 4′. Za flavonole galangin i krizin, koji su u velikoj količini zastupljeni u medu i propolisu, karakteristična je sulfatacija samo na hidroksilnoj skupini na položaju 7. Sulfonirani flavonoidi pokazuju biološku aktivnost *in vivo*. Tako na primjer kvercetin-3′-sulfat sudjeluje u prevenciji endotelne disfunkcije (10).



Slika 29. Sulfokonjugacija krizina (10).

Biološkoj metilaciji su podložni flavonoidi koji imaju strukturu katehola kao što su kvercetin, luteolin, fisetin i katehin. Metilirani metaboliti flavonoida koji u svojoj strukturi osim kateholnih hidroksilnih skupina sadrže i druge hidroksilne skupine, također mogu biti i konjugirani sa sulfotransferazama i UDP-glukuronoziltransferazama. U pravilu, kada su supstrati inkubirani sa COMT, prisutni su meta-O-metilirani te para-O-metlirani metaboliti. Istraživanja pokazuju kako obje izoforme katehol-O-metiltransferaze, S-COMT (engl. *soluble* COMT) i MB-COMT (engl. *membrane-bound* COMT), preferiraju meta-O-metilaciju (10). O-metilacijom kvercetina nastaju tamariksetin i izorhamnetin, a O-metilacijom luteolina nastaju diosmetin i krizoeriol (Slika 30.).



Slika 30. Strukture kvercetina i luteolina te njihovih metabolita nastalih O-metilacijom (35).

4.2. Utjecaj flavonoida na enzimske sustave

4.2.1. Utjecaj na oksidoreduktaze

4.2.1.1. Ciklooksigenaze i lipooksigenaze

Ciklooksigenaze (COX) ubrajamo u skupinu oksidoreduktaza, a odgovorne su za proizvodnju prostaglandina i tromboksana iz arahidonske kiseline. Dvije su izoforme ovog enzima: ciklooksigenaza 1 (COX 1), koja je konstitutivni enzim i nalazi se u gotovo svakoj stanici te ciklooksigenaza 2 (COX 2), koja je inducibilni enzim i u najvećoj mjeri je nalazimo u upalnim stanicama kao što su makrofazi i mastociti (36, 37). Osim ciklooksigenaza metabolizam arahidonske kiseline kataliziraju i lipooksigenaze (LOX). Postoje tri izoforme lipooksigenaza, a to su 5, 12 i 15-lipooksigenaza. Metabolizmom arahidonske kiseline uz lipooksigenaze nastaju leukotrieni (37).

Inhibicijom ciklooksigenaze i lipooksigenaze, koja dovodi do smanjenja koncentracije upalnih medijatora prostanoida i leukotriena, flavonoidi ostvaruju svoj protuupalni učinak. Osim inhibicijom ovih dvaju enzima, flavonoidi protuupalni učinak ostvaruju i drugim mehanizmima kao što su inhibicija oslobađanja histamina, inhibicija fosfodiesteraze, inhibicija protein kinaze i inhibicija aktivacije transkriptaze (7). Iz skupine flavona inhibicijski potencijal za ciklooksigenazu pokazuju apigenin (inhibicija COX-2), krizin, 3-hidroksiflavon i galangin. Za razliku od flavona, flavonoli su se pokazali kao potentniji inhibitori lipooksigenaze (36, 38). Iz skupine flavonola najjači inhibicijski potencijal za lipooksigenazu pokazali su redom luteolin, 3′,5-dihidroksiflavon, 4′,7-dihidroksiflavon i kvercetin (36, 38, 39). Osim navedenih flavonola, nešto slabiji učinak pokazali su kempferol, galangin, fisetin i morin (36, 38). U istraživanju kojim se nastojalo istražiti antioksidacijski i inhibicijski potencijal nekoliko skupina flavonoida, pokazano je kako kvercetin i luteolin posjeduju jak inhibicijski učinak na 15-lipooksigenazu (15-LOX) koja je jedan od ključnih enzima u protuupalnom odgovoru. Za razliku od kvercetina i luteolina, miricetin i baikalein pokazali su umjereni inhibicijski učinak na 15-LOX dok ostali flavonoidi, koji su bili uključeni u ovo istraživanje, nisu pokazali učinak na 15-LOX. U Tablici 1. prikazani su kvantitativni podatci inhibicije 15-LOX koji su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (40). Što se tiče ostalih izoformi enzima lipooksigenaze, inhibicijski učinak na 5-LOX pokazali su flavonoli kempferol, kvercetin, morin i miricetin, a na 12-LOX kvercetin, kvercetin-7-O-glukozid i hidifolin (36). U istom istraživanju provedeno je i ispitivanje inhibicijskog učinka flavonoida na obje izoforme ciklooksigenaze. U Tablici 2. vidimo kako

su slab inhibicijski učinak na COX-1 uglavnom pokazali flavonoidi iz skupine flavanona (naringenin, naringin, hesperetin, hesperidin) i to s IC_{50} vrijednostima iznad 100. Većina ispitivanih flavonoida pokazala je veći inhibicijski potencijal za COX-2, od kojih se mogu izdvojiti luteolin, kempferol, hesperetin i naringin (40).

	Inhibicija 15-LOX (%)	
Flavonoid	10 μM	100 μM
Apigenin	-	-
Luteolin	12,82 ± 3,58	82,56 ± 3,58
Baikalein	-	34,87 ± 8,20
Baikalin	-	-
Kempferol	-	-
Kvercetin	2,05 ± 2,15	92,82 ± 5,64
Miricetin	-	59,48 ± 8,20
Rutin	-	-
Naringenin	-	-
Hesperetin	-	-
Naringin	-	-
Hesperidin	-	-
Genistein	-	-

Tablica 1. Utjecaj flavonoida na 15-lipooksigenazu (40).

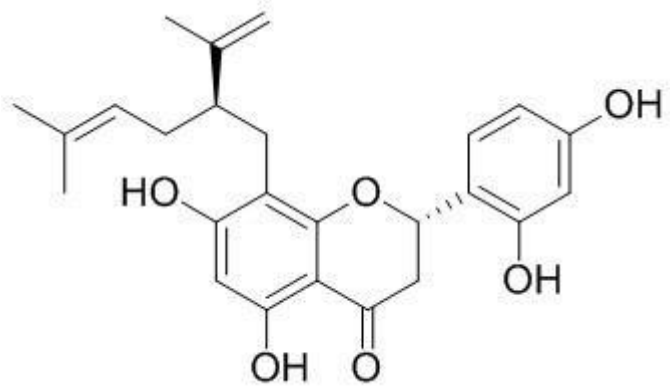
	Inhibicija (IC_{50})	
Flavonoid	Ciklooksigenaza 1	Ciklooksigenaza 2
Apigenin	-	92,95
Luteolin	-	59,90
Baikalein	-	>100
Baikalin	>100	84,85
Kempferol	>100	68,60
Kvercetin	81,1	72,30
Miricetin	-	>100
Rutin	>100	77,90
Naringenin	>100	81,10
Hesperetin	>100	60,89
Naringin	>100	60,02

Hesperidin	>100	73,40
Genistein	-	88,80

Tablica 2. Utjecaj flavonoida na ciklooksigenaze (40).

Istraživanje utjecaja strukture i aktivnosti flavonoida na inhibiciju lipooksigenaza pokazalo je kako najvažniju ulogu u inhibiciji ima kateholna skupina na prstenu B, zatim dvostruka veza C2-C3 te planarna struktura molekule. Broj hidroksilnih skupina nije igrao ulogu u inhibicijskom učinku flavonoida, a prisutnost hidroksilne skupine na položaju 3 smanjila je taj učinak (39).

Prenilirani flavonoidi su flavonoidi koji u svojoj strukturi sadrže supstituirane izoprenil, geranil, 1,1-dimetilalil i/ili lavandulil skupine, a ponajviše su zastupljeni u biljkama porodice *Moraceae.* U kineskoj medicini koriste se zbog svog protuupalnog učinka. Istraživanja su pokazala kako nekoliko preniliranih flavnoida kao što su moruzin, kuwanon C, kuwanon G, kuwanon H, sanggenon C i D i soforaflavanon G inhibiraju COX-1. Sanggenon D, osim što inhibira COX-1, pokazao je inhibicijski potencijal i za 12-LOX. Soforaflavanon G pokazao se kao najpotentnijim inhibitorom COX-1 i 5-LOX i to s učinkom koji je usporediv s indometacinom. Prenilirani flavonoidi koji su pokazali inhibicijski učinak na COX-1, kao supstituent imali su lavandulil skupinu (5-metil-2-izoprofenil-heks-4-enil), čime se naglašava važnost te skupine za inhibicijski učinak (38).

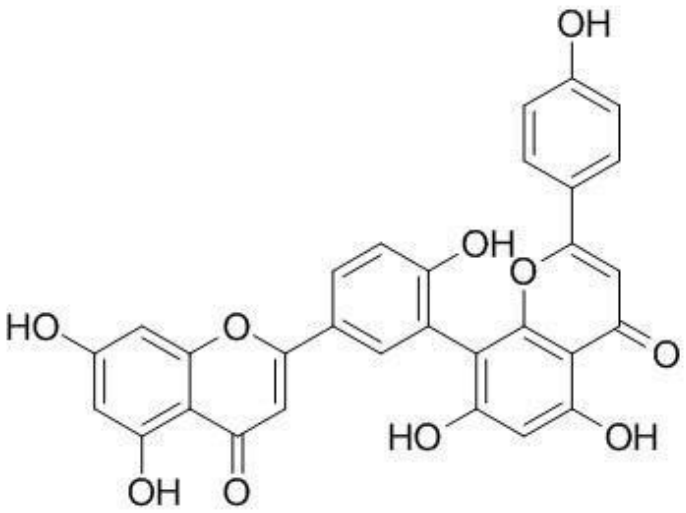


Slika 31. Struktura soforaflavanona (41).

4.2.1.2. Enzimi citokrom P450 (CYP)

Utjecaj enzima citokrom P450 na flavonoide već je opisan u poglavlju o metabolizmu flavonoida. U ovom poglavlju opisan je utjecaj flavonoida na određene izoforme enzima citokrom P450.

Flavoni krizin, akacetin i diosmetin pokazali su najveći inhibicijski potencijal za CYP1A1 i CYP1B1. Važnu ulogu u inhibiciji ovih izoformi imaju hidroksilne skupine na prstenima A i B i to na položajima 3, 5 i 7, a posebno važnu ulogu u inhibiciji CYP1B1 ima hidroksilna skupina na položaju 3 (42, 43). Metilacijom hidroksilnih skupina na prstenu B krizina dolazi do povećanja inhibicijskog potencijala za CYP1B1 koje se očituje smanjenjem IC_{50} vrijednosti sa 0,27 μM za krizin na 0,014 μM i 0,019 μM za akacetin (4′-metoksi-5,7-dihidroksiflavon) i 3′,4′-dimetil-5,7-dihidroksiflavon. Osim na CYP1B1, metilacija hidroksilnih skupina prstena B povoljno utječe na povećanje inhibicijskog potencijala za CYP2C9 (42). Inhibicijski potencijal za CYP1A2 izoformu pokazali su flavoni tangeretin, diosmetin i akacetin, zatim flavonoli galangin i kvercetin te flavanon naringenin. Istraživanja na štakorima pokazala su kako flavoni tangeretin i baikalein mogu uzrokovati i povećanje aktivnosti i ekspresije ovog izoenzima (44). Hidroksilacija prstena A i C te metilacija prstena B flavona dovodi do smanjenja inhibicijskog učinka na CYP1A2 (42). Istraživanja na CYP3A4, jednoj od najvažnijih izoformi u metabolizmu lijekova, pokazala su kako flavonoli kvercetin i kempferol inhibiraju metabolizam nifedipina i felodipina. Osim kempferola i kvercetina, inhibicijsku aktivnost za ovu izoformu pokazali su flavonol miricetin, flavon apigenin, koji je pokazao najveći inhibicijski potencijal među monomernim flavonoidima, te biflavon amentoflavon (dimer apigenina) (44). Amentoflavon (Slika 32.) izoliran iz ekstrakta zeleni gospine trave pokazao se kao jedan od najjačih inhibitora među flavonoidima za CYP3A4 (IC_{50} vrijednosti od 0,07 μM) i za CYP2C9 (IC_{50} vrijednost od 0,03 μM). Kada govorimo o flavonolima, njihov se inhibicijski potencijal smanjuje što je broj supstituiranih hidroksilnih skupina veći, stoga se IC_{50} vrijednost povećava ovim redom: galangin < kempferol < kvercetin < miricetin (42).



Slika 32. Struktura amentoflavona (45).

4.2.1.3. Dehidrogenaze

Enzim 17β-hidroksisteroid dehidrogenaza (17β-HSD) tip 1 katalizira konverziju manje aktivnog estrogena estrona u potentniji estradiol te stoga predstavlja zanimljivu metu za djelovanje lijekova kod liječenja o estrogenu ovisnim bolestima. U istraživanju u kojem je ispitivan inhibicijski učinak flavonoida i derivata cinamične kiseline na ovaj enzim, pokazalo se kako od 10 ispitivanih flavonoida inhibicijski učinak u velikom postotku imaju: diosmetin, krizoeriol, skutelarein, genkvanin, fisetin i 7,4′-dihidroksiflavon. Za inhibicijski učinak ključnim su se pokazali supstituenti na položajima 5 i 7 na prstenu A i 3′i 4′ na prstenu B. Tako je fisetin, koji na prstenu B ima dvije hidroksilne skupine i to na položajima 3′i 4′, pokazao veći inhibicijski potencijal od miricetina koji je supstituiran sa tri hidroksilne skupine na prstenu B i hidroksilnom skupinom na položaju 3 dok je miricetin pokazao veći inhibicijski potencijal od baikaleina koji nema supstituenata na prstenu B (46).

4.2.1.4. Ksantin oksidoreduktaza (XOR)

Ksantin oksidoreduktaza je citosolni enzim koji sudjeluje u metabolizmu purina i mokraćne kiseline te stvaranju slobodnih radikala. Odgovoran je za oksidaciju i redukciju velikog broja heterocikličkih spojeva kao što su purini i pteridini, ali i brojnih alifatskih i aromatskih aldehida čime nastaju odgovarajuće karboksilne kiseline ili alkoholi. U ljudi je u najvećoj mjeri zastupljen u jetri i crijevima (47). Flavonoidi i njihovi derivati obično su u metabolizmu podložni ksantin oksidazi (XO).

Krizin i luteolin koji imaju hidroksilne skupine na položajima 5 i 7, snažno inhibiraju aktivnost ksantin oksidaze. Kvercetin, 3-hidroksilni derivat luteolin, ima jednak učinak kao i

luteolin. Ovi rezultati pokazuju kako su hidroksilne skupine na položajima 5 i 7 esencijalne za inhibiciju ksantin oksidaze, ali ne i hidroksilna skupina na položaju 3. Ramnetin, 7-metoksi derivat kvercetina, pokazao je puno slabiji inhibicijski učinak od kvercetina. Ovim je pokazano kako je položaj 7 flavona i flavonola evidentno uključen u inhibiciju ovog enzima. Značaj supstituenata na prstenu B još nije razjašnjen. Luteolin, 3′,4′-dihidroksi derivat krizina, pokazao je slabiji učinak od krizina. Isto tako, kvercetin, koji posjeduje hidroksilne skupine na položajima 3′ i 4′, pokazao je puno manju IC_{50} vrijednost od kempferola (hidroksilna skupina na položaju 3′) i miricetina (hidroksilne skupine na položajima 3′, 4′, 5′). Za razliku od flavonola i flavona, izoflavoni daidzein i genistein pokazali su puno slabiji inhibicijski učinak, kao i flavanoli (-)-katehin i (-)-epikatehin. Mogući razlog je neplanarna struktura ovih spojeva čime je inhibicijska moć puno slabija od flavonoida s planarnom strukturom (48).

4.2.1.5. Aldoza reduktaza

Istraživanje inhibicijskog potencijala flavonoida na aldoza reduktazu pokazalo je kako jaču inhibicijsku aktivnost pokazuju flavoni koji imaju kateholnu skupinu na prstenu B (3′,4′-dihidroksi skupina) u odnosu na flavone s jednom hidroksilnom skupinom ili metoksilirane spojeve. Jaku inhibicijsku aktivnost pokazali su: luteolin, 3′,4′,7-trihidroksiflavon te 3′,4′-dihidroksiflavon. Od ostalih skupina flavonoida značajan inhibicijski potencijal pokazali su: kvercitrin, guaijaverin i desmantin-1. Flavonoli, koji imaju hidroksilnu skupinu na položaju 3, i flavanoni, koji imaju jednostruku vezu između atoma C2 i C3, imali su smanjeni inhibicijski učinak. Najslabiji inhibicijski učinak pokazali su izoflavoni i flavan-3-oli (49).

4.2.2. Utjecaj na transferaze

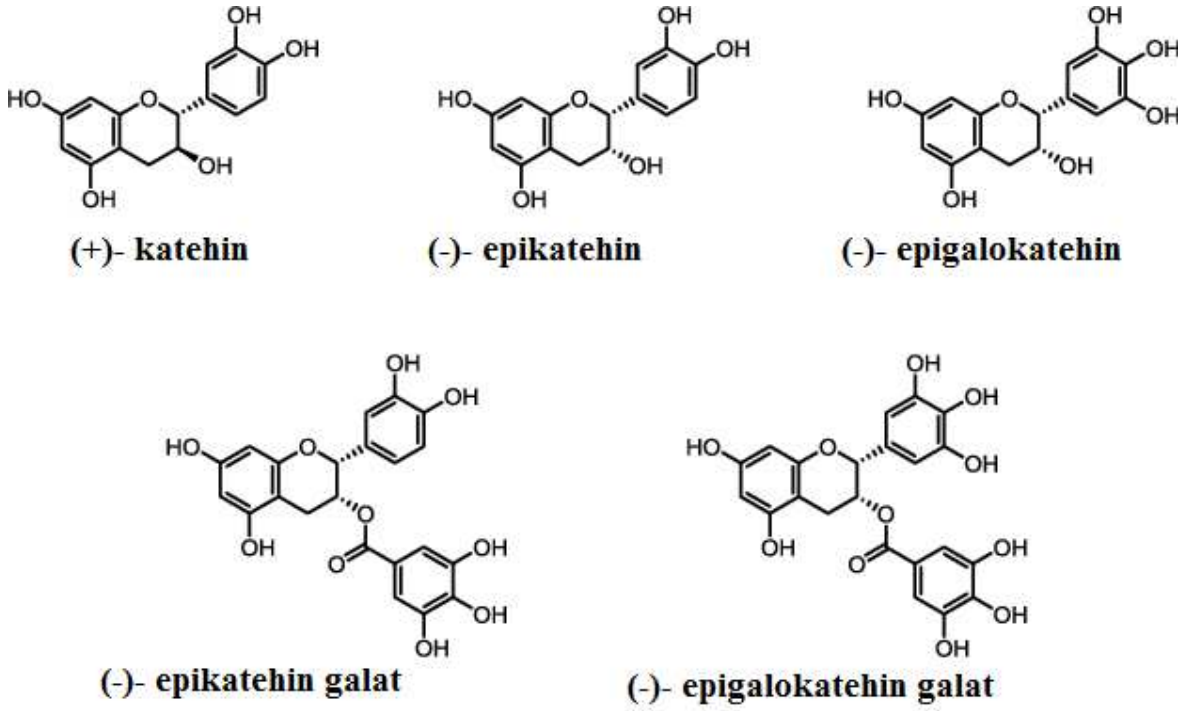
Transferaze su enzimi koji kataliziraju reakcije konjugacije odnosno reakcije druge faze metabolizma ksenobiotika (9). Već je opisan utjecaj ovih enzima na metabolizam flavonoida, a u ovom poglavlju je opisan inhibicijski i indukcijski učinak flavonoida na ove enzime. Opisan je učinak na glutation S-transferazu (GST), UDP glukuronozil-transferazu (UGT), N-acetiltransferazu (NAT) i sulfotransferazu (SULT).

4.2.2.1. Glutation S-transferaze (GST)

Glutation S-transferaze kataliziraju reakciju konjugacije elektrofilnih ksenobiotika s endogenim tripeptidom glutationom. S obzirom na mjesto na kojem se nalaze u stanici dijelimo ih na citoplazmatske (GST) te membranske (MGST) (9, 50). Istraživanje provedeno na dvadeset četiri flavonoida pokazalo je kako su najpotentniji inhibitori flavanoli i to

galokatehin galat, epigalokatehin i galokatehin te flavonol miricetin koji inhibiraju GST u postotcima redom od 99,3 %, 99,2 %, 96,5 % i 96,7 %. Od ostalih flavonoida, 30 % veći inhibicijski učinak pokazali su: epigalokatehin, robinetin, dihidrorobinetin, tricetin i luteolin. Jačina inhibicije ovisna je o strukturnim karakteristikama. Glavna strukturna karakteristika flavonoida koji su inhibirali GST u postotku većem od 80 % je prisutnost tri hidroksilne skupine na prstenu B. Inhibicijski učinak smanjuje se ovisno o položaju hidroksilnih skupina na prstenu A i to redom: 5-OH > 3-OH > 7-OH. Budući da flavanoli, koji su najpotentniji inhibitori ovog enzima, nemaju keto skupinu na položaju 4 niti C2-C3 dvostruku vezu, zaključuje se kako strukturne karakteristike prstena C ne igraju važnu ulogu u inhibiciji ovog enzima. U skupini flavanola slabiji inhibicijski učinak pokazuju oni s kateholnom skupinom na prstenu B, a jači oni koji imaju tri hidroksilne skupine na prstenu B te supstituiranu galnu kiselinu na položaju 3 (51).

Osim inhibicijskog učinka flavanoli zelenog čaja pokazali su i indukcijski učinak na GST. Istraživanje na četrdeset i dva zdrava dobrovoljca koja su četiri tjedna uzimali suplement polifenona E, pokazalo je kako je inhibicijski učinak flavanola prisutan kod onih pojedinaca kod kojih je aktivnost GST povećana, dok je indukcijski učinak zamijećen kod onih pojedinaca kod koji je aktivnost GST bila smanjena. Polifenon E je ekstrakt zelenog čaja koji sadrži 80 % do 98 % epigalokatehin galata, a ostale katehine u nižim postotcima (52).



Slika 33. Strukture katehina (flavanola) iz zelenog čaja (53).

4.2.2.2. UDP glukuronozil-transferaze (UGT)

Flavonoidi djeluju i inhibicijski i indukcijski na UDP glukuronozil-transferazu. Flavon krizin uzrokuje povećanje razine mRNA, ekspresiju proteina te aktivnost UGT izoforme 1A1 u stanicama hepatoma i stanicama karcinoma debelog crijeva, nakon tri dana inkubacije. Ovo je potvrđeno i u humanim hepatocitima. U istim koncentracijama drugi flavoni, kao što su akacetin, apigenin, baikalein, diosmetin, flavon i luteolin, te flavonoli kvercetin i kempferol povećavaju transkripciju ili enzimatsku aktivnost UGT1A1 izoforme. Inkubacija flavonoida, u koncentraciji od 5 μM šest dana s humanim stanicama karcinoma prostate, pokazala je kako dolazi do povećanja aktivnosti UGT, a kao najpotentniji se pokazao izoflavon biokanin. *In vivo* istraživanja na štakorima pokazala su kako kvercetin inducira aktivnost UGT enzima u tankom crijevu i jetri. Međutim, nekoliko flavonoida koji su induktori UGT, pokazali su i inhibicijski učinak na UGT u humanim stanicama jetre. Flavon, naringenin, kvercetin i silimarin pokazali su se kao slabi inhibitori dok su krizin i tangeretin pokazali potentniji inhibicijski učinak (44).

4.2.2.3 Sulfoniltransferaze (SULT)

Izražen inhibicijski učinak na sulfoniltransferaze pokazao je flavonol kvercetin u nekoliko *in vitro* istraživanja. Kvercetin inhibira sulfataciju 4-nitrofenola, koji je model supstrata za SULT1A1, te sulfataciju lijekova kao što su salbutamol, minoksidil i paracetamol u humanim jetrenim stanicama. Kvercetin je pokazao inhibicijski učinak i na SULT1A1 iz ljudskih trombocita, te nešto slabiji učinak na SULT1A3. Osim inhibicije ove dvije izoforme, kvercetin je pokazao inhibicijski učinak i na SULT1E1 izoformu koja je odgovorna za sulfataciju estrogena. Inhibicijski učinak na jetrenu i trombocitnu SULT1A1 pokazali su i flavonoli fisetin, galangin, kempferol i miricetin te flavoni apigenin i krizin. Flavoni baikalein i luteolin, flavonol morin, flavanoni hesperetin i izoflavoni daidzein i formononetin inhibiraju humanu trombocitnu SULT1A1 u nanomolarnim IC_{50} vrijednostima. Flavanoli iz zelenog čaja epigalokatehin galat i galokatehin galat pokazali su se kao potentni inhibitori rekombinantnih humanih enzima SULT1A i to specifično izoformi 1A1, 1A2 i 1A3 (44).

4.2.2.4. N-acetiltransferaze (NAT)

Istraživanje provedeno na enzimu NAT1, izoliranom iz stanica kolangiokarcinoma i citosola jetrenih stanica, pokazalo je kako snažan inhibicijski učinak ima kvercetin, a zatim kempferol, genistein, taksifolin i epigalokatehin galat. Isti flavonoidi pokazali su inhibicijski učinak na NAT2. Jači inhibicijski učinak pokazali su oni flavonoidi koji su imali veći broj supstituiranih hidroksilnih skupina na prstenu B. Epigalokatehin galat pokazao je jači učinak

od epikatehina stoga se može zaključiti kako važnu ulogu u inhibiciji ima supstituirana galna kiselina na položaju 3 (44, 54).

4.2.3. Utjecaj na hidrolaze

4.2.3.1. Fosfodiesteraze (PDE)

Inhibicijom različitih izoformi fosfodiesteraze (PDE) u različitim tkivima odnosno stanicama, flavonoidi ostvaruju nekoliko učinaka kao što su antiagregacijski, vazodilatacijski i hipolipemički učinak. Početni dio mehanizama ovih učinaka je isti, a to je da se inhibicijom PDE povećava razina cikličkog adenozin monofosfata (cAMP). Antiagregacijski učinak se ostvaruje na način da se nakon povećanja razine cAMP blokira mobilizacija citoplazmatskog kalcija i aktivacija trombocita. Izoflavon genistein ostvaruje vazodilatacijski učinak tako što povećana razina cAMP-a aktivira protein kinazu A što dovodi do stvaranja dušikovog monoksida (NO). Flavonoidi mogu inducirati lipolizu u adipoznom tkivu štakora. Takav učinak pokazali su luteolin, apigenin, kvercetin, diosmetin i genistein. Osim lipolize u adipoznom tkivu, flavonoidi su pokazali pozitivan učinak na hidrolizu lipida u jetri zamorca (55). Istraživanje provedeno na PDE izoliranim iz pluća i srca zamorca pokazalo je kako luteolin ima neselektivni inhibicijski učinak na sve izoforme PDE sa IC_{50} vrijednostima u rasponu od 10 μM do 20 μM. Daidzein i eriodiktiol inhibiraju PDE3 s IC_{50} vrijednostima 30 μM i 50 μM. Hesperetin i prunetin su pokazali selektivniji učinak na PDE4. Luteolin-7-glukozid inhibira selektivnije PDE2 i PDE4, a diosmetin pokazuje selektivniji učinak na PDE2. Apigenin inhibira PDE 1-3 sa IC_{50} vrijednostima od 10 μM do 25 μM, a miricetin PDE 1-4 sa IC_{50} vrijednostima od 10 μM do 40 μM. Kada govorimo o odnosu strukture i aktivnosti, zaključuje se kako taj odnos varira ovisno o kojoj je izoformi fosfodiesteraze riječ. Prisutnost C2-C3 dvostruke veze važna je za inhibiciju svih izoenzima PDE osim za PDE3 kod koje situacija još nije razjašnjena. Također, prisutnost hidroksilnih skupina na položajima 5 i 7 važna je za inhibiciju svih izoformi, osim za PDE3 za čiju inhibiciju nije potrebna hidroksilna skupina na položaju 5. Hidroksilna skupina na položaju 3′ igra važnu ulogu u inhibiciji PDE4 i PDE5, dok je hidroksilna skupina na položaju 3 važna za inhibiciju PDE5. Izoflavoni su pokazali povećan inhibicijski potencijal za PDE4. Prisutnost hidroksilne skupine na položaju 5′ nevažna je za inhibiciju PDE te je čak primijećeno kako se u prisutnosti te skupine smanjuje inhibicijski učinak na PDE4. Hidroksilna skupina na položaju 4′ flavanona, flavona i izoflavona vrlo je važna za inhibiciju PDE3, ali ne i ostalih izoformi (56).

4.2.3.2. Hijaluronidaze

Hijaluronidaze odnosno β-1,4-glukozaminidaze su enzimi koji uzrokuju degradaciju vezivnog tkiva te su uključene u širenju infekcija i toksina, oplodnji jajne stanice i napredovanju širenja raka (57, 58). Flavonoidi su pokazali inhibicijski učinak na hijaluronidazu izoliranu iz goveđih testisa. Najjači inhibicijski učinak pokazali su luteolin, apigenin, kempferol i silibin u koncentracijama od 250 μM. Nešto slabiji učinak pokazali su miricetin, kvercetin, morin i butein (59). Osim inhibicije hijaluronidaze iz goveđih testisa, istraživanja su pokazala kako flavonoidi posjeduju potencijal za inhibiciju hijaluronidaza izoliranih iz otrova zmija, pčela i škorpiona. Rezultati su pokazali kako flavoni i flavonoli imaju najveći potencijal za inhibiciju hijaluronidaza iz otrova, a kao najpotentniji inhibitor pokazao se kempferol (60). Oba istraživanja su pokazala kako su najjači inhibicijski učinak pokazali oni flavonoidi koji su u strukturi imali C2-C3 dvostruku vezu te keto skupinu na položaju 4 što odgovara strukturnim karakteristikama flavona i flavonola (59, 60).

4.2.3.3. Fosfolipaza A_2

Fosfolipaza A_2 (PLA_2) ima važnu ulogu u stvaranju upalnih medijatora kao što su prostaglandini, leukotrieni, faktor aktivacije trombocita, pa se PLA_2 izdvaja kao jedan od najvažniji enzima u upalnom procesu (61). Odgovorna je za oslobađanje arahidonske kiseline s membranskih fosfolipida pri čemu je oslobađanje posredovano s barem tri fosfolipaze i to: citosolna (c) PLA_2, sekretorna (s) PLA_2 i fosfolipaza neovisna o kalciju (i) PLA_2 (37). Visoka razina PLA_2 zamijećena je u bolesnika koji boluju od ulceroznog kolitisa, pri septičkom šoku te u sinovijalnoj tekućini kod reumatoidnog artritisa. Kvercetin i rutin pokazali su selektivni inhibicijski učinak na PLA_2-II. Oba flavonoida imaju hidroksilne skupine na položajima 5, 7, 3′ i 4′ pa se naglašava važnost tih skupina za selektivni inhibicijski učinak ovih dvaju flavonoida. Uklanjanjem ili dodavanjem hidroksilnih skupina na prstenu B, ne mijenja se jačina inhibicije PLA_2-II, ali takvi flavonoidi postaju manje selektivni. Selektivnost za inhibiciju PLA_2-II se smanjuje kod miricetina, koji u odnosu na kvercetin i rutin ima još jednu hidroksilnu skupinu na položaju 5′, te kod apigenina, koji u odnosu na rutin i kvercetin nema hidroksilnu skupinu na položaju 3′. Hespertin koji na položaju 4′ ima metoksi skupinu, pokazuje slab inhibicijski učinak na obje skupine PLA_2. Fisetin, koji nema hidroksilnu skupinu na položaju 5, te katehin i taksifolin, koji nemaju keto skupinu na položaju 4 i/ili dvostruku C2-C3 vezu , također su pokazali slab inhibicijski učinak na obje skupine PLA_2 (61).

4.2.4. Utjecaj na lijaze

4.2.4.1. Sintaza masnih kiselina

Istraživanja su pokazala kako inhibitori sintaze masnih kiselina mogu smanjiti unos hrane i tjelesnu masu pa bi se mogli koristiti u liječenju pretilosti, a također posjeduju i antitumorski učinak. Inhibicijski učinak na ovaj enzim pokazuju i flavonoidi. Ispitivanja na životinjskim modelima pokazala su kako najjači inhibicijski učinak među ispitivanim flavonoidima ima morin. Inhibicijski učinak flavonoida smanjuje se ovim redom: morin > luteolin > kvercetin > kempferol > fisetin > miricetin > taksifolin > hesperetin > baikalein. Pokazalo se kako najjači inhibicijski učinak imaju oni flavonoidi koji imaju dvije hidroksilne skupine na prstenu B, zatim hidoksilne skupine na položajima 5 i 7 na prstenu A te C2-C3 dvostruku vezu. Galangin, koji nema hidroksilne skupine na prstenu B, pokazao je jako slab učinak na ovaj enzim, dok su morin, luteolin i kvercetin koji imaju dvije hidroksilne skupine na prstenu B pokazali najjači inhibicijski učinak. Flavanoni taksifolin i hesperetin pokazali su puno slabiji inhibicijski učinak na sintazu masnih kiselina u odnosu na flavone i flavonole. IC_{50} vrijednost taksifolina koji ima istu strukturu kao i kvercetin, ali bez C2-C3 dvostruke veze, bila je puno veća u odnosu na IC_{50} vrijednost kvercetina. Također, flavanoli epikatehin i epigalokatehin, koji u strukturi nemaju keto skupinu na položaju 4, pokazali su slab inhibicijski učinak na sintazu masnih kiselina (62).

4.2.5. Utjecaj na izomeraze

4.2.5.1. DNA topoizomeraze

DNA topoizomeraze imaju važnu ulogu u održavanju integriteta i strukture kromosoma, a ključna im je uloga u replikaciji, transkripciji, rekombinaciji i kondenzaciji kromosoma. Inhibicijom ovih enzima flavonoidi ostvaruju antineoplastički učinak (63). Miricetin, kvercetin, fisetin i morin inhibiraju topoizomerazu I i II, dok kempferol i 4′,6,7-trihidroksiflavon inhibiraju samo topoizomerazu II. Flavonoidi koji su pokazali inhibicijski učinak na topoizomerazu I i II imali su hidroksilne skupine na položajima 3, 7, 3′ i 4′ te keto skupinu na položaju 4. Također, važnu ulogu za inhibicijski učinak pokazala je i dvostruka veza između ugljikovih atoma na položajima 2 i 3. Galangin, koji nema supstituiranih hidroksilnih skupina na prstenu B, ne pokazuje inhibicijski učinak čime je naglašena važnost hidroksilnih skupina na prstenu B. Katehin, iako posjeduje supstituirane hidroksilne skupine na prstenu B, ali ne i keto skupinu u položaju 4, ne inhibira djelovanje topoizomeraza. Ovim je naglašena važnost keto skupine za inhibicijski učinak flavonoida. Kada govorimo o

izoflavonima, pokazano je kako daidzein koji nema hidroksilnu skupinu na položaju 5 te prunetin koji ima supstituiranu metoksi skupinu u položaju 7, ne pokazuju inhibicijski učinak na ove enzime (64).

4.2.6. Utjecaj na ligaze

4.2.6.1. D-alanin ligaza

D-alanin ligaza (Ddl) je važan enzim koji katalizira vezanje D-Ala-D-Ala podjedinice za prekursore peptidoglikana te predstavlja važnu metu za antimikrobno djelovanje nekih lijekova. Kvercetin i apigenin pokazuju inhibicijski učinak na D-alanin ligazu i to iz bakterija *Helicobacter pylori* i *Escherichia coli*. Učinak ostvaruju na način da kompetitivno inhibiraju vezanje adenozin trifosfata (ATP) i nekompetitivno D-Ala jedinice za ovaj enzim. IC_{50} vrijednost kvercetina za D-alanin ligazu iz *Helicobacter pylori* bila je 48,5 ± 4,3, a za apigenin 132,7 ± 14,4, dok je za D-alanin ligazu iz *Escherichia coli* bila 19,9 ± 1,8 za kvercetin te 163 ± 26,2 za apigenin. Rezultati pokazuju kako kvercetin posjeduje jači inhibicijski učinak na D-alanin ligazu u odnosu na apigenin (65).

5. RASPRAVA

5.1. Farmakoterapijski učinci flavonoida

Flavonoidi posjeduju različite farmakološke i biokemijske učinke pa se koriste u prevenciji i liječenju različitih bolesti. Ponajviše je naglašena antioksidacijska aktivnost flavonoida i to onih koji su svojoj strukturi sadrže kateholnu skupinu na prstenu B kao što je kvercetin. Osim antioksidacijske aktivnosti, opisani su i drugi učinci flavonoida kao što je: protuupalno, antitrombotičko, antisklerotičko, kardioprotektivno, hepatoprotektivno, antineoplastičko, antimikrobno djelovanje, a također mogu utjecati na hormonsku regulaciju.

Metaboličke promjene flavonoida uzrokuju promjene njihovih svojstava i bioloških učinaka pa mogu djelovati ili povoljno, odnosno omogućiti djelovanje flavonoida, ili negativno odnosno onemogućiti njihovo djelovanje i učiniti ih inaktivnima. Reakcije druge faze metabolizma odnosno reakcije konjugacije utječu na svojstva flavonoida poput molekularne mase, naboja i hidrofobnosti. Takve promjene mogu utjecati na njihovu topljivost i sposobnost prolaska kroz biološke membrane te je vjerojatno da će utjecati na njihovu brzinu izlučivanja i njihov poluživot u plazmi. Konjugacijom se smanjuje broj slobodnih hidroksilnih skupina čime se mijenjaju antioksidacijska svojstva flavonoida te njihova sposobnost interakcije s važnim staničnim proteinima kao što su enzimi, stanični receptori i transportni proteini (8). Većina bioloških učinaka flavonoida povezana je s hidroksilnim skupinama stoga se taj učinak može umanjiti ili u potpunosti onemogućiti nakon reakcija konjugacije (10). Osim reakcija konjugacije, ulogu u mijenjanju bioloških učinaka flavonoida imaju i reakcije koje se odvijaju pod utjecajem enzima superporodice citokrom P450. Tako se na primjer, flavonoli galangin i kempferid u jetri metaboliziraju do biološki aktivnijeg kempferola i to galangin hidroksilacijom, a kempferid O-dimetilacijom na položaju 4´ prstena B (27).

Jedan od načina na koji flavonoidi ostvaruju svoje učinke je i djelovanje na različite enzimske sustave. Protuupalni učinak ostvaruju inhibicijom više enzima i to fosfolipaze A_2 (PLA_2), cikooksigenaze i lipooksigenaze, ali i inhibicijom interleukinima inducirane ekspresije tkivnih faktora. Inhibicijom PLA_2 flavonoidi sprječavaju oslobađanje arahidonske kiseline iz plazmatskih membrana, te na taj način sprječavaju prvi korak u sintezi upalnih medijatora prostaglandina i leukotriena. Osim na ovaj način, flavonoidi sprječavaju sintezu prostaglandina i leukotriena na način da inhibiraju enzime COX i LOX. Inhibicijom COX i LOX flavonoidi također ostvaruju i antitrombotički učinak jer na taj način inhibiraju sintezu tromboksana A_2 važnog u procesu aktivacije i agregacije trombocita (1, 5).

Flavonoidi također povoljno djeluju na sniženje krvnog tlaka. Takav učinak najvjerojatnije ostvaruju inhibicijom enzima fosfodiesteraze (PDE) čime se povećava razina cAMP-a, a time dolazi do povećanja protoka vode iz krvi u tubularne stanice i dalje u urin. Budući da se smanjuje količina vode u krvotoku, dolazi do snižavanja krvnog tlaka. Također je opisan i inhibicijski učinak flavonoida na angiotenzin konvertirajući enzim (ACE) u *in vitro* i *in vivo* studijama, ali i aktivacija enzima oksigenaze što pogoduje stvaranju aldosterona koji potiče izlučivanje natrija i vode iz organizma (1).

Aldoza reduktaza je enzim koji katalizira redukciju glukoze u sorbitol. Njegova uloga je naglašena u stanjima kao što je *diabetes mellitus*, kada povećana dostupnost glukoze u tkivima neosjetljivim na inzulin (živci, retina, leće) dovodi do povećanog stvaranja sorbitola. Sorbitol se zadržava u tkivima te uzrokuje komplikacije kao što su katarakta, neuropatija i retinopatija (49). Flavonoidi su pokazali inhibicijski učinak i na ovaj enzim pa stoga povoljno djeluju i u stanjima kao što je *diabetes mellitus*.

Istraživanja su pokazala kako osobe koje konzumiraju hranu bogatu kvercetinom (bijeli luk, jabuke) te umjereno konzumiraju vino imaju manji rizik od razvoja različitih vrsta karcinoma kao što su karcinom prostate, pluća, dojke, debelog crijeva i dr. Flavonoidi antitumorski učinak ostvaruju različitim mehanizmima kao što su: regulacija „prema dolje“ (engl. *downregulation*) mutiranog p53 proteina, zaustavljanje staničnog ciklusa, inhibicija tirozin kinaze, inhibicija proteina toplinskog šoka (Hsp), inhibicija ekspresije Ras proteina te vezanje za estrogenske receptore (5). Antitumorski učinak flavonoidi postižu i inhibicijom DNA topoizomeraze II, ali i inhibicijom nosača glukoze u plazmatskoj membrani koji opskrbljuje stanicu glukozom za glikolizu (1, 63).

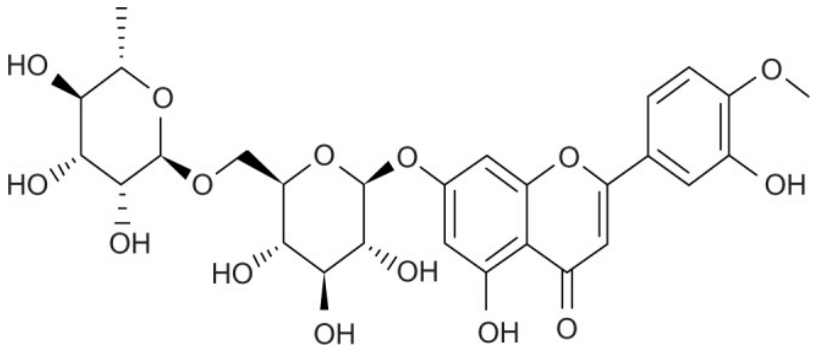
Flavonoidi pokazuju antibakterijsko, antivirusno i antimikotičko djelovanje. Sa svojim antimikrobnim djelovanjem posebno se izdvaja propolis za čije su djelovanje, osim flavonoida, odgovorni i ostali polifenoli kao što su fenolne kiseline. Mehanizam djelovanja propolisa još nije u potpunosti razjašnjen, ali se smatra da djelovanje polifenola u propolisu odgovara djelovanju fenola odnosno djeluju na način da denaturiraju bjelančevine u stanici, inhibiraju bakterijske RNA glukotransferaze te inhibiraju enzime svojim oksidacijskim osobinama. Flavonoidi apigenin i genkvanin pokazali su djelovanje na *Enterococcus faecalis*, *Vibrio cholerae*, *Shigella sonnei* i *Micrococcus luteus*, dok kvercetin, kempferol, flavon, luteolin pokazuju inhibicijsku sposobnost na rast *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae* i meticilin rezistentnog soja *Staphylococcus aureus* (1). Flavonoidi su pokazali

učinak i na različite viruse kao što su virus HIV-a, citomegalovirus (CMV), adenovirus, rotavirus te *Herpes simplex* virus tip 1 i 2 (1, 66). Antiviralno i virucidno djelovanje flavonoidi postižu indukcijom nukleaze koja uništava virusne genome i inhibira proces umnažanja virusa, jačanjem stanične membrane čime se onemogućuje prodiranje virusa kroz nju i inhibicijom umnožavanja virusa i sprječavanjem stvaranje sincicija (1)

5.2. Pripravci na bazi flavonoida u ljekarni

U ljekarni se trenutno mogu pronaći različiti pripravci koji u svom sastavu sadrže flavonoide. Nekoliko ih je registrirano kao lijek koji se izdaje na recept, a postoje i pripravci koji se izdaju bez recepta. U najvećoj mjeri su zastupljeni i u obliku dodataka prehrani.

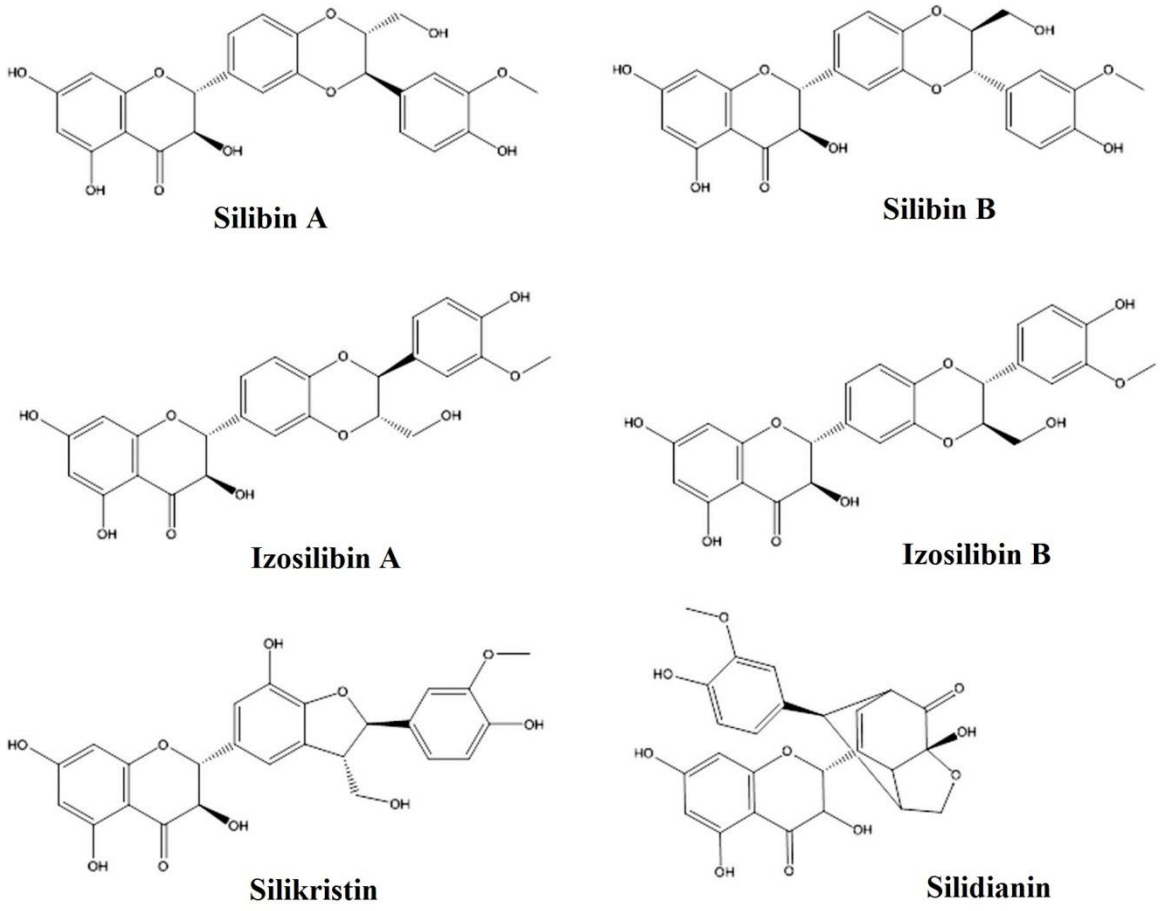
Trenutno je u Republici Hrvatskoj registriran lijek koji se izdaje na recept, a kao djelatnu tvar sadrži 500 mg pročišćene mikronizirane smjese flavonoida koja se sastoji od 450 mg diosmina i 50 mg flavonoida izraženih kao hesperidin. Indiciran je za liječenje simptoma i znakova kronične venske insuficijencije donjih ekstremiteta te akutne hemoroidalne bolesti. Ovaj lijek smanjuje vensku disenzibilnost i venski zastoj, a na mikrocirkulacijskoj razini smanjuje kapilarnu permeabilnost i povećava kapilarnu otpornost. Mikronizirani diosmin povećava venski tonus te smanjuje vrijeme pražnjenja vena. Učinak ovog lijeka u ljudi je potvrđen kontroliranim, dvostruko slijepim studijama koje su koristile objektivne i kvantitativne metode mjerenja učinka lijeka na vensku hemodinamiku (67).



Slika 34. Struktura diosmina (68).

Plod sikavice (*Syilibum marianum* (L.) Gaertn, *fructus*) sadrži flavonoidne spojeve i to u obliku flavonolignana koji imaju zajedničko ime silimarin te flavonoidne aglikone kvercetin, taksifolin i krizoeriol (69). Silimarin je smjesa izomera silibina, izosilibina, silidianina i silikristina koji su odgovorni za hepatoprotektivni učinak ploda sikavice. Silimarin se veže specifično na receptore na membrani hepatocita te na taj način sprječava vezanje toksičnih tvari, a također može inhibirati mnoge transportne proteine unutar

membrane. Potiče enzime koji sudjeluju u izgradnji i razgradnji lipidne membrane te sprječava lipidnu peroksidaciju inhibicijom lipooksigenaze. Silimarin kao hvatač slobodnih radikala prekida reakciju peroksidacije te time sprječava oštećenje membrane hepatocita. Osim na membranu, silimarin pokazuje učinak i na staničnu jezgru, u kojoj aktivirajući polimerazu I, potiče ribosome na pojačanu transkripciju ribonukleinske kiseline (RNK). To za posljedicu ima ubrzanu sintezu ribosoma te povećanje biosinteze strukturnih i funkcijskih bjelančevina čime je omogućena ubrzana regeneracija oštećenih hepatocita (70). Ekstrakt ploda sikavice je registriran kao bezreceptni lijek indiciran za potpornu terapiju u odraslih za ublažavanje poremećaja funkcije jetre kod kroničnog hepatitisa B i C, alkoholne bolesti jetre te ciroze jetre. Osim kao bezreceptni lijek, ekstrakt ploda sikavice se u ljekarni može pronaći u obliku dodataka prehrani koji su često kombinirani s ostalim biljnim drogama koje imaju povoljan učinak na jetru.



Slika 35. Izomeri u sastavu silimarina (71).

Flavonoidi su također u velikoj količini zastupljeni u ekstraktu zeleni gospine trave (*Hypericum perforatum* L., herba). Najzastupljeniji flavonoidi su kvercetin te njegovi

glikozidi rutin i hiperozid te kvercitrin i izokvercitrin (72). Zajedno s naftodiantronom hipericinom i fluoroglucinolom hiperforinom ostvaruju antidepresivni učinak. Suhi ekstrakt gospine trave inhibira ponovnu pohranu noradrenalina, serotonina i dopamina dok subkronično liječenje uzrokuje smanjivanje beta adrenergičkih receptora. U Hrvatskoj je ekstrakt zeleni gospine trave registrirani kao bezreceptni lijek koji sadrži 225 mg ekstrakta što odgovara 0,25 mg – 0,75 mg ukupnih hipericina izraženih kao hipericin zatim 15 mg flavonoida izraženih kao rutin i najviše 15 mg hiperforina. Lijek je indiciran za kratkotrajno simptomatsko liječenje blagih depresivnih epizoda u odraslih (73).

Ekstrakt lista ginka (*Ginkgo biloba* L., folium) sadrži kao aktivne tvari flavonske glikozide kvercetina, kempferola i izorhamnetina, te terpenske laktone ginkgolide i bilobalide. Manje zastupljeni flavonoidi su apigenin, luteolin i miricetin (74). U Hrvatskoj je registrirano nekoliko biljnih pripravaka koji se izdaju bez recepta, a koji sadrže od 40 do 120 mg ekstrakta lista ginka. Indicirani su za ublažavanje simptoma koji nastaju kao posljedica poremećaja prokrvljenosti mozga, poboljšanje kvalitete života kod blagih oblika demencije u odraslih, ublažavanje simptoma koji nastaju kao posljedica oslabljene cirkulacije u nogama te kao pomoćna terapija kod vertiga i tinitusa (75, 76). Osim biljnih lijekova, u ljekarni se mogu pronaći i dodaci prehrani koji sadrže ekstrakt lista ginka.

Od ostalih preparata koji sadrže flavonoide, a mogu se pronaći u ljekarnama, svakako treba izdvojiti pripravke koji sadrže ekstrakt ploda američke brusnice (lat. *Vaccinium macrocarpon* Ait., fructus), zatim pripravke koji sadrže glog (*Crataegus spp*., folium cum flore), arniku (*Arnica montana* L., flos), crni gavez (*Symphytum officinale* L., radix), koprivu (*Urtica spp*., radix) i propolis.

Ekstrakt ploda američke brusnice bogat je proantocijanidinima i antocijanidinima koji su odgovorni za antioksidacijsku aktivnost i sprječavanje prianjanja *E.coli* za površinu epitelnih stanica mokraćnog mjehura, pa se pripravci ove biljke koriste u prevenciji i tretmanu urinarnih infekcija. Osim brusnice, i kopriva se koristi kod urinarnih infekcija, ali samo kao adjuvantna terapija zbog svog diuretskog djelovanja (77). Najzastupljeniji flavonoidi u koprivi su flavoni luteolin i apigenin (78). Pripravci arnike i crnog gaveza koriste se kod reumatskih bolova, bolova uzrokovanih sportskim ozljedama te hematoma, fraktura, iščašenja i istegnuća (77). Arnika uglavnom sadrži flavonoidne glikozide i to kvercetina, kempferola, izorhamnetina i patuletina (79).

6. ZAKLJUČCI

1. U prirodi flavonoidi uglavnom dolaze u obliku glikozida premda su za biološke učinke ovih spojeva odgovorni uglavnom njihovi aglikoni.

2. S obzirom na njihovu strukturu u humanom organizmu podliježu reakcijama 1. i 2. faze metabolizma.

3. Samo se rijetki flavonoidi mogu apsorbirati u obliku glikozida pa je reakcija hidrolize prva i jedna od važnijih metaboličkih reakcija ovih prirodnih spojeva.

4. Reakcije oksidacije koje se pretežito odvijaju pod utjecajem enzima citokrom P450 (CYP), osim što mogu utjecati na eliminaciju flavonoida iz organizma, često su odgovorne za njihovu učinkovitost, bilo da izazivaju pojačanu biološku učinkovitost ili toksičnost.

5. Najučestalije reakcije 2. faze metabolizma flavonoida su reakcije glukuronidacije i sulfatacije koje se u najvećoj mjeri odvijaju u jetri i tankom crijevu te bitno mijenjaju svojstva i biološke učinke flavonoida.

6. Reakcije biološke metilacije su reakcije manjeg afiniteta za flavonoide, ali izuzetno važne za one flavonoide koji posjeduju kateholne skupine u prstenu B kao što su kvercetin, luteolin, fisetin i katehin.

7. Važnu ulogu u metabolizmu flavonoida ima crijevna mikroflora i to bakterijske vrste *Eubacterium ramulus* i *Fusobacterium plautii*.

8. Utjecaj flavonoida na enzimske sustave uvelike ovisi o njihovim strukturnim karakteristikama. Flavonoidi uglavnom pokazuju inhibicijske učinke na enzimske sustave.

9. Utjecajem na enzimske sustave flavonoidi ostvaruju svoje biološke učinke u ljudskom organizmu.

7. POPIS CITIRANE LITERATURE

1. Smolčić-Bubalo A. Disertacija: Nove metode u istraživanju hrvatskog propolisa. Zagreb: Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu; 2007.

2. Del Rio D, Rodriguez-Mateos A, Spencer JP, Tongnolini M, Borges G, Crozier A. Dietary (poly)phenolic in human helath: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. Antioxid Redox Signal. 2013 May 10;18(14):1818-92.

3. Treutter D. Significanace of flavonoids in plant resistance and enhancement of their biosynthesis. Plant Biol (Stuttg). 2005 Nov;7(6):581-91.

4. Iriti M, Varoni EM. Chemopreventive potential of flavonoids in oral squamous cell carcinoma in human studies. Nutrients. 2013 Jul;5(7):2564-76.

5. Kumar S, Pandey AK. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. ScientificWorldJournal. 2013 Dec 29;2013:162750.

6. Panche AN, Diwan AD, Chandra SR. Flavonoids: an overview. J Nutr Sci. 2016 Dec 29;5:e47.

7. Rathee P, Chandhary H, Rathee S, Rathee D, Kumar V, Kohli K. Mechanism of action of flavonoids as anti-inflammatory agents: a review. Inflamm Allergy Drug Targets. 2009 Jul;8(3):229-35.

8. Viskupičova J, Ondrejovič M, Šturdik E. Bioavailability and metabolism of flavonoids. J Food Nutr Res. 2008;47(4):151-162.

9. Rendić S, Medić-Šarić M. Metabolizam lijekova i odabranih ksenobiotika. Zagreb: Medicinska naklada; 2013.

10. Chen Z, Zheng S, Li L, Jiang H. Metabolism of flavonoids in human: a comprehensive review. Curr Drug Metab. 2014 Jan;15(1):48-61.

11. Walle T, Browning AM, Steed LL, Reed SG, Walle UK. Flavonoid glucosides are hydrolyzed and thus activated in the oral cavity in humans. J Nutr. 2005;135:48-52.

12. Spencer JP. Metabolism of tea flavonoids in the gastrointestinal tract. J Nutr. 2003;133:3255S-3261S.

13. Mallery SR, Budendorf DE, Larsen MP, Pei P, Tong M, Holpuch AS, Larsen PE, Stoner GD, Fields HW, Chan KK, Ling Y, Liu Z. Effects of oral mucosal tissue, saliva and oral

microflora on intraoral metabolism and bioactivation of black raspberry anthocyanins. Cancer Prev Res (Phila). 2011 Aug;4(8):1209-21.

14. Rios LY, Bennett RN, Lazarus SA, Remesy C, Scalbert A, Williamson G. Cocoa procyanidins are stable during gastric transit in humans. Am J ClinNutr. 2002;76(5):1106-1110.

15. Hollman PC. Absorption, bioavailability and metabolism of flavonoids. PharmBiol. 2004;42(1):74-83.

16. Day AJ, DuPont MS, Ridley S, Rhodes M, Rhodes MJ, Morgan MR, Williamson G. Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver beta-glucosidase activity. FEBS Lett. 1998 Sep 25;436(1):75-5.

17. Németh K, Plumb GW, Berrin JG, Juge N, Jacob R, Naim HY, Williamson G, Swallow DM, Kroon PA. Deglycosylation by small intestinal epithelial cell beta-glucosidases is a critical step in the absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans. Eur J Nutr. 2003 Jan;42(1):29-42.

18. Day AJ, Gee JM, DuPont MS, Johnson IT, Williamson G. Absorption of quercetin-3-glucoside and quercetin-4′-glucoside in the rat small intestine: the role of lactase phlorizin hydrolase and the sodium-dependent glucose transporter. Biochem Pharmacol. 2003 Apr 1;65(7):1199-206.

19. www.polyphenols.com/flavonols/quercetin-4-glucoside-article165-171.html, pristupljeno 08.06.2018.

20. Walle T. Absorption and metabolism of flavonoids. Free Radic Biol Med. 2004 Apr 1;36(1):829-37.

21. Braune A, Blaut M. Bacterial species involved in the conversion of dietary flavonoids in the human gut. Gut Microbes. 2016 May 3;7(3):216-34.

22. Keppler K, Humpf HU. Metabolism of anthocyanins and their phenolic degradation products by intestinal microflora. Bioorg Med Chem. 2005 Sep 1;13(17):5195-205.

23. Beekwilder J, Marcozzi D, Vecchi S, de Vos R, Janssen P, Francke C, van Hylckama Vlieg J, Hall RD. Characterization of rhamnosidases from *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus acidophilus*. Appl Environ Microbiol. 2009;75:3447-54.

24. Avila M, Jaquet M, Moine D, Requena T, Pelaez C, Arigoni F, Jankovic I. Physiological and biochemical characterization of the two alpha-L-rhamnosidases of *Lactobacillus plantarum* NCC245. Microbiology. 2009;155:2739-49.

25. Braune A, Gütschow M, Engst W, Blaut M. Degradation of quercetin and luteolin by *Eubacterium ramulus*. Appl Environ Microbiol. 2001;67:5558-67.

26. Schröder C, Matthies A, Engst W, Blaut M, Braune A. Identification and expression of genes involved in the conversion of daidzein and genistein by the equol-forming bacterium *Slackia isoflavoniconvertens*. Appl Environ Microbiol. 2013;79:3494-502.

27. Otake Y, Walle T. Oxidation of the flavonoids galangin and kaempferide by human liver microsomes and CYP1A1, CYP1A2, and CYP2C9. Drug Metab Dispos. 2002;30(2):103-105.

28. Breinholt VM, Rasmussen SE, Brosen K, Friedberg TH. *In vitro* metabolism of genistein and tangeretin by human and murine cytochrome P450s. Pharmacol Toxicol. 2003 Jul;93(1):14-22.

29. Sousa MC, Braga CB, Cintra ASC, de Oliveira Valeria, Andrade CH. *In silico* metabolism studies of dietary flavonoids by CYP1A2 and CYP2C9. Food Res Int. 2013 Jan;50(1):102-110.

30. Walle UK, Walle T. Bioavailable flavonoids: cytochrome P450-mediated metabolism of methoxyflavones. Drug Metab Dispos. 2007 Nov;35(11):1985-9.

31. www.chemspider.com/Chemical-Structure.4445231.html , pristupljeno 10.6.2018.

32. Wu B, Xu B, Hu M. Regioselective glucuronidation of flavonols by six human UGT1A isoforms. Pharm Res. 2011 Aug;28(8):1905-18.

33. Chen YK, Chen SQ, Li X, Zeng S. Quantitative regioselectivity of glucuronidation of quercetin by recombinant UDP-glucuronosyltransferases 1A9 and 1A3 using enzymatic kinetic parameters. Xenobiotica. 2005 Oct-Nov;35(10-11):943-54.

34. Williamson G, Aeberli I, Miguet L, Zhang Z, Sanchez MB, Crespy V, Barron D, Needs P, Kroon PA, Glavinas H, Krajcsi P, Grigorov M. Interaction of positional isomers of quercetin glucuronides with the transporter ABCC2 (cMOAT, MRP2). Drug Metab Dispos. 2007 Aug;35(8):1262-8.

35. Bandaruk Y, Mukai R, Terao J. Cellular uptake of quercetin and luteolin and their effects on monoamine oxidase-A in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. Toxicol Rep. 2014 Sep 6;1:639-649.

36. Kim HP, Son KH, Chang HW, Kang SS. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. J Pharmacol Sci. 2004 Nov;96(3):229-45.

37. Katzung BG i sur. Temeljna i klinička farmakologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2011.

38. Chi YS, Jong HG, Son KH, Chang HW, Kang SS, Kim HP. Effects of naturally occurring prenylated flavonoids on enzymes metabolizing arachidonic acid: cyclooxygenases and lipooxygenases. Biochem Pharmacol. 2001 Nov 1;62(9):1185-91.

39. Ribeiro D, Freitas M, Tane SM, Silva AM, Porto G, Cabrita EJ, Marques MM, Fernandes E. Inhibition of LOX by flavonoids: a structure-activity relationship study. Eur J Med Chem. 2014 Jan 24;72:137-45.

40. Lee JH, Kim GH. Evaluation of antioxidant and inhibitory activities for different subclasses flavonoids on enzymes for rheumatoid arthritis. J Food Sci. 2010 Sep;75(7):H212-7.

41. www.chemfaces.com/natural/Sophoraflavanone-G-CFN92005.html,pristupljeno 4.8.2018.

42. Korobkova EA. Effect of natural polyphenols on CYP metabolism: Implication for diseases. Chem Res Toxicol. 2015 Jul 20;28(7):1359-90.

43. Shimada T, Tanaka K, Takenaka S, Murayama N, Martin MV, Foroozesh MK, Yamazaki H, Guengerich FP, Komori M. Structure-function relationships of inhibition of human cytochromes P450 1A1, 1A2, 1B1, 2C9 and 3A4 by 33 flavonoid derivatives. Chem Res Toxicol. 2010 Dec 20;23(12):1921-35.

44. Cermak R. Effect of dietary flavonoids on pathways involved in drug metabolism. Expert Opin Drug Metab Toxicol. 2008 Jan;4(1):17-35.

45. www.chemfaces.com/dbs/CFN99526.html, pristupljeno: 6.8.2018.

46. Brozic P, Kocbek P, Sova M, Kristl J, Martens S, Adamski J, Gobec S, Lanisnik Rizner T. Flavonoids and cinnamic acid derivatives as inhibitors of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1. Mol Cell Endocrinol. 2009 Mar 25;301(1-2):229-34.

47. Spanon C, Veskoukis AS, Kerasioti T, Kontou M, Angelis A, Aligiannis N, Skaltsounis AL, Kouretas D. Flavonoid glycosides isolated from unique legume plant extracts as novel inhibitors of xanthine oxidase. PLoS One. 2012;7(3):e32214.

48. Nagao A, Seki M, Kobayashi H. Inhibition of xanthine oxidase by flavonoids. Biosci Biotechnol Biochem. 1999 Oct;63(10):1787-90.

49. Matsuda H, Morikawa T, Toguchida I, Yoshikawa M. Structural requirements of flavonoids and related compounds for aldose reductase inhibitory activity. Chem Pharm Bull (Tokyo). 2002 Jun;50(6):788-95.

50. Boušova I, Skalova L. Inhibition and induction of glutathione S-transferases by flavonoids: possible pharmacological and toxicological consequences. Drug Metab Rev. 2012 Dec;44(4):267-86.

51. Boušova I, Hajek J, Dršata J, Skalova L. Naturally occurring flavonoids as inhibitors of purified cytosolic glutathione S-transferase. Xenobiotica. 2012 Sep;42(9):872-9.

52. Chow HH, Hakim IA, Vining DR, Crowell JA, Tome ME, Ranger-Moore J, Cordova CA, Mikhael DM, Briehl MM, Alberts DS. Modulation of human glutathione S-transferases by polyphenon E intervention. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2007 Aug;16(8):1662-6.

53. https://www.researchgate.net/figure/Chemical-structures-of-catechin-and-four-major-green-tea-catechins_fig1_286523655, pristupljeno: 9.8.2018.

54. Kukongviriyapan V, Phromsopha N, Tassaneeyakul W, Kukongviriyapan U, Sripa B, Hahnvajanawong V, Bhudisawasdi V. Inhibitory effects of polyphenolic compounds on human arylamine N-acetyltransferase 1 and 2. Xenobiotica. 2006 Jan;36(1):15-28.

55. Peluso MR. Flavonoids attenuate cardiovascular disease, inhibit phosphodiesterase, and modulate lipid homeostasis in adipose tissue and liver. Exp Biol Med (Maywood). 2006 Sep;231(8):1287-99.

56. Ko WC, Shih CM, Lai YH, Chen JH, Huang HL. Inhibitory effects of flavonoids on phosphodiesterase isozymes from guinea pig and their structure-activity relationships. Biochem Pharmacol. 2004 Nov 15;68(10):2087-94.

57. Havsteen BH. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. Pharmacol Ther. 2002 Nov-Dec;96(2-3):67-202.

58. Srivastav A, Chandra A, Singh M, Jamal F, Rastogi P, Rajendran SM, Bansode FW, Lakshmi V. Inhibition of hyaluronidase activity of human and rat spermatozoa *in vitro* and antispermatogenic activity in rats *in vivo* by *Terminalia chebula*, a flavonoid rich plant. Reprod Toxicol. 2010 Apr;29(2):214-24.

59. Kuppusamy UR, Khoo HE, Das NP. Structure-activity studies of flavonoids as inhibitors of hyaluronidase. Biochem Pharmacol. 1990 Jul 15;40(2):397-401.

60. Kuppusamy UR, Das NP. Inhibitory effects of flavonoids on several venom hyaluronidases. Experientia. 1991 Dec 1;47(11-12):1196-200.

61. Lindahl M, Tagesson C. Flavonoids as phospholipase A2 inhibitors: importance of their structure for selective inhibition of group II phospholipase A2. Inflammation. 1997 Jun;21(3):347-56.

62. Li BH, Tian WX. Inhibitory effects of flavonoids on animal fatty acid synthase. J Biochem. 2004 Jan;135(1):85-91.

63. Russo P, Del Bufalo A, Cesario A. Flavonoids acting on DNA topoisomerases: recent advances and future perspectives in cancer therapy. Curr Med Chem. 2012;19(31):5287-93.

64. Constantinou A, Mehta R, Runyan C, Rao K, Vaughan A, Moon R. Flavonoids as DNA topoisomerase antagonists and poisons: structure-activity relationships. J Nat Prod. 1995 Feb;58(2):217-25.

65. Wu D, Kong Y, Han C, Chen J, Hu L, Jiang H, Shen X. D-Alanine: D-alanine ligase as a new target for the flavonoids quercetin and apigenin. Int J Antimicrob Agents. 2008 Nov;32(5):421-6.

66. Narayana KR, Reddy MS, Chaluvadi MR, Krishna DR. Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. Indian J Pharmacol. 2001;33:2-16.

67. Sažetak opisa svojstava lijeka Detralex 500 mg filmom obložene tablete. Agencija za lijekove i medicinske proizvode. Dostupno na: http://halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova/Detralex-500-mg-filmom-oblozene-tablete/14439/.

68. https://www.researchgate.net/figure/Chemical-structure-of-diosmin_fig1_249966866 pristupljeno: 19.9.2018.

69. Marković S. Fitoaromaterapija. Zagreb: Centar Cedrus; 2005.

70. Sažetak opisa svojstava lijeka Sylimarin tvrde kapsule. Agencija za lijekove i medicinske proizvode. Dostupno na: http://halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova/Silymarin-tvrde-kapsule/13057/.

71. http://dmd.aspetjournals.org/content/41/5/958/tab-figures-data, pristupljeno: 19.9.2018.

72. Kalogeropoulos N, Yannakopoulou K, Gioxari A, Chiou A, Makris DP. Polyphenol characterization and encapsulation in β-cyclodextrin of a flavonoid-rich Hypericum perforatum (St Jonh`s wort) extract. LWT-Food Sci Technol. 2010 Jan;43(6):882-9.

73. Sažetak opisa svojstava lijeka Aktivin-H kapsule. Agencija za lijekove i medicinske proizvode. Dostupno na: http://www.halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova/Aktivin-H-kapsule/10870/.

74. Avula B, Sagi S, Gafner S, Upton R, Wang YH, Wang M, Khan IA. Identification of Ginkgo biloba supplements adulteration using high performance thin layer chromatography and ultra high performance liquid chromatography-diode array detector-quadrupole time of flight-mass spectrometry. Anal Bioanal Chem. 2015 Oct;407(25):7733-46.

75. Sažetak opisa svojstava lijeka Tebokan forte 120 mg filmom obložene tablete. Agencija za lijekove i medicinske proizvode. Dostupno na: http://www.halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova/Tebokan-forte-120-mg-filmom-oblozene-tablete/11189/.

76. Sažetak opisa svojstava lijeka Bilobil 40 mg tvrde kapsule. Agencija za lijekove i medicinske proizvode. Dostupno na: http://www.halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova/Bilobil-40-mg-tvrde-kapsule/12480/.

77. CASI: Priručnik za samoliječenje. Zagreb: Hrvatska udruga proizvođača bezreceptnih proizvoda; 2017.

78. Carvalho AR, Costa G, Figueirinha A, Liberal J, Prior JAV, Lopes MC, Cruz MT, Batista MT. Urtica spp.: Phenolic composition, safety, antioxidant and anti-inflammatory activities. Food Res Int. 2017 Sep;99(Pt1):485-494.

79. Merfort I, Wendisch D. New flavonoid glycosides from *Arnicae flos* DAB91. Planta Med. 1992 Aug;58(4):355-7.

8. SAŽETAK

Cilj: Cilj ovog diplomskog rada je opisati metabolizam različitih skupina flavonoida u ljudskom organizmu te njihov utjecaj na enzimske sustave, a ovisno o strukturnim značajkama koje flavonoidi moraju posjedovati da bi se taj učinak ostvario.

Materijali i metode: Osnovna struktura flavonoida sastoji se od dva benzenska prstena povezana propanskim lancem. Obično se, prema strukturnim značajkama, flavonoidi dijele u šest glavnih skupina, a to su: antocijanidini, flavan-3-oli, flavoni, flavanoni, izoflavoni i flavonoli. Ulaskom u ljudski organizam, flavonoidi su podložni različitim metaboličkim promjenama od kojih se mogu izdvojiti reakcije hidrolize i hidroksilacije (monooksigenacije) kao reakcije prve faze metabolizma, a od reakcija druge faze značajne su: glukuronidacija, sulfokonjugacija i metilacija.

Rezultati: Metabolizam flavonoida započinje reakcijom hidrolize kojom se iz glikozida flavonoida oslobađa aglikonski dio molekule čime se omogućava apsorpcija. Zatim slijede reakcije prve faze metabolizma koje se poglavito odvijaju u jetri pod utjecajem enzima superporodice citokrom P450, a nakon njih i reakcije druge faze od kojih se ističu reakcije glukuronidacije i sulfatacije. Flavonoidi uglavnom djeluju inhibicijski na različite enzimske sustave, a u ovom radu obrađeni su inhibicijski učinci na: ciklooksigenaze (COX), lipooksigenaze (LOX), enzime citokrom P450 (CYP), ksantin oksidoreduktaze (XOR), fosfodiesteraze (PDE), fosfolipazu A2 (PLA2) i dr. Istraživanja su pokazala da inhibicijski učinci ovise o strukturnim značajkama flavonoida.

Zaključak: Metaboličke promjene flavonoida bitno mijenjaju njihova svojstva i biološke učinke u ljudskom organizmu. Djelovanjem na enzimske sustave flavonoidi ostvaruju različite farmakološke i biokemijske učinke te stoga posjeduju veliki potencijal u prevenciji i terapiji različitih vrsta oboljenja.

9. SUMMARY

Diploma Thesis Title: Flavonoids – metabolic changes and effect on enzyme systems

Objectives: The aim of this diploma thesis is to describe the metabolism of different flavonoid groups in human body and to describe the effect of flavonoids on the enzymatic systems and structural characteristics that flavonoids must have in order to achieve this effect.

Material and Methods: The basic structure of flavonoids consists of two benzene rings connected by propan chain. Usually, according to structural characteristics, flavonoids are divided into six major groups: anthocyanidines, flavan-3-ols, flavones, flavanones, isoflavones and flavonols. By entering into a human organism, flavonoids are subject to various metabolic changes. Hydrolysis and hydroxylation (monooxygenation) reactions (first phase metabolic reactions) and glucuronidation and sulfation (second phase metabolic reactions) can be extracted.

Results: Metabolism of flavonoids begin with hydrolysis during which flavonoids are set free from aglycone part of the molecule to allow absorption. After absorption, flavonoids are transported to liver where they undergo extensive metabolism which includes first phase of metabolic reactions and also conjugation reactions (glucuronidation and sulfation). Usually, flavonoids inhibit various enzyme systems. Some of the enzymes that have been inhibited by flavonoids are: cyclooxygenase (COX), lipooxygenase (LOX), cytochrome P450 enzymes (CYP), xanthine oxidoreductase (XOR), phosphodiesterase (PDE), phospholipase A2 (PLA2). Structural characteristics of flavonoids play hugh role in their effect on enzymes.

Conclusion: Metabolic changes of flavonoids significantly alter properties and biological effects in the human body. By acting on enzyme systems, flavonoids accomplish different pharmacological and biochemical effects and thus have great potential in preventing and treating various types of diseases.

10. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODACI

Ime i prezime: Marko Morović

Datum i mjesto rođenja: 23. srpnja 1994., Bückeburg, Savezna Republika Njemačka

Adresa: Mala ulica 42, 23207 Sveti Filip i Jakov

Telefon: +385996380048

Elektronička pošta: mmorovic2@gmail.com

Državljanstvo: Hrvatsko

OBRAZOVANJE

2013. – 2018. Kemijsko-tehnološki fakultet Sveučilišta u Splitu i Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu, Integrirani preddiplomski i diplomski studij Farmacija

2009. – 2013. Srednja škola Biograd na Moru, Opća gimnazija

2001. – 2009. Osnovna škola Sveti Filip i Jakov

RADNO ISKUSTVO

2. 2018. – 8. 2018. Stručno osposobljavanje u Ljekarni Splitsko-dalmatinske županije, Ljekarna Grad

POSEBNE VJEŠTINE

Rad na računalu: Aktivno i svakodnevno korištenje MS Office paketa,

Strani jezik: Engleski jezik, Njemački jezik

Vozačka dozvola: B kategorija