

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie



Farmakokinetika flavanónov
diplomová práca

Vedúci diplomovej práce: doc. PharmDr. Přemysl Mladěnka, Ph.D.

Hradec Králové 2017

Daniela Uramová

Čestné vyhlásenie

„Prehlasujem, že táto práca je mojím pôvodným autorským dielom. Všetka literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovaní čerpal, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci sú riadne citované. Táto práca nebola použitá k získaniu iného či rovnakého titulu.“

Dátum:

.....

podpis

Pod'akovanie

Týmto by som sa chcela poďakovať doc. PharmDr. Přemyslovi Mladěnkovi, Ph.D. za pomoc, cenné rady, pripomienky a odborné vedenie, ktoré mi pomohli pri vypracovaní tejto mojej diplomovej práce.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakológie a toxikológie

Študent: Daniela Uramová

Školiteľ: doc. PharmDr. Přemysl Mladěnka, Ph.D.

Názov diplomovej práce: Farmakokinetika flavanónov

Cieľom práce bolo spracovať dostupné informácie týkajúce sa osudu flavanónov v ľudskom organizme. Tieto flavonoidy sú bežnou súčasťou ľudskej potravy, a preto je najrelevantnejšie a tiež najviac preskúmané ich perorálne podanie. Pri tomto podaní ich čaká v tráviacom trakte mnoho prekážok, ktoré limitujú vstrebávanie. Flavanóny prijímané potravou sa vyskytujú hlavne vo forme glykozidov, a preto musia byť deglykozylované pomocou skupiny enzýmov β -glukozidáz. V tenkom čreve sa vstrebávajú hlavne aglykóny. Flavonoidy vo forme glykozidov nerozštiepiteľných ľudskými enzýmami (napr. rutinozidy) sú absorbované až v distálnejších častiach tráviacej sústavy po odštiepení cukrovej zložky črevnými baktériami. Tie tiež štiepia flavanónový kruh. Vznikajú pritom látky s fenypropiónovou štruktúrou, ktoré sa môžu vstrebávať. Vo všeobecnosti podliehajú flavanóny extenzívnemu metabolizmu pomocou cytochrómu P450, a to nie len v pečeni, ale aj v enterocytoch, ktorý značne limituje ich biologickú dostupnosť. Analogicky rýchlym procesom sú flavanóny konjugované s kyselinou glukurónovou alebo sírovou. Vzniknuté metabolity sú vylučované prevažne obličkami do moču, ale minoritne môže dochádzať aj k vylučovaniu do stolice. Výsledkom týchto dejov je, že flavanóny majú nízku biologickú dostupnosť.

Na záver sme sa venovali interakciám, ku ktorým dochádza pri súčasnom podávaní flavanónov s niektorými liečivami. K interakciám môže dochádzať na viacerých úrovniach: na cytochróme P450, na influxných a efluxných prenášačoch. Interakcie môžu viesť buď k zvýšeniu biologickej dostupnosti podávaných liečiv a k vystupňovaniu nežiaducich účinkov, alebo naopak k zníženiu dostupnosti a zlyhaniu liečby.

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology & Toxicology

Student: Daniela Uramová

Supervisor: Assoc. Prof. Přemysl Mladěnka, Pharm.D., Ph.D.

Title of diploma thesis: Pharmacokinetics of flavanones

The aim of the work was to summarize the available information regarding the fate of the flavanones in the human organism. These flavonoids are a common part of human diet, and therefore oral administration is the most relevant and examined. There are many obstacles in the digestive tract which are lowering their absorption. Flavanones in human food occur mainly in the form of glycosides, and therefore must be deglycosylated by the β -glucosidase enzyme family. Aglycones are absorbed mainly in the small intestine. Flavonoids in the form of non-cleavable glycosides (e.g., rutinosides) are absorbed in the distal parts of the digestive system, after cleavage of the sugar component by intestinal bacteria. They also decompose the flavanone ring. This leads to substances with a phenylpropionic structure which can be absorbed. In general, flavanones are subject to extensive metabolism by cytochrome P450, not only in the liver but also in the enterocytes, which greatly limits their bioavailability. They are also rapidly conjugated with glucuronic or sulfuric acid. The resulting metabolites are predominantly secreted by the kidneys into the urine, but minor excretion may also occur in the stool. As a result of these processes, flavanones have low bioavailability.

Finally, we focused at interactions between flavanones and some co-administered drugs. Interactions can occur at several levels: cytochrome P450; or influx and efflux transporters. Interactions can either lead to increased bioavailability of co-administered drugs and to occurrence of unexpected side effects or, on the contrary, to reduce bioavailability and treatment failure.

OBSAH

1	Úvod	8
2	Fenolické látky	8
3	Flavonoidy	10
4	Flavanóny	13
4.1	Biosyntéza flavanónov	19
4.2	Výskyt flavanónov	21
4.3	Chemické a fyzikálne vlastnosti flavanónov	23
5	Farmakokinetika flavonoidov	27
5.1	Absorpcia a metabolizmus v tenkom čreve	27
5.1.1	Biologická dostupnosť	37
5.2	Metabolizmus v pečeni	41
5.3	Metabolizmus črevnou mikroflórou v hrubom čreve	47
5.4	Distribúcia	50
5.5	Exkrécia	55
6	Interakcie	62
6.1	Interakcie na cytochróme P450	63
6.2	Interakcie na prenášačoch	67
6.2.1	Efluxné prenášače	67
6.2.2	Influxné prenášače	70
6.3	Iný mechanizmus	76
6.4	Prehľad interakcií	76
7	Diskusia	79
8	Záver	82
9	Použité zdroje	83
10	Prílohy	93

ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

ABC	ATP-binding cassette
ATP	adenozíntrifosfát
AUC	area under the curve / plocha pod krivkou
BAV	biologická dostupnosť
BCRP	breast cancer resistance protein
C	uhlík
CaCo2 bunky	bunky ľudského kolorektálneho adenokarcinómu
CBG	cytosolická β -glukozidáza
c_{max}	Maximálna plazmatická koncentrácia
COMT	katechol- <i>O</i> -metyltransferáza
CYP450	cytochróm P450
DNA	deoxyribonukleová kyselina
FDA	U.S. Food and Drug Administration
FK	farmakokinetika
GIT	gastrointestinálny trakt
GLUT2	glukózový transportér
GŠ	grapefruitová šťava
HMG-CoA reduktáza	hydroxymetylglutaryl-koenzým A reduktáza koncentrácia skúšanej látky, pri ktorej klesne enzýmová aktivita na 50%
IC ₅₀	
KVS	kardiovaskulárny systém
logP	rozdeľovací koeficient
LPH	laktáza-florizín hydroláza
MDR1	multidrug resistance protein 1
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
MRP	multidrug resistant associated protein
MW	molekulárna hmotnosť
OATP	organic anion transporting polypeptide
PDE-5	fosfodiesteráza 5
P-gp	P-glykoproteín
PŠ	pomarančová šťava
PXR	pregnán X receptor
SGLT1	sodíkovo – glukózový prenášač
SULT	sulfotransferáza
T _{1/2}	plazmatický polčas
T _{max}	čas, za ktorý dôjde k c_{max}
UGT	uridín-5'-difosfát glukuronyltransferáza

1 Úvod

V súčasnej dobe možno pozorovať nárast záujmu o používanie prírodných látok vo farmácii a v biomedicíne, čo sa odzrkadľuje aj v predaji nutraceutík a v používaní tradičnej medicíny. Tá vychádza z poznatkov, schopností a praktických znalostí založených na skúsenostiach a teoretických poznatkoch rôznych kultúr, a jej cieľom je chrániť a udržiavať zdravie, či už zlepšením alebo liečením psychických alebo fyzických chorôb. Je zrejmé, že tento zvyšujúci sa dopyt po fytoterapii môže byť prínosným aj pre farmaceutické spoločnosti. Údajne existuje 5000-10 000 zlúčenín, ktoré sú skúmané pred tým, než sa dostanú na trh a v priemere trvá 10 -15 rokov, kým sa vyvinie jedno liečivo. Asi 60% úspešne vyvinutých liečiv majú základ, ktorý je modifikovanou alebo nemodifikovanou štruktúrou prírodného pôvodu (Davies a Yáñez, 2013).

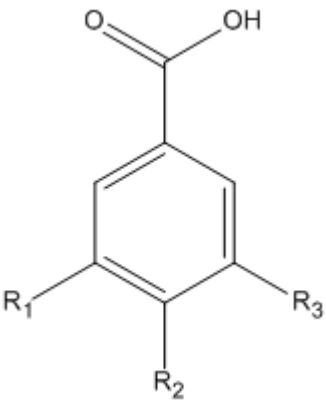
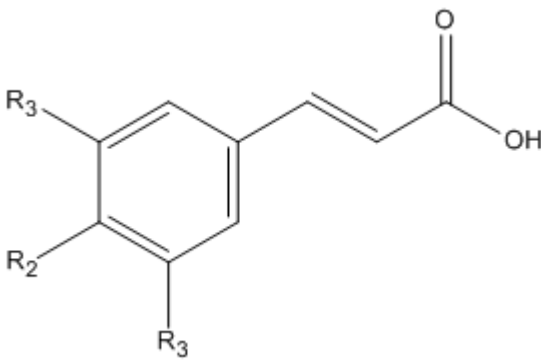
2 Fenolické látky

Jednou skupinou zlúčenín s možným terapeutickým potenciálom sú polyfenoly. Polyfenoly sa bežne vyskytujú v prírode, majú zvyčajne malú molekulovú hmotnosť a radia sa medzi sekundárne metabolity rastlín. Primárne metabolity rastlín sú dôležité pre základné životné funkcie, ako sú bunkové delenie, rast a reprodukcia. Na druhej strane sa sekundárne metabolity účastnia na adaptačných procesoch vo vzťahu k okoliu a obrane pred toxínmi, poprípade môžu mať patogénny alebo symbiotický účinok. Pri ohrození aktivuje rastlina jednu zo syntetických dráh, pričom dochádza k produkcii a sekrécii príslušných polyfenolických štruktúr. To, aká konkrétna látka bude syntetizovaná, závisí z veľkej časti na type rastliny, regióne a vplyve životného prostredia (Davies a Yáñez, 2013).

Štruktúrne sa fenolické látky skladajú z jedného alebo viacerých aromatických kruhov, na ktorých sú naviazané hydroxylové skupiny. Môžu sa vyskytovať ako jednoduché molekuly, alebo môže dochádzať k polymerizácii. Napriek štruktúrálnej rozmanitosti sa táto skupina látok často označuje ako „polyfenoly“, aj keď toto označenie nie je úplne správne, pretože nie vždy obsahuje látka viac hydroxylových skupín na aromatickom jadre a/alebo viac fenolických jadier. Väčšina fenolických látok sa prirodzene vyskytuje vo forme konjugátov s mono- alebo oligosacharidmi, alebo sa môžu vyskytovať vo forme príslušných derivátov, ako napríklad estery a metylestery.

Polyfenolické látky sa delia na celú radu podskupín, ako napríklad flavonoidy vrátane izoflavonoidov a antokyánov (viac vid' kapitola 3), stilbény, lignany, ale tiež malé fenolická kyseliny. Medzi ich dve hlavné podskupiny patria: hydroxybenzoové kyseliny a hydroxyškoricevé kyseliny (Tab. 1). Medzi hydroxybenzoové kyseliny sa radia napr.: kyselina galová, kyselina *p*-hydroxybenzoová, kyselina protokatechová, kyselina vanilová a kyselina syringová. Na druhej strane, hydroxyškoricevé kyseliny sú aromatické kyseliny s trojuhlíkovým postranným reťazcom, medzi ktoré sa radia napr.: kyselina kávová, kyselina ferulová, kyselina *p*-kumarová a kyselina sinapová (Davies a Yáñez, 2013; Balasundram et al., 2006). Deriváty kyseliny hydroxybenzoovej sa vyskytujú v potravinách rastlinného pôvodu a sú obvykle naviazané na malé jednotky, ako sú lignany alebo tanín, alebo sú naviazané na cukornú zložku či organickú kyselinu. Molekuly kyseliny hydroxyškoricevej sú často esterifikované s malými molekulami a sú naviazané na bunkových stenách alebo proteínoch (Davies a Yáñez, 2013).

Tabuľka 1: Rozdelenie polyfenolických látok.

Deriváty kyseliny hydroxybenzoovej				Deriváty kyseliny hydroxyškoricevej			
							
	R ₁	R ₂	R ₃		R ₁	R ₂	R ₃
kyselina galová	OH	OH	OH	kyselina kávová	H	OH	H
kyselina <i>p</i> -hydroxybenzoová	H	OH	H	kyselina ferulová	H	OH	OCH ₃
kyselina protokatechová	H	OH	OH	kyselina <i>p</i> -kumarová	H	OH	H
kyselina vanilová	H	OH	OCH ₃	kyselina sinapová	OCH ₃	OH	OCH ₃
kyselina syringová	OCH ₃	OH	OCH ₃				

Vlastné spracovanie.

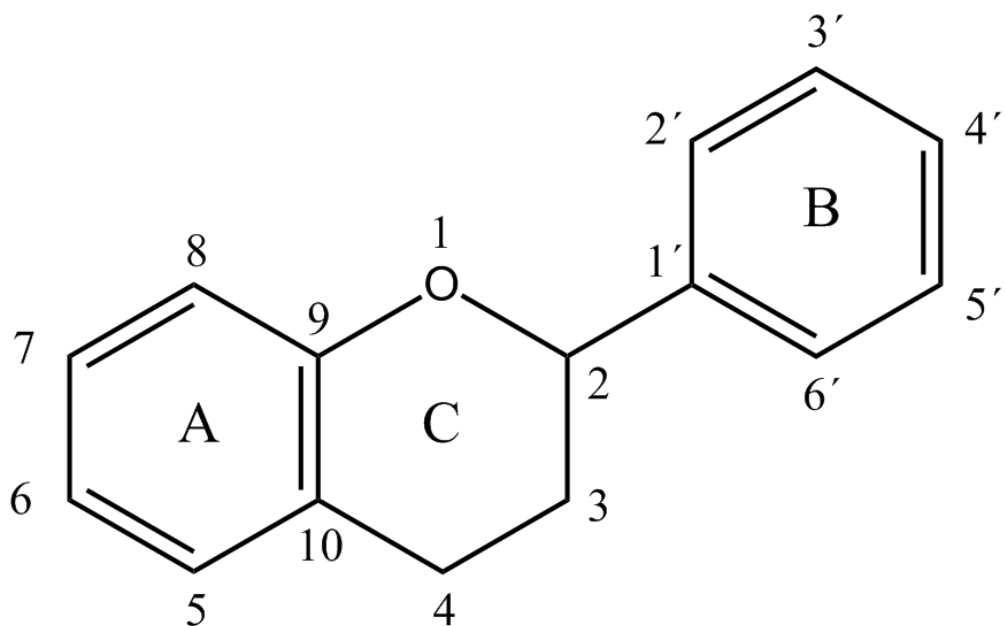
Sekundárne metabolity vznikajú z primárnymi. Na rozdiel od primárnymi metabolitov, ktoré sa v prírode vyskytujú v širokej miere, je výskyt sekundárnymi metabolitov limitovaný a viazaný na určitý taxonomický druh (Davies a Yáñez, 2013).

3 Flavonoidy

Jednou z najrozsiahljších skupín polyfenolov sú flavonoidy. V súčasnej dobe sa ich výskumu venuje veľká pozornosť, pretože flavonoidy obsiahnuté v ovocí a zelenine majú možný pozitívny účinok na ľudské zdravie. Na rozdiel od klasických vitamínov ich krátkodobé užívanie nemá tak podstatný vplyv na ľudské zdravie, avšak pri dlhodobom užívaní bolo pozorovaných viacero priaznivých účinkov na rôzne ochorenia, ako napríklad rakovina, chronické stavy vrátane kardiovaskulárnych chorôb, diabetu mellitu typu II a rôznych porúch kognitívnych funkcií. Išlo o bežné ochorenia, ktoré dnes postihujú najmä západnú populáciu (Del Rio et al., 2013).

V niektorých rastlinách sa vyskytujú vo vysokých koncentráciách, ale ich množstvo je závislé na druhu danej rastliny, a preto sa v niektorých nachádzajú len v stopových množstvách. V potrave a nápojoch, ako napríklad čierny čaj, červené víno, káva a kakao, sú obsiahnuté vo forme rôznych derivátov (Del Rio et al., 2013).

Flavonoidy sú polyfenolické zlúčeniny (Obr. 1) pozostávajúce z 15-uhlíkatého skeletu, zloženého z dvoch aromatických kruhov, ktoré sú spojené trojuhlíkovým reťazcom (Davies a Yáñez, 2013; Del Rio et al., 2013). Tento reťazec vo väčšine prípadov podlieha cyklizácii a vytvára tak heterocyklický kruh C. Neplatí to však pre chalkóny a dihydrochalkóny, u ktorých ostáva kruh C otvorený. V závislosti na oxidačnom stave kruhu C a na napojení kruhov B a C, je možné flavonoidy klasifikovať do niekoľkých skupín (Davies a Yáñez, 2013).



Obrázok 1: Základná štruktúra flavonoidov.

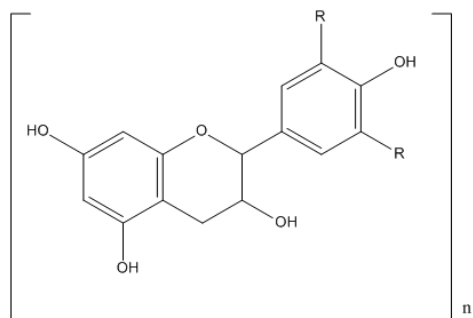
Obrázok prevzatý z (Del Rio et al., 2013).

Podľa vyššie uvedeného delenia patria medzi hlavné podskupiny flavóny, flavonoly, flavan-3-oly, izoflavóny, flavanóny a antokyány (Obr. 2). Existujú aj ďalšie skupiny flavonoidov, tie sú však v potrave zastúpené v menšej miere. Radia sa sem i vyššie zmienené chalkóny a dihydrochalkóny, ale tiež flaván-3,4-dioly a auróny (Obr. 2, Del Rio et al., 2013).

Vlastné flavonoidné jadro môže byť hydroxylované a/alebo metylované. Navyše sa flavonoidy v prírode vyskytujú hlavne vo forme glykozidov s naviazanou cukornou zložkou, alebo s iným konjugátom (napr. kyselina sírová). Menej často sa vyskytujú vo forme aglykónov. Rovnako tak sú mnohé polymerizované už v rastlinách, alebo polymerizácii podliehajú až pri spracovaní potravín (Davies a Yáñez, 2013; Del Rio et al., 2013).

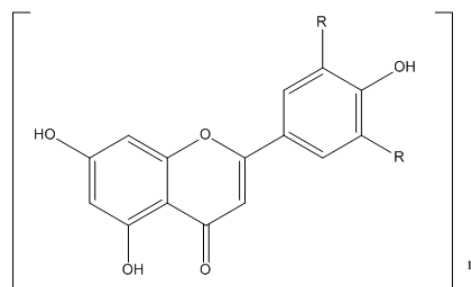
Flavan-3-oly (n=1)

Proantokyány (n>1)

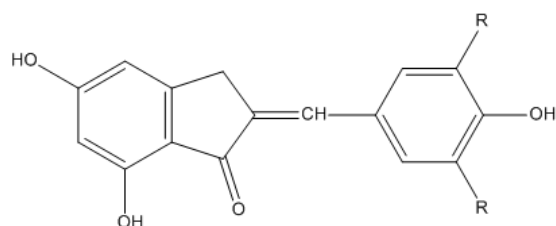


Flavóny (n=1)

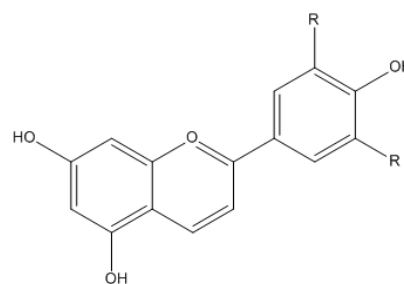
Kondenzované taníny (n>1)



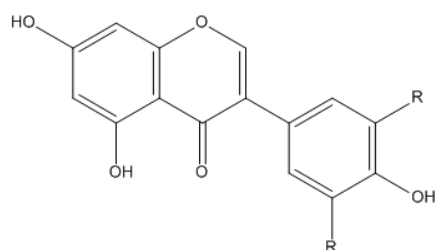
Auróny



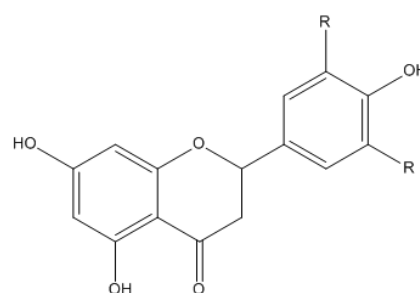
Antokyány



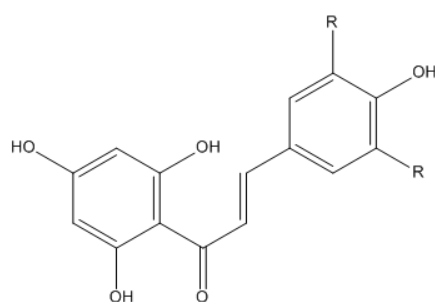
Izoflavóny



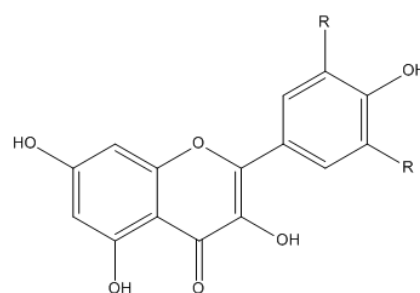
Flavanóny



Chalkóny



Flavonoly



Obrázok 2: Základné štruktúry jednotlivých podskupín flavonoidov, respektíve skupín, ktoré sa k nim tiež priradzujú.

Vlastné spracovanie podľa Davies a Yáñez, 2013.

4 Flavanóny

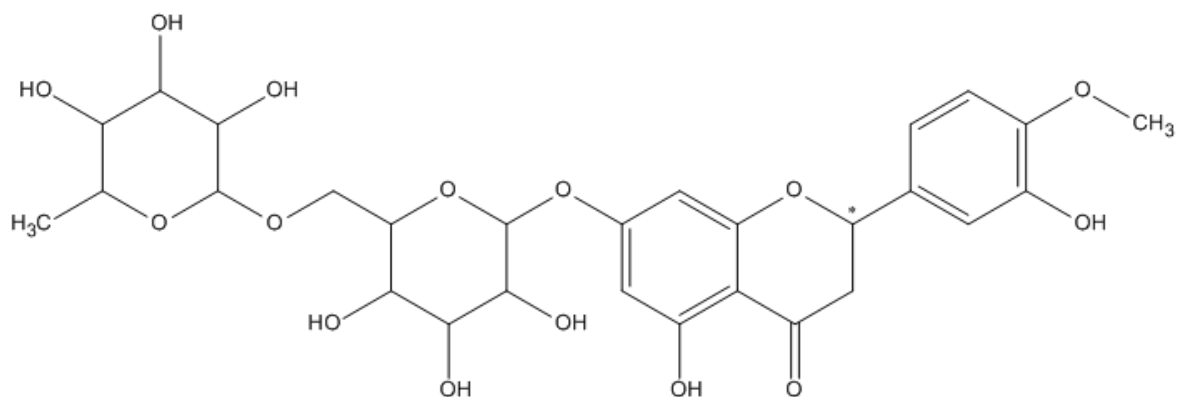
V mojej diplomovej práci som sa sústredila na flavanóny. Flavanóny sú, ako aj ostatné flavonoidy, zložené z dvoch aromatických kruhov spojených uhlíkatým reťazcom. Sú charakteristické tým, že v polohe C₂-C₃ chýba dvojitá väzba. To je dôvodom, že je uhlík C₂ chirálnym centrom. Flavanóny sú preto spolu s flaván-3-olmi, u ktorých sa v tejto polohe tiež vyskytuje absencia dvojitej väzby, opticky aktívne. Môžu sa vyskytovať v dvoch enantiomérnych formách, a to (2*S*) alebo (2*R*). V rastlinách sa vyskytujú predovšetkým ako *S*- alebo (-)-enantioméry, pričom kruhy B a C sú v α -konfigurácii (Crozier et al., 2009; Del Rio et al., 2013). Cukorná zložka je k aglykónu pripojená prevažne v pozícii C₇. Glykozidy s cukrom len na uhlíku C₄ nie sú známe a kombinácia 7,4-diglykozidov je veľmi vzácna. Ďalšie možné miesta pre naviazanie cukornej zložky sú atómy C₆ a C₈.

Flavanóny sú väčšinou vo forme hydroxylovaných, glykozylovaných alebo *O*-metylovaných derivátov. Zvyčajne ide o rutinozidy (6-*O*- α -L-ramnnozyl-D-glukozidy) a neohesperidozidy (2-*O*- α -L-ramnnozyl-D-glukozidy) naviazané v zmienenej polohe 7. Flavonoidy vo forme rutinozidov, hesperidín, narirutín a didymín, sa vyskytujú v bergamote, sladkom pomaranči, mandarínke, citróne a limetke. Na druhej strane neohesperidozidy, ako sú naringín, neohesperidín a neoeriocitrín, sa nachádzajú prevažne v grapefruitoch, horkých pomarančoch a tiež v bergamote (Davies a Yáñez, 2013; Del Rio et al., 2013; Tomás-Barberán a Clifford, 2000; Tripoli et al., 2007). Pomerne zriedkavé sú flavanóny vo forme glukozidov, ale boli nájdené v niektorých druhoch mäty, kde sa vyskytujú ako 7-glukozidy a vo veľmi malých množstvách sa vyskytujú aj v grapefruitoch, citrónoch a pomarančoch, kde sú vo forme 4'-glukozidov. Čo sa týka formy v akej sa flavonoidy vyskytujú, zaujímavé sú čeľade Moraceae, Leguminosae, Asteraceae a Canabinaceae (vrátane chmeľu, *Humulus lupulus*). Sú charakteristické obsahom prenylflavonoidov, ktoré sa tam objavujú ako aglykóny. V chmeli boli zistené prenylflavanóny (6- a 8-prenyl-naringenín, 6-geranyl-naringenín a 8-prenyl-izoxantohumol) a prenylchalkóny (xantohumol a desmetylxantohumol) (Tomás-Barberán a Clifford, 2000).

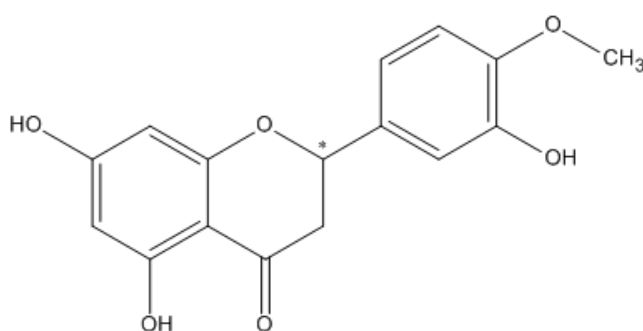
V nasledujúcom texte budú zhrnuté látky patriace do tejto skupiny, ako aj ich výskyt a vlastnosti.

Hesperidín (Obr. 3) je po chemickej stránke (+/-)-3,5,7-trihydroxy-4'-metoxyflavanón-7-ramnoglukozid so sumárnym vzorcom C₂₈H₃₄O₁₅. Jeho molekulárna hmotnosť (MW) je

610,56 g/mol a experimentálne zistená hodnota rozdeľovacieho koeficientu logP je -1,1. Po odštiepení cukrovej zložky rutinozidu, získame príslušný aglykón, hesperetín ((+/-) 3,5,7-trihydroxy-4'-metoxyflavanón). Je rovnako tak chirálny a jeho sumárny vzorec je C₁₆H₁₄O₆, MW 302,28 g/mol a logP 2,174.



hesperidín

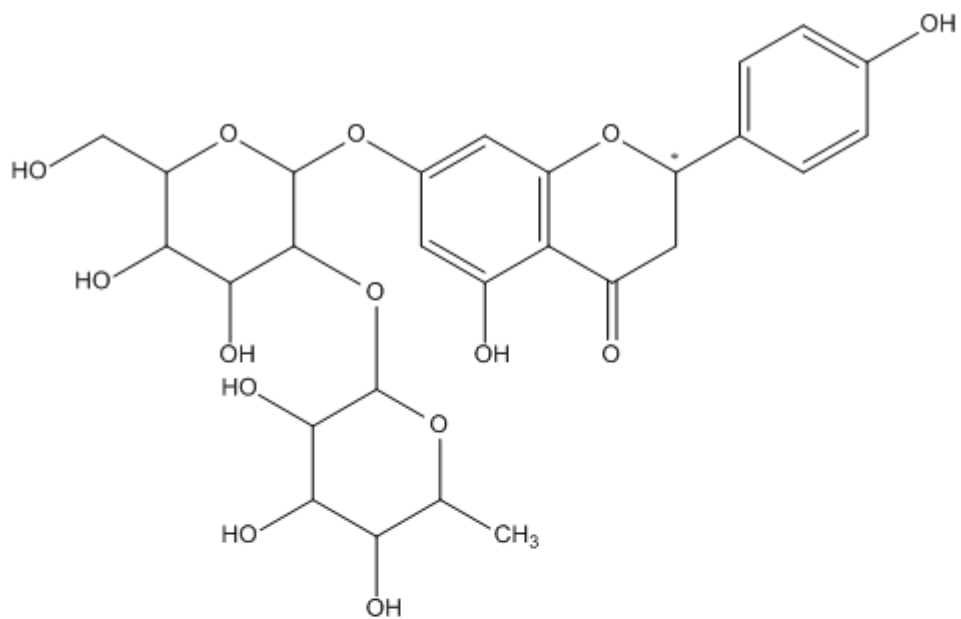


hesperetín

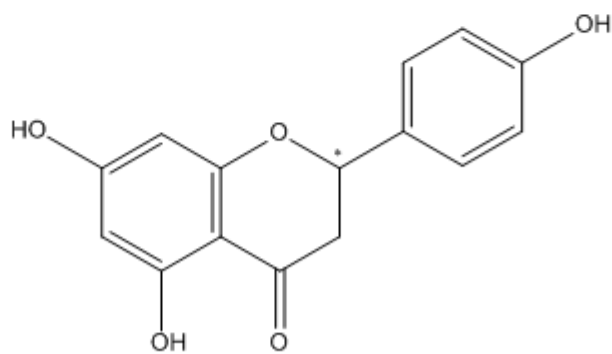
Obrázok 3: Hesperidín a hesperetín.

Vlastné spracovanie podľa Davies a Yáñez, 2013.

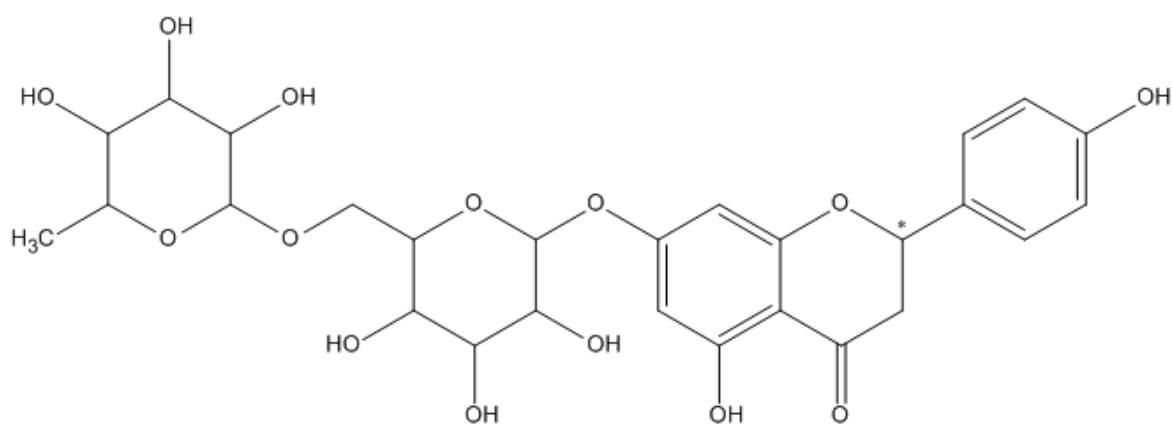
Naringín (Obr. 4) je (+/-)-4',5,7-trihydroxyflavanón-7-ramnoglukozid, ktorého sumárny vzorec je C₂₇H₃₂O₁₄. Má MW 580,53 g/mol a logP -1. Jeho aglykónom je naringenín ((+/-)-4',5,7-trihydroxyflavanón) so sumárnym vzorcom C₁₅H₁₂O₅, MW 272,25 g/mol a logP 2,211. Pripojením rutinozidu na naringenín vzniká narirutín, ktorý je po chemickej stránke naringenín-7-O-rutinozid. Jeho sumárny vzorec je C₂₇H₃₂O₁₄ a MW 580,54 g/mol.



naringín



naringenín

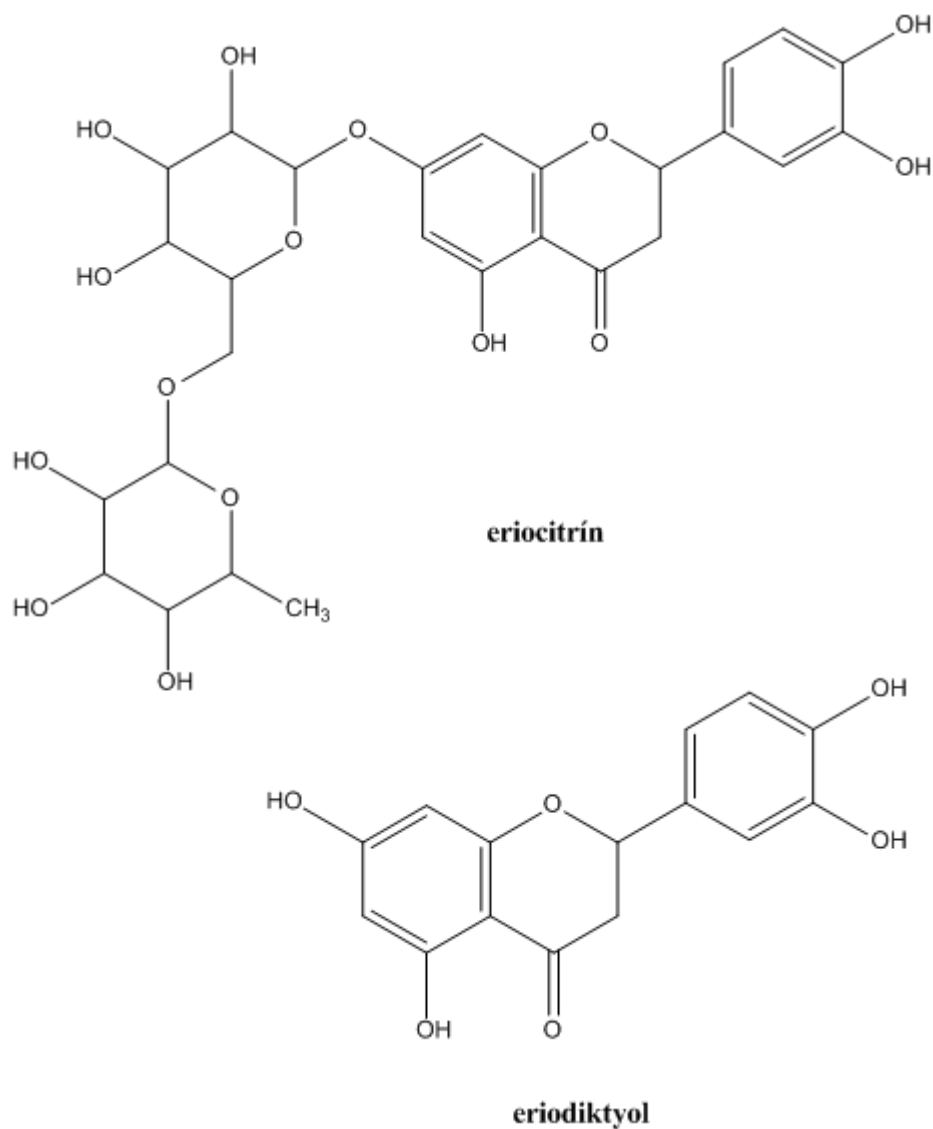


narirutín

Obrázok 4: Naringín, naringenín a narirutín.

Vlastné spracovanie podľa Davies a Yáñez, 2013.

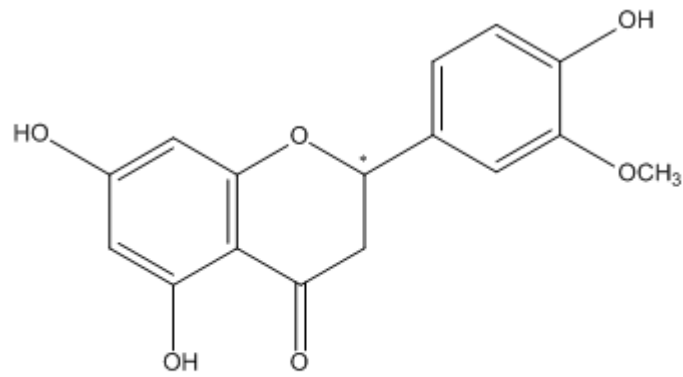
Eriocitrín (Obr. 5) je po chemickej stránke (+/-)-5,7,3',4'-tetrahydroxyflavanón-7-O-rutinozid. Jeho sumárny vzorec je $C_{27}H_{32}O_{15}$, MW je 596,53 g/mol a logP je -1,4. Po odštiepení neohesperidozidu vzniká príslušný aglykón eriodiktyol ((+/-)-5,7,3',4'-tetrahydroxyflavanón) so sumárnym vzorcom $C_{15}H_{12}O_6$. Má molekulovú hmotnosť 288,25 g/mol a logP 1,837 (Davies a Yáñez, 2013).



Obrázok 5: Eriocitrín a eriodiktyol.

Vlastné spracovanie podľa Davies a Yáñez, 2013.

Istým analógom eriodiktyolu je homoeriodiktyol (Obr. 6) (+/-)-3'-O-metyl-eriodiktyol alebo (+/-)-5,7,4'-trihydroxy-3'-metoxyflavanón. Sumárny vzorec má $C_{16}H_{14}O_6$, MW 302,27 g/mol a logP 1,1 (Davies a Yáñez, 2013).



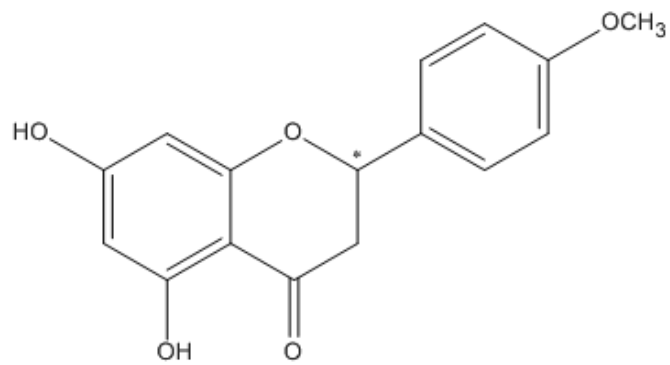
homoeriodiktyol

Obrázok 6: Homoeriodiktyol.

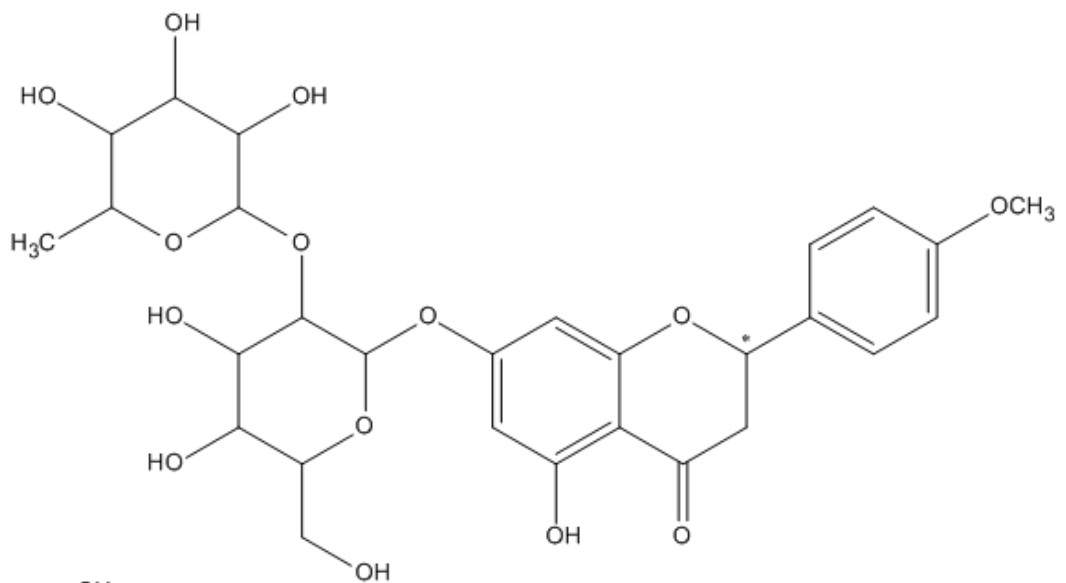
Vlastné spracovanie.

Analógom naringenínu je zasa izosakuranetín (Obr. 7), kedy v polohe 4' naringenínu je metoxylová skupina. Chemicky teda ide o (+/-)-4'-metoxy-5,7-dihydroxyflavanón. Jeho MW je 286,28 g/mol a logP je 2,3. Pripojením cukornej zložky vzniká buď poncirín (2*S*-izosakuranetín-7-neohesperidozid), alebo didymín (2*S*-izosakuranetín-7-rutinozid) (Davies a Yáñez, 2013).

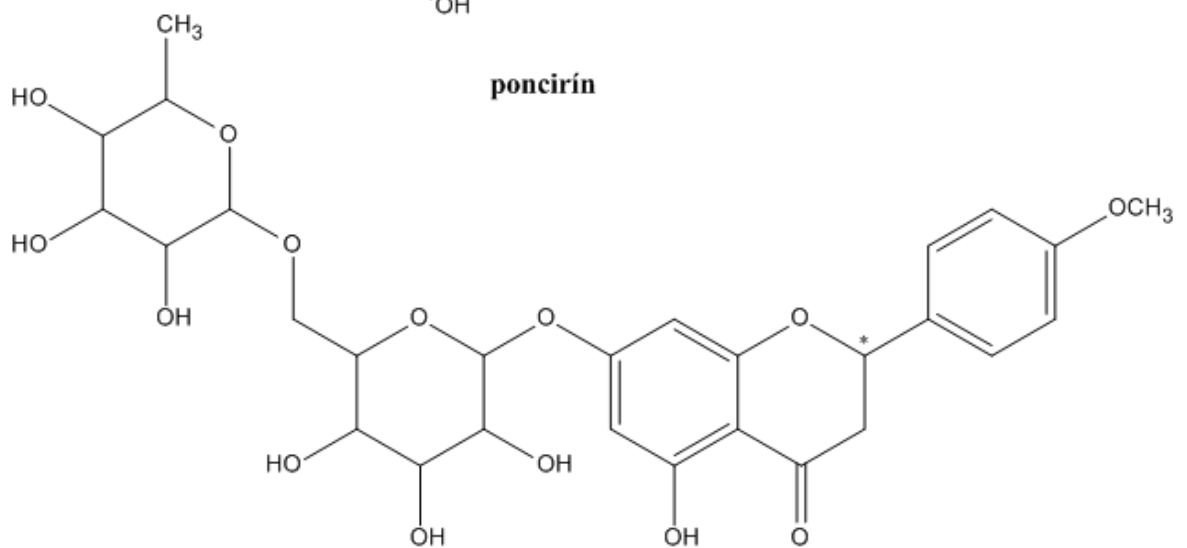
Druhým možným analógom je sakuranetín (Obr. 8), kedy hydroxylová skupina v polohe 7 naringenínu je metylovaná. Ide teda o (+/-)-5,4'-dyhydroxy-7-*O*-metoxyflavanón (Davies a Yáñez, 2013).



izosakuranetín



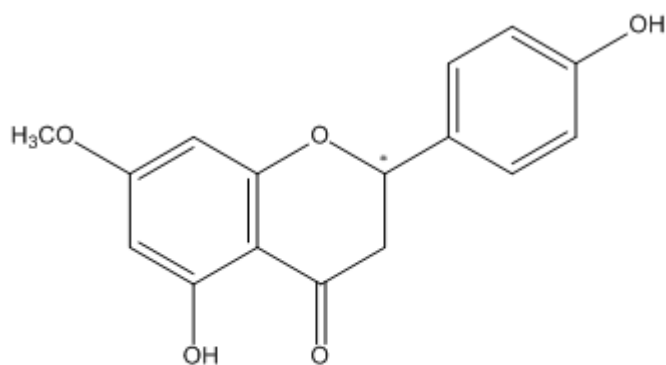
poncirín



didymín

Obrázok 7: Izosakuranetín, poncirín a didymín.

Vlastné spracovanie podľa Davies a Yáñez, 2013.



sakuranetín

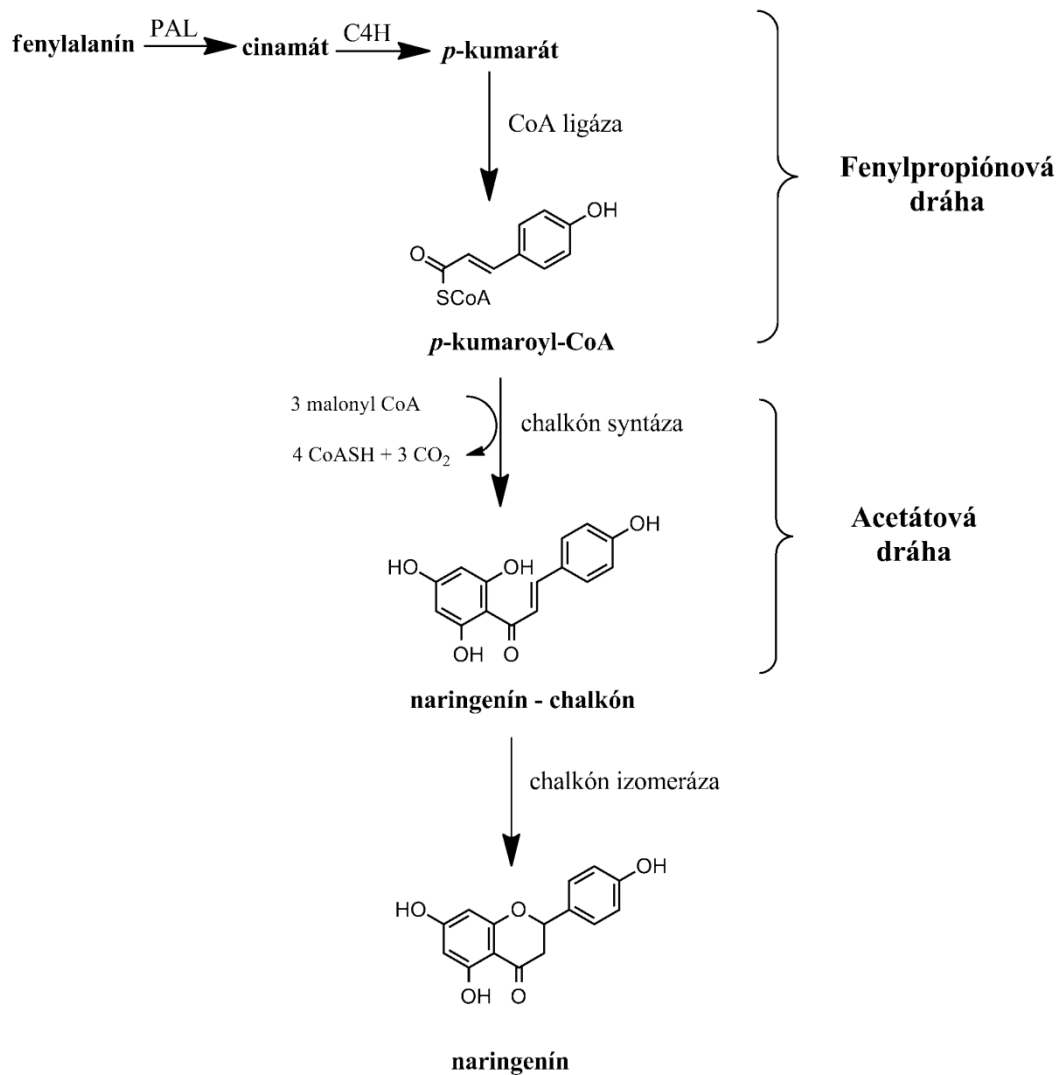
Obrázok 8: Sakuranetín.

Vlastné spracovanie podľa Davies a Yáñez, 2013.

V prílohe 1 je uvedený prehľad jednotlivých aglykónov a prehľad flavonoidných glykozidov, ktoré sa radia medzi flavanóny.

4.1 Biosyntéza flavanónov

Flavanóny spoločne s ostatnými flavonoidmi majú spoločný pôvod, a to aminokyselinu fenylalanín (Obr. 9). Fenylalanín spolu s malonylkoenzýmom-A sú prekurzormi pre vznik flavonoidov. Fenylalanín, látka fenylpropánového typu, vzniká najprv šikimátovou dráhou z kyseliny šikimovej. Prekurzormi pre vznik kyseliny šikimovej sú erytrózo-4-fosfát a kyselina 2-fosfoenolpyrohroznová. Malonylkoenzým A vzniká karboxyláciou acetylkoenzýmu A v Krebsovom cykle (Davies a Yáñez, 2013; Hollman, 2014; Spilková et al., 2016; Tomko et al., 1999).



Obrázok 9: Syntéza flavanónov z fenylalanínu a malonylkoenzýmu A.

Fenylalanín je najprv pomocou enzýmu fenylalanín amoniak lyázy (PAL) zmenený na cinamát. Cinamát 4-hydroláza (C4H) potom premení cinamát na *p*-kumarát, na ktorý sa pomocou CoA ligázy pripojí acetyl-CoA, čím vznikne cinamoyl-CoA. Tieto reakcie vedúce k vzniku cinamoyl-CoA možno súhrne označiť ako „fenylpropiónová dráha“, pretože základná štruktúra všetkých medziproduktov je aromatický kruh s napojeným trojuhlíkatým postranným reťazcom. Následne sa pomocou acetátovej dráhy pripájajú 3 molekuly malonylkoenzámu A, a tak je cinamoyl-CoA pôsobením chalkón syntázy prevedený na produkt so základnou chalkónovou štruktúrou. Tento chalkón je následne prevedený pomocou chalkón izomerázy (CHI) prevedený na príslušný flavanón, pričom primárne vzniká naringenín. Tento flavanón je zároveň východiskovou štruktúrou pre syntézu ostatných derivátov, ako sú dihydroflavonoly, flavonoly, flavóny, flaván-3-oly, flaván-3,4-dioly, izoflavonoidy a neoflavonoidy.

Vlastné spracovanie podľa Davies a Yáñez, 2013.

4.2 Výskyt flavanónov

Flavanóny sa vyskytujú prevažne v citrusových plodoch, ako sú citrón, limetka, mandarínka, sladké pomaranče a grapefruit (Tab. 2) (Davies a Yáñez, 2013; Del Rio et al., 2013; Tomás-Barberán a Clifford, 2000). Najdôležitejším zdrojom glykozylovaných flavanónov, naringínu a neohesperidínu, sú však semená bergamotu. Citrón je zasa bohatý na eriocitrín a hesperidín. Ostatné citrusové plody obsahujú len malé množstvá glykozylovaného naringínu (Bocco et al., 1998).

Naringín sa vyskytuje navyše aj v paradajkách, čerešniach, oregáne, fazuli a kakau, pričom platí, že množstvo aglykónov a glykozidov závisí od druhu zdroja. Napríklad naringín sa vo väčšej miere nachádza v citrusoch, zatiaľ čo paradajky obsahujú väčšie množstvo aglykónu naringenínu (Minoggio et al., 2003). Eriocitrín sa vyskytuje v citróne, tamarinde, mäte, oregáne, fenykli a v šípkach (Davies a Yáñez, 2013). Izosakuranetín je dôležitou zložkou propolisu a nachádza sa čeľadiach ako napríklad Asteraceae, Combretaceae, Eupatorieae a Rutaceae (Davies a Yáñez, 2013).

Tabuľka 2: Obsah flavanónov v jednotlivých citrusových plodoch.

	Sladký pomaranč	Horký pomaranč	Citrón	Grapefruit	Mandarínka
Hesperidín	+++	-	+++	stopy	+++
Naringín	-	+++	-	+++	-
Narirutín	+	-	-	++	++
Neohesperidín	-	++	-	stopy	-
Eriocitrín	-	-	++	-	-

Vlastné spracovanie podľa Tomás-Barberán a Clifford, 2000.

Napriek tomu, že citrusy a produkty z nich sú hlavným zdrojom flavanónov, ich množstvo je rozdielne v šťave a pletivách (Tomás-Barberán a Clifford, 2000; Tripoli et al. 2007). Vyššie koncentrácie flavanónov obsahujú pevné časti plodu než šťava. Šupka a semená sú najbohatšie na obsah flavonoidov, pričom v šupke sa ich nachádza viac. Naringín bol nájdený v šupke aj semenách citrónu a v semenách mandarínky, na rozdiel od šťavy, ktorá naringín neobsahovala. Šťava získaná zo sladkých pomarančov nikdy neobsahuje naringín a detekcia jeho prítomnosti sa využíva pri odhaľovaní falšovania pri jej výrobe (Tripoli et al., 2007).

Naringín sa v grapefruitovej šťave nachádza v množstve 295-377 mg/l, zatiaľ čo albedo obsahuje 13-16 g/kg naringínu. Šupka citrusov (albedo+flavedo) má tiež značný obsah flavanónov. Šupka grapefruitov obsahuje naringín 1-16 g/kg čerstvej váhy, šupka horkých pomarančov obsahuje neohesperidín 0,7-31 g/kg čerstvej váhy a šupka sladkých pomarančov obsahuje hesperidín 4,6-12,8 g/kg čerstvej váhy (Tomás-Barberán a Clifford, 2000).

Pomer jednotlivých obsahových látok je rozdielny aj v jednotlivých pevných častiach plodu (Tab. 3). Napríklad semená v citróne obsahujú hlavne eriocitrín a hesperidín, zatiaľ čo hlavné zložky šupky sú neoeriocitrín, naringín a neohesperidín. Rovnako tak rozdielna môže byť aj koncentrácia. Kým koncentrácia neoeriocitrínu a naringínu v šupke je približne rovnaká, tak semená sú asi 40-krát bohatšie na obsah eriocitrínu v porovnaní s naringínom (Bocco et al., 1998).

Tabuľka 3: Obsah glykozylovaných flavanónov v metanолоých extraktoch jednotlivých citrusových plodov.

extract	ERI	NER	NAT	NAR	HES	NEH	total
seeds							
mandarin SA		0.07 ± 0.001	0.04 ± 0.01	0.02 ± 0.005	0.13 ± 0.02		0.26
sweet orange IT			0.13 ± 0.02		0.28 ± 0.04		0.41
sweet orange SA			0.07 ± 0.01	0.01 ± 0.000	0.22 ± 0.02		0.30
pummelo SA			0.12 ± 0.01	0.29 ± 0.04	tr	0.04 ± 0.000	0.45
líme SA			tr	0.02 ± 0.000	0.02 ± 0.002		0.04
bergamot IT	0.23 ± 0.01	0.51 ± 0.02		1.43 ± 0.05		1.11 ± 0.09	3.28
lemon IT	1.61 ± 0.19			0.04 ± 0.006	0.50 ± 0.03		2.15
sour orange IT				0.77 ± 0.11		0.25 ± 0.01	1.02
peels							
sour orange IT		3.80 ± 0.27	0.25 ± 0.05	10.97 ± 0.38	0.66 ± 0.11	6.62 ± 0.54	22.30
lemon IT		6.12 ± 0.07		6.06 ± 0.14		4.37 ± 0.22	16.55
bergamote IT	tr	4.98 ± 0.46		4.55 ± 0.33		3.92 ± 0.37	13.45

^a ERI, eriocitrin; HES, hesperidin; NAR, naringin; NAT, narirutin; NEH, neohesperidin; NER, neoeriocitrin IT, Italy; SA, South Africa; tr, traces.

Tabuľka prevzatá z Bocco et al., 1998.

Pri príprave čerstvých „single-strength“ a koncentrovaných pomarančových štiav ostávajú zvyšky dužiny, ktoré môžu byť extrahované vodou, čím sa získa tzv. „pulp-wash“. „Pulp-wash“ má vyššiu koncentráciu hesperidínu a narirutínu ako šťava a môže byť použitá na výrobu nápojov, avšak toto použitie je v mnohých krajinách zakázané kvôli znehodnocovaniu čerstvých džúsov. Z toho možno usúdiť, že konzumáciou citrusových plodov a ich výrobkov prijímame podstatné množstvá flavanónov, ale okrem vyššie zmienených aspektov, majú na výskyt a zloženie vplyv aj miesto pestovania jednotlivých odrôd, pôvod či zrelosť plodov (Tab. 4, Tomás-Barberán a Clifford, 2000).

Tabuľka 4: Obsah flavanónov v jednotlivých citrusových šťavách.

Juice type	Flavanones (mg l ⁻¹)					Total bitter	Grand total	Reference
	Hesperidin	Neohesperidin	Narirutin	Eriocitrin	Naringin			
<i>Sweet orange</i>	487–584						64	
Valencia	215–227						64	
Hand-squeezed	235–407		30–84				65	
Unpasteurised	122–260		18–65				66	
Fresh, hand-squeezed, various cultivars	122–254		18–65				67	
Unpasteurised	166–226							Tomás-Barberán FA, unpublished
Hand-squeezed, Navel	528		Trace					Tomás-Barberán FA, unpublished
Fresh, hand-squeezed Brazilian, various cultivars	104–537		16–80				15	
Frozen concentrate, Brazilian, after dilution to 12° Brix	531–690		62–84				15	
Frozen concentrated pulp-wash, Brazilian, after dilution to 12° Brix	1089–1200		154–239				15	
<i>Lemon</i>								
Hand-squeezed	84–196			47–94			65	
<i>Grapefruit</i>								
Hand-squeezed			33–161		113–481		65	
Various cultivars			23–124		73–419		67	
					295–377		5	
<i>Pumelo</i>					40–144		67	
<i>Grapefruit</i> × <i>pumelo</i> hybrids						440–495	500–1000	69
<i>Sour orange</i>		97–209			133–362		67	
<i>Mandarin</i>	80–191		150–249				67	

Tabuľka prevzatá z Tomás-Barberán a Clifford, 2000.

Niektoré druhy mäty, ktorá sa používa ako kuchynská bylinka, obsahujú rovnako flavanóny, a to v množstve 0,3-3,3 g/kg suchej váhy. Nájdené boli aj v pive a bylinkových čajoch, ktoré obsahujú chmeľ. Vyskytujú sa tam v inej forme ako zvyčajne. Ich profil je rôzny a celkový obsah flavanónov/chalkónov sa pohybuje od nedetekovateľného množstva až do 4 mg/l v pive predávanom v USA (Tomás-Barberán a Clifford, 2000).

4.3 Chemické a fyzikálne vlastnosti flavanónov

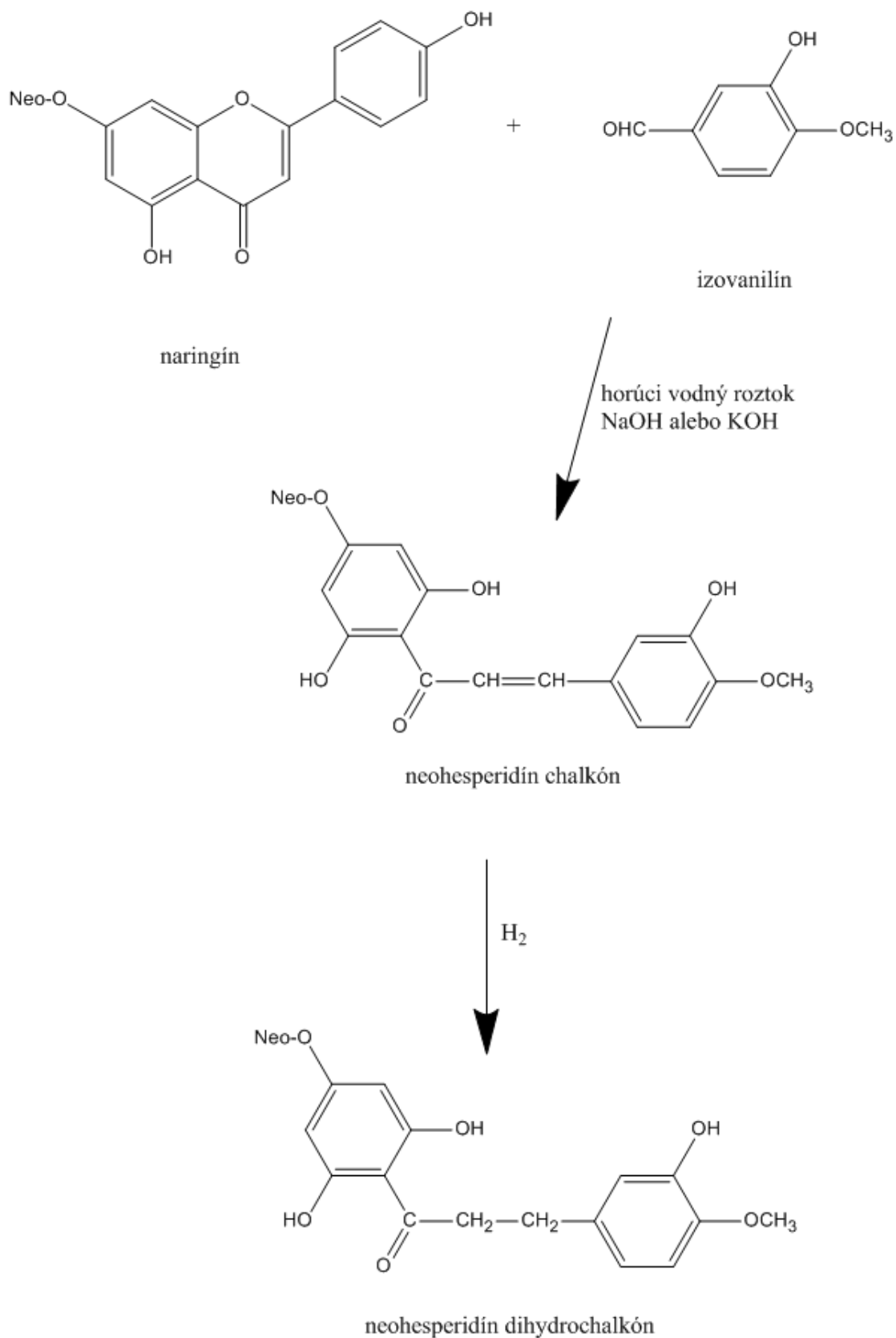
Cukorná zložka určuje chuť. Flavanóny vo forme rutinozidu sú bez chuti, na rozdiel od flavanón neohesperidozidov, ktoré sú výrazne horké a sú zodpovedné za charakteristickú chuť grapefruitov obsahujúcich naringenín-7-*O*-neohesperidozid (naringín) a horkých pomarančov, ktoré obsahujú hesperetín-7-*O*-neohesperidozid (neohesperidín) (Del Rio, 2013). Pôsobením alkálií a následnou hydrogenáciou môžu byť horké flavanóny zmenené na príslušné dihydrochalkóny (Obr. 10). Neohesperidín dihydrochalkón má intenzívnu sladkú chuť a bol schválený Európskou úniou a U.S. Food and Drug Administration (FDA) ako potravinová prísada, je dokonca až 20-krát sladší ako sacharín. Používa sa ako

nízkokalorické sladidlo v mnohých potravinách v koncentráciách 10-400 mg/kg (alebo mg/l), alebo ako prísada upravujúca chuť, a to v koncentráciách až 5mg/kg (Gentili a Horowitz, 1968; Tomás-Barberán a Clifford, 2000). Východisková látka pre syntézu neohesperidín dihydrochalkónu môže byť neohesperidín, ale tento spôsob nie je veľmi výhodný kvôli vysokej cene neohesperidínu a jeho relatívnemu nedostatku. Ako východiskové látky sa môžu použiť aj iné prirodzene sa vyskytujúce flavonón glykozidy. Zistilo sa, že vhodným kandidátom je naringín, ktorý je relatívne lacný a dostupný, pretože je vedľajším produktom pri komerčnom spracovaní grapefruitov (Gentili a Horowitz, 1968).

Horký pomaranč je dobrým zdrojom naringínu a neohesperidínu, ktoré sa môžu použiť na výrobu sladidiel (Tripoli et al., 2007). Naringín sa za pôsobenia horúceho vodného roztoku alkálií (10-25% NaOH alebo KOH) v nadbytku izovanilínu mení na neohesperidín chalkón. Tento medziprodukt je následne v prítomnosti vodíku a katalyzátoru (platiny alebo paládia) prevedený na príslušný dihydrochalkón (Gentili a Horowitz, 1968).

Zaujímavý z hľadiska chuti je aj homoeriodiktyol, ktorý sa komerčne dlhé roky používal vo farmaceutickom priemysle na korekciu chute. No v niektorých prípadoch ho však nemožno použiť pre ako remediens v potravinách alebo vo farmácii, pretože je až príliš aromatický (Ley et al., 2005).

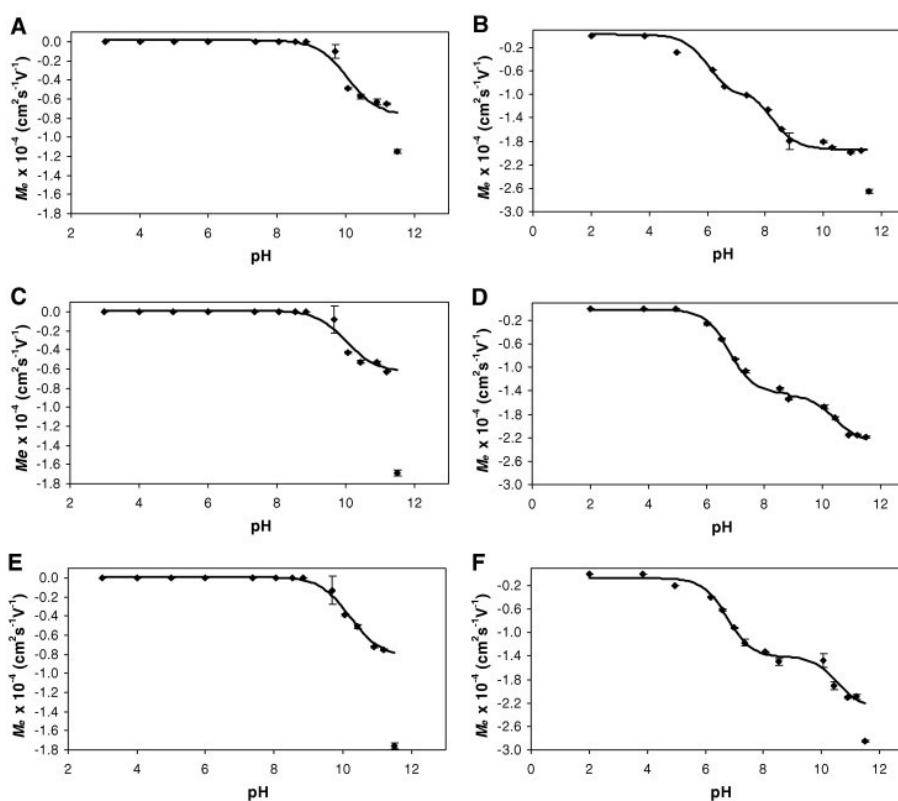
Flavanóny majú tendenciu zrážať sa, hlavne hesperidín. Zrazeniny sa tvoria nie len v priebehu extrakcie materiálu pre analýzu, ale aj v priebehu spracovania citrusových plodov. Obsah naringínu klesol z 600 na 400 mg/kg po tom, čo bol grapefruit olúpaný, narezaný a schladený na 4°C počas 7 dní. Zistilo sa, že to mohlo byť spôsobené vykryštalizovaním naringínu. Množstvo flavanónov súvisí taktiež s tým, akou technikou je konkrétna šťava pripravená (ručne lisovaná, nepasterizovaná ap.), ale aj s odrodou jednotlivých citrusov (Tomás-Barberán a Clifford, 2000).



Obrázok 10: Konverzia horkých flavanónov na príslušné dihydrochalkóny sladkej chuti.

Vlastné spracovanie podľa Gentili a Horowitz, 1968.

Stupeň ionizácie má vplyv na prechod zlúčenín cez membrány. U troch flavonoidných glykozidov (diosmín, hesperidín a naringín) a ich aglykónov sa stanovovali ionizačné krivky v závislosti na pH (Obr. 11). Značné množstvo aglykónov je ionizovaných pri fyziologickom pH, zatiaľ čo glykozidy sú v neutrálnej forme. Pri skúmaní prestupu cez vrstvu buniek (použité boli modely Caco-2 a PAMPA) sa zistilo, že žiadne flavonoidné glykozidy neprestúpili vrstvu buniek, ale naopak aglykóny áno. Pri porovnávaní ionizačných kriviek aglykónov a glykozidov sa očakávalo, že aglykóny budú pri pH 7,4 prechádzať cez bariéru v menšom množstve, pretože sú viac ionizované. No nebolo tomu tak. Tento opačný výsledok je pravdepodobne spôsobený menšou molekulovou hmotnosťou aglykónu a tiež jeho vyššou lipofilitou oproti glykozidom, čo umožňuje lepší prestup cez biologické membrány pomocou pasívnej difúzie (Day et al., 2000; Serra et al., 2008).



Obrázok 11: Ionizačné krivky získané kapilárnou elektroforézou pre diosmín (A); diosmetín (B); hesperidín (C); hesperetín (D); naringín (E); naringenín (F).

Os X: pH; os Y: efektívna pohyblivosť, vid' príloha č.2.

Obrázok prevzatý z Serra et al., 2008.

5 Farmakokinetika flavonoidov

Farmakokinetika je disciplína, ktorá sa zaoberá časovými a priestorovými zmenami rôznych xenobiotík v živých organizmoch. Skúma rýchlosť a rozsah štyroch hlavných procesov, ktoré ovplyvňujú osud podaného xenobiotika a sú to absorpcia, distribúcia, metabolizmus a eliminácia, súhrne tiež označované ako AMDE. Farmakokinetika sa obvyčajne zameriava na pohyb liečiv v organizme, ale táto disciplína môže byť aplikovaná aj na iné zlúčeniny, ktoré majú potenciálny farmakologický účinok, ako napr. vitamíny, hormóny, toxíny a v neposlednej rade aj rastlinné metabolity – flavonoidy (Davies a Yáñez, 2013).

5.1 Absorpcia a metabolizmus v tenkom čreve

Absorpcia je proces, prostredníctvom ktorého flavonoidy po perorálnom podaní vstupujú do krvného riečiska. Aby sa mohli flavonoidy vstrebať, musia byť najprv uvoľnené z rastlinných častí, ktoré prijímame potravou. Tomu predchádza žuvanie, pôsobenie tráviacich štiav v gastrointestinálnom trakte a nakoniec mikroorganizmy v čreve. To, do akej miery sa budú látky uvoľňovať a absorbovať, závisí na fyzikálne-chemických vlastnostiach, ako napr. molekulová hmotnosť, konfigurácia, lipofilita, rozpustnosť, pKa. Rýchlosť absorpcie a dostupnosť v mieste účinku sú predpokladom, že látka môže byť biologicky účinná a je „biologicky dostupnou“. Podľa FDA, je definícia biologickej dostupnosti nasledovná: „rýchlosť a rozsah, v ktorom je aktívna zložka alebo aktívna časť absorbovaná z lieku a bude dostupná v mieste účinku“ (Davies a Yáñez, 2013; Hollman, 2004). Flavonoidy síce majú zdravotné tvrdenia, ale je známe, že majú veľmi nízku biologickú dostupnosť, ktorá sa môže výrazne líšiť v rámci skupín flavonoidov, rovnako tak sa môžu navzájom líšiť jednotlivé zlúčeniny v určitej skupine. Relatívne renálne vylučovanie metabolitov antokyanínov a daidzínu, vyjadrené ako percentuálny podiel z prijatého množstva, bolo 0,3% a 43%, čo poukazuje na rôznu biologickú dostupnosť v rôznych skupinách flavonoidov. No biologická dostupnosť flavonoidov sa môže líšiť aj medzi jednotlivými konjugátmi vrámci jednej skupiny (Hollman et al., 1999; Kanaze et al., 2007; Thilakarathna et al., 2013).

Flavonoidy, ktoré prijímame potravou sú väčšinou vo forme glykozidov. Pri spracovaní potravín, ako je varenie, zväčša nedochádza k štiepeniu a uvoľňovaniu aglykónov. Vo

všeobecnosti prijímame ale flavonoidy vo forme aglykónov, v porovnaní s glykozidmi, len vo veľmi malých množstvách (Day et al., 1998). Kľúčovú úlohu pre rozsah biologickej dostupnosti zohráva práve cukorná zložka. Pozícia a povaha naviazaného cukru ovplyvňuje vstrebávanie flavonoidov v tenkom čreve, a tým aj výslednú biologickú dostupnosť. Keďže sú polyfenolické glykozidy hydrofilné látky, nemôžu prestupovať cez biologické membrány pasívnou difúziou. Predpokladalo sa, že tieto glykozidy sa vstrebávajú až v hrubom čreve, kde sú podrobené deglykozyllácii za účasti črevnej mikroflóry. Na druhej strane, túto teóriu vyvracia fakt, že niektoré aglykóny sa vstrebávajú už v žalúdku a v súčasnosti sa za hlavné miesto absorpcie pokladá tenké črevo. V porovnaní s aglykónmi a flavanónmi vo forme glukozidov, sú príslušné glykozidy s naviazanou ramnozou absorbované len veľmi málo (Ameer et al., 1996; Day et al., 1998; Del Rio et al., 2013; Kanaze et al., 2007; Németh et al., 2003; Nielsen et al., 2006).

V štúdií s kvercetínom sa zistilo, že absorpcia rutínu (kvercetín-3-*O*-glykozyll-ramnóza) je v porovnaní s kvercetín-4-*O*-glukozidom a samostatným aglykónom nižšia. To značí, že flavonoidy vo forme glukozidu sú absorbované už v tenkom čreve, zatiaľ čo flavonoidy vo forme rutinozidu sú absorbované v hrubom čreve po odštiepení cukornej zložky (Hollman et al., 1999; Thilakarathna et al., 2013).

Pre potvrdenie boli vykonané štúdie s flavanónmi, ktorých štruktúra bola enzymaticky modifikovaná tak, aby sa získali príslušné flavanón-glukozidy. Obe štúdie boli dvojito zaslepené, randomizované, crossover a zúčastnilo sa ich 16 zdravých dobrovoľníkov. V určitých časových intervaloch boli subjektom odoberané vzorky krvi a moču. Výsledky boli porovnané s výsledkami získanými po požití flavanónov vo forme rutinozidov (Tab. 5-6, Bredsdorff et al., 2010; Nielsen et al., 2006).

V prvom prípade išlo o podávanie pomarančového džúsu, ktorý obsahoval narirutín (naringenín-7-*O*-rutinosid), podávanie džúsu upraveného α -ramnozidázou, čo viedlo k získaniu naringenín-7-glukozidu (Bredsdorff et al., 2010). V druhom prípade bola subjektom podávaná jedna z troch pomarančových šťiav, tzv. „nízko-dávkový režim“, pomarančová šťava obsahujúca deaktivovanú hesperidinázu, aby bol dosiahnutý tzv. „vysoko-dávkový režim“ a upravená pomarančová šťava pomocou enzýmu hesperidinázy, aby bol získaný hesperetín-7-glukozid (Nielsen et al., 2006).

Biologická dostupnosť naringenínu, vyjadrená ako plocha pod krivkou (AUC), bola u všetkých subjektov po podaní šťavy upravenej α -ramnozidázou približne 4-krát vyššia, v

porovnaní s konzumáciou neupravenej šťavy obsahujúcej naringenín-7-rutinosid. Podobne to bolo s maximálnou plazmatickou koncentráciou, ktorá bola 5,4-krát vyššia. T_{max} klesol z 311 na 93 min v porovnaní s neupravenou šťavou (Bredsdorff et al., 2010).

Pri skúmaní hesperetínu, bola AUC v „nízko-dávkovom režime“ asi 2-krát nižšia než po podávaní hesperetín-7-glukozidu, zatiaľ čo AUC vo „vysoko-dávkovom režime“ je zrovnateľná s AUC po podávaní hesperetín-7-glukozidu. Pri porovnaní farmakokinetických kriviek grafu závislosti plazmatickej koncentrácie hesperetínu na čase sa zistilo, že pri „nízko-dávkovom režime“ a pri „hesperetín-7-glykozid režime“ sa plazmatické koncentrácie po 10 hodinách znížia skoro na nulu, zatiaľ čo pri „vysoko-dávkovom režime“ tomu tak nie je. C_{max} po podaní hesperetín-7-glukozidu bola asi 4-krát vyššia, v porovnaní s „nízko-dávkovým režimom“, a asi 1,5-krát vyššia oproti „vysoko-dávkovému-režimu“. Hoci maximálne koncentrácie pri „nízko- a vysoko-dávkovom režime“ boli značne rozdielne, čas, za ktorý boli tieto C_{max} dosiahnuté (T_{max}), bol veľmi podobný. Na rozdiel od T_{max} hesperetín-7-glukozidu, ktorý bol mnohonásobne nižší. To potvrdzuje fakt, že flavonoidy obsahujúce rutinozid sú absorbované až v distálnych častiach tráviacej sústavy za účasti črevnej mikroflóry (Nielsen et al., 2006).

Tabuľka 5: Farmakokinetické parametre celkového naringenínu po podaní modifikovanej a nemodifikovanej šťavy ľudom.

	narirutín	naringenin-7-glukozid
počet testovaných subjektov	16	15
dávka (mg/kg)	0,83	0,52
AUC (0-600 min, $\mu\text{mol/l} \cdot \text{min}$)	18	70
C_{max} ($\mu\text{mol/l}$)	0,12	0,77
T_{max} (min)	311	93
relatívne renálne vylučovanie (%)	7	47

Vlastné spracovanie podľa Bredsdorff et al., 2010.

Tabuľka 6: Farmakokinetické parametre celkového hesperetínu po podaní modifikovanej a nemodifikovanej šťavy ľud'om.

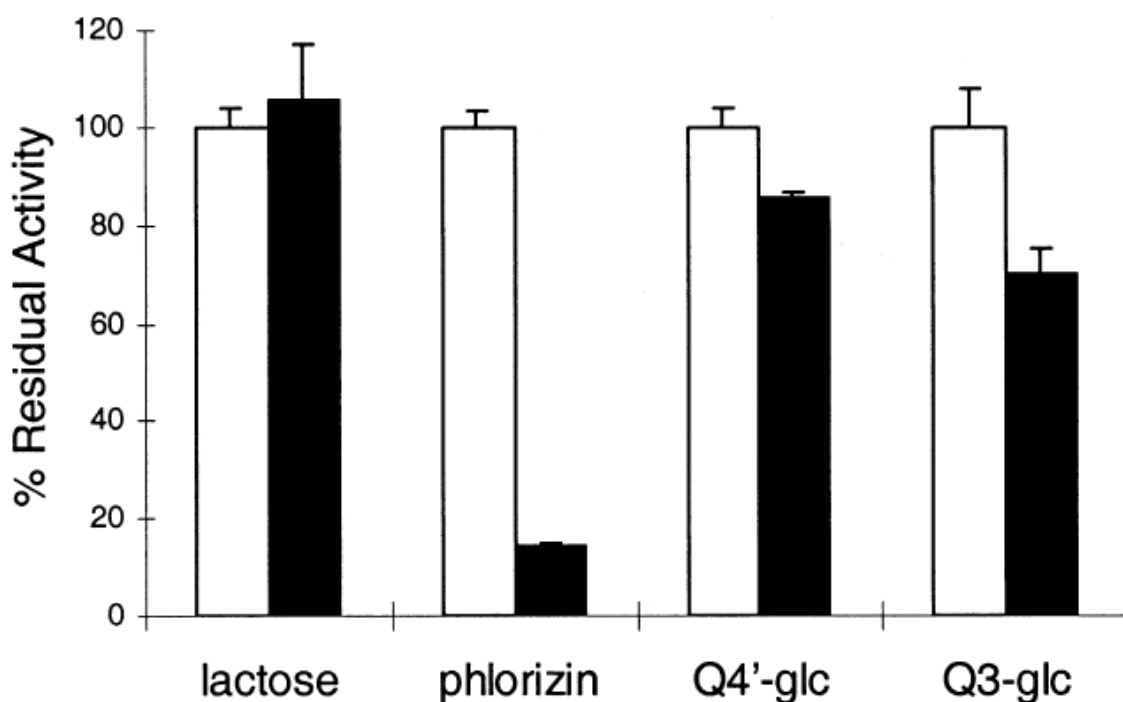
	hesperidín		hesperetín-7-glukozid
	„nízko-dávkový režim“	„vysoko-dávkový režim“	
počet testovaných subjektov	10	12	10
dávka (mg/kg váhy)	0,93	2,92	1,21
AUC (0-10 h, mmol/l . h)	1,16	4,16	3,54
C _{max} (mmol/l)	0,48	1,05	2,6
T _{max} (h)	7	4,4	0,6
relatívne renálne vylučovanie (%)	4,06	8,9	14,4

Vlastné spracovanie podľa Nielsen et al., 2006.

Vyššie uvedené výsledky, ale aj závery štúdií Ameer et al. (1996) a Kanazeho et al. (2007) potvrdzujú, že aglykóny (hesperetín a naringén) sú viac biologicky dostupné ako ich príslušné glykozidové formy (hesperidín a naringín). Absorpcia čistých aglykónov je po perorálnom podaní omnoho rýchlejšia (už 20 min po podaní) než absorpcia flavonoidných glykozidov, pretože je vynechaný krok odštiepenia cukornej zložky v tráviacom trakte, a hesperidín a naringén musia byť najprv v tráviacom trakte hydrolyzované.

Z predchádzajúceho textu vyplýva, že významnú úlohu zohráva deglykozylácia prostredníctvom enzýmov. V tenkom čreve cicavcov sa nachádza skupina enzýmov, β -glukozidázy. Patria medzi ne: glukocerebrozidáza, laktáza-florizín hydroláza (LPH) a pyridoxín – glukozid hydroláza. S výnimkou LPH, všetky tieto enzýmy pôsobia intracelulárne. Aby sa mohli podieľať na metabolizme flavonoidov, musia byť najprv tieto látky transportované do buniek v nezmenenej forme flavonoidných glykozidov. LPH sa však nachádza na luminálnej strane kartáčového lemu v tenkom čreve a môže ovplyvňovať absorpciu prijatých glykozidov. LPH má širokú substrátovú špecifickosť. V štúdiách sa používajú ovčia, ľudská, potkania, hovädzia, opičia a prasacia LPH, pričom všetky majú zrovnateľné účinky. Všetky tieto LPH majú dve katalytické miesta. Jedno pre hydrolýzu laktózy a druhé slúži pre hydrolýzu hydrofóbnejších substrátov, ako napr. florizín. Zablokovaním miesta zodpovedného za hydrolýzu florizínu pomocou špecifického

inhibítora 2F-DNPglc, sa dokázalo, že druhé katalytické miesto je zodpovedné za hydrolýzu flavonoidných glykozidov (Obr.12). 2F-DNPglc sa kovalentnou väzbou viaže na zvyšky glutámovej kyseliny v aktívnom centre. LPH hydrolyzuje hlavne hydrofilné substráty, ale môže štiepiť aj aglykóny. Dôležitá je správna orientácia voľnej hydroxylovej skupiny voči aktívnemu centru enzýmu, aby mohli vzniknúť vodíkové väzby (Day et al., 2000).



Obrázok 12: Špecifická inaktivácia katalytického miesta pre hydrolýzu florizínu.

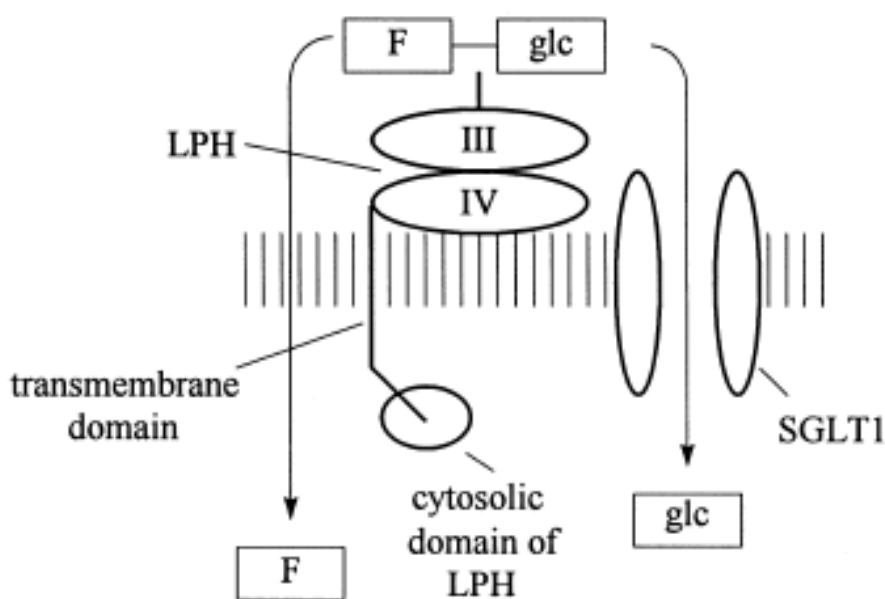
Hydrolytická aktivita je vyjadrená vo vzťahu k nemodifikovanej LPH pre laktózu, florizín, kvercetín-4'-glukozid a kvercetín-3-glukozid. Biele stĺpce: preinkubácia LPH bez špecifického inhibítora 2F-DNPglc; tmavé stĺpce: preinkubácia LPH s 2F-DNPglc (0,15mM, 10 min). Čiarky nad stĺpcami predstavujú štandardnú odchýlku pre najmenej tri opakovania.

Obrázok prevzatý z Day et al., 2000.

Prechod hydrofilných molekúl, ako sú glykozidy, cez biologické membrány je veľmi nepravdepodobný a difúzií musí preto predchádzať hydrolýza β -glukozidov, alebo je potrebný špecifický transportný mechanizmus. LPH štiepi flavonoid- O - β -glukozidy na príslušný aglykón, ktorý je značne lipofilnejší. Výsledkom zvýšenej lipofily je prestup

látky cez biologické membrány pomocou pasívnej difúzie. Rýchlosť tohto procesu je ovplyvnená saturáciou plazmy flavanónmi (Day et al., 2000; Nielsen et al., 2006).

Alternatívnym hydrolytickým krokom je pôsobenie cytosolickej β -glukozidázy (CBG) vnútri buniek. Aby CBG mohla pôsobiť, musia byť polárne glykozidy najprv transportované do enterocytov za účasti sodíkovo – glukózového prenášača (SGLT1). Možný mechanizmus absorpcie je naznačený na Obr. 13 (Day et al., 1998; Del Rio et al., 2013).



Obrázok 13: Alternatívny mechanizmus absorpcie v tenkom čreve.

Domény III a IV enzýmu LPH zobrazené ako transmembránové proteíny, pričom uvoľnený aglykón (F) prestupuje cez membránu pasívnou difúziou a uvoľnená glukóza (glc) je prenášaná pomocou sodíkovo – glukózového prenášača (SGLT1).

Obrázok prevzatý z Day et al., 1998.

Spomínaná skupina enzýmov β -glukozidáz, ktoré sa podieľajú na deglykozylácii prijatých flavanónov, sa okrem tenkého čreva nachádza aj v pečeni. Celkovo sa účinok týchto enzýmov môže líšiť medzi jednotlivcami navzájom, ale zdá sa, že ich aktivita je vo všeobecnosti vyššia v tenkom čreve než v pečeni. Enzýmy boli získané pomocou extrakcie z častí ľudského tenkého čreva a pečene, získaných od pacientov, ktorí podstúpili operáciu tráviaceho traktu. Kvercetín-4'-glukozid, naringenín-7-glukozid, apigenín-7-glukozid, genistein-7-glukozid a daidzein-7-glukozid boli hydrolyzované v oboch extraktoch, zatiaľ

čo kvercetin-3,4'-diglukozid, kvercetin-3-glukozid, kaempferol-3-glukozid, kvercetin-3-ramnoglukozid and naringenin-7-ramnoglukozid ostali nezmenené. S výnimkou kvercetin-3-glukozidu, ktorý bol v extrakte z tenkého čreva v malej miere metabolizovaný. Rýchlosť a rozsah deglykozylácie sú uvedené v Tab. 7. Z hodnôt možno vyčítať, že hydrolytická aktivita je vyššia v tenkom čreve než v pečeni, čo potvrdzujú aj hodnoty K_m a V_{max} zistené v pečeni, v porovnaní s nameranými vyššími hodnotami prislúchajúcimi aktivite enzýmov v tenkom čreve (Day et al., 1998).

Tabuľka 7 : Rozsah deglykozylácie v tenkom čreve a pečeni.

Initial rates and extent of deglycosylation of (iso)flavonoid glycosides with a small intestine and liver cell-free extract

Substrate	Initial rate of deglycosylation ($\mu\text{mol}/\text{min mg}$)		Deglycosylation after 90 min (%)	
	Small intestine	Liver	Small intestine	Liver
Q 4'-glucoside	2.14 \pm 0.20	0.74 \pm 0.02	90.0 \pm 1.3	68.7 \pm 0.1
Q 3-glucoside	0.14 \pm 0.03	0	16.2 \pm 0.5	0
Q 3-rhamnoglucoside	0	0	0	0
Q 3,4'-diglucoside	0	0	0	0
K 3-glucoside	0	0	0	0
Genistein 7-glucoside	3.15 \pm 0.22	1.06 \pm 0.22	97.8 \pm 0.5	76.3 \pm 0.4
Daidzein 7-glucoside	2.40 \pm 0.15	0.54 \pm 0.06	95.0 \pm 0.8	66.5 \pm 0.3
Apigenin 7-glucoside	1.35 \pm 0.20	0.61 \pm 0.13	83.3 \pm 0.2	49.0 \pm 0.9
Naringenin 7-glucoside	1.05 \pm 0.17	0.30 \pm 0.09	66.1 \pm 2.8	26.3 \pm 0.6
Naringenin 7-rhamnoglucoside	0	0	0	0

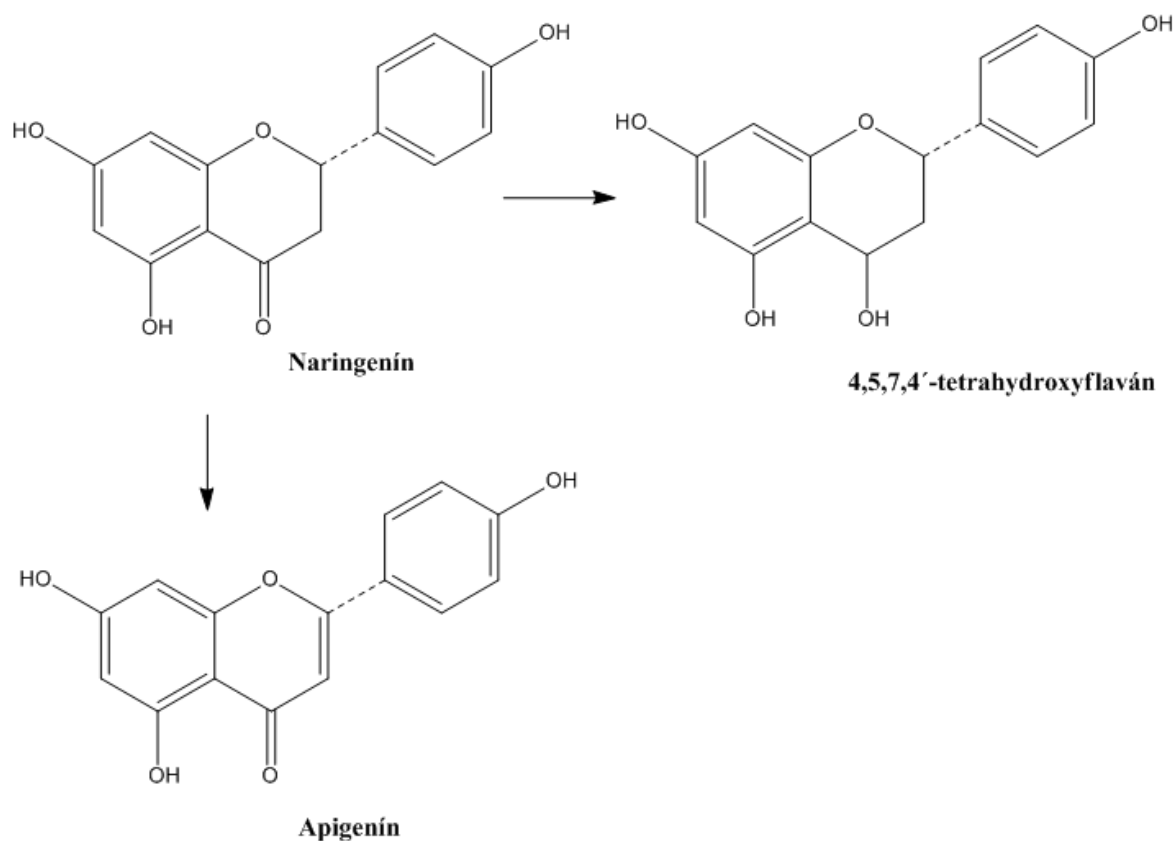
Samples were incubated for various time intervals (0–90 min) at 37°C. Initial rates were calculated using the linear component of the progress curve only. Alternate time points were assayed in triplicate.

Tabuľka prevzatá z Day et al., 1998.

Pri skúmaní prenášača SGLT1 sa zistilo, že niektoré glykozylované flavonoidy a aglykóny, sú schopné zablokovať tento prenášač (Del Rio et al., 2003). V inej štúdií, kde boli použité črevné bunky Caco-2, sa ukázalo, že prenos glukózy je zablokovaný flavonoidmi vo forme glykozidov a neglykozylovanými polyfenolmi, zatiaľ čo aglykóny a fenolické kyseliny na prenos nemali vplyv (Johnston et al., 2005).

Naringenin je z tráviaceho traktu efektívnejšie absorbovaný než hesperetin a v porovnaní s hesperetínom vykazuje aj vyššiu biologickú dostupnosť (Brett et al., 2009; Kanaze et al., 2007; Vallejo et al., 2010). Po jednorázovom podaní rovnakého množstva aglykónov, 135 mg hesperetínu a 135 mg naringenínu, bola maximálna plazmatická koncentrácia (c_{max}) naringenínu približne 2,5-krát vyššia než c_{max} hesperetínu. Ale čas, za ktorý boli c_{max} dosiahnuté bol u oboch aglykónov približne rovnaký (Kanaze et al., 2007). Potvrdzuje to aj štúdia Bretta et al. (2009), kedy množstvo podaného hesperetínu bolo asi 7-krát vyššie ako množstvo naringenínu. Hoci c_{max} a AUC hesperetínu boli mnohonásobne vyššie než hodnoty naringenínu, rozdiely medzi hodnotami c_{max} a AUC jednotlivých aglykónov sa nelíšili 7-násobne.

Okrem toho, že sú proximálne časti tráviacej sústavy, tenké črevo a v menšej miere aj žalúdok, miestom vstrebávania flavanónov, podieľajú sa aj na metabolizme. Prvej fázy metabolizmu sa zúčastňujú predovšetkým enzýmy cytochrómu P450. Hlavnými izoformami v pečeni a tráviacom trakte sú izoformy CYP3A4 a CYP3A5, ktoré sa významne podieľajú na metabolizme flavonoidov. V menšom množstve ich možno nájsť aj v žalúdku, konkrétne ide o CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 a CYP2E1. V štúdií zaoberajúcej sa metabolizmom naringenínu boli zistené dva produkty prvej fázy metabolizmu (Obr. 14). Prvým bol apigenín, ktorý vznikol desaturáciou kruhu C. Apigenín bol nájdený nie len v tenkom čreve, ale aj v žalúdku. To potvrdzuje, že prvá fáza metabolizmu prebieha v tenkom čreve a v žalúdku. Druhým bol 4,5,7,4'-tetrahydroxyflaván, ktorý vznikol redukciou karbonylovej skupiny naringenínu na uhlíku C₄. Detegovaný bol aj oxidačný produkt, ktorého presnú štruktúru sa nepodarilo zistiť. V závislosti na polohe hydroxylácie, môže ísť o 3'-hydroxylovaný produkt, eriodiktyol, aromadendrín alebo hydroxychinón (Orrego-Lagarón et al., 2016).

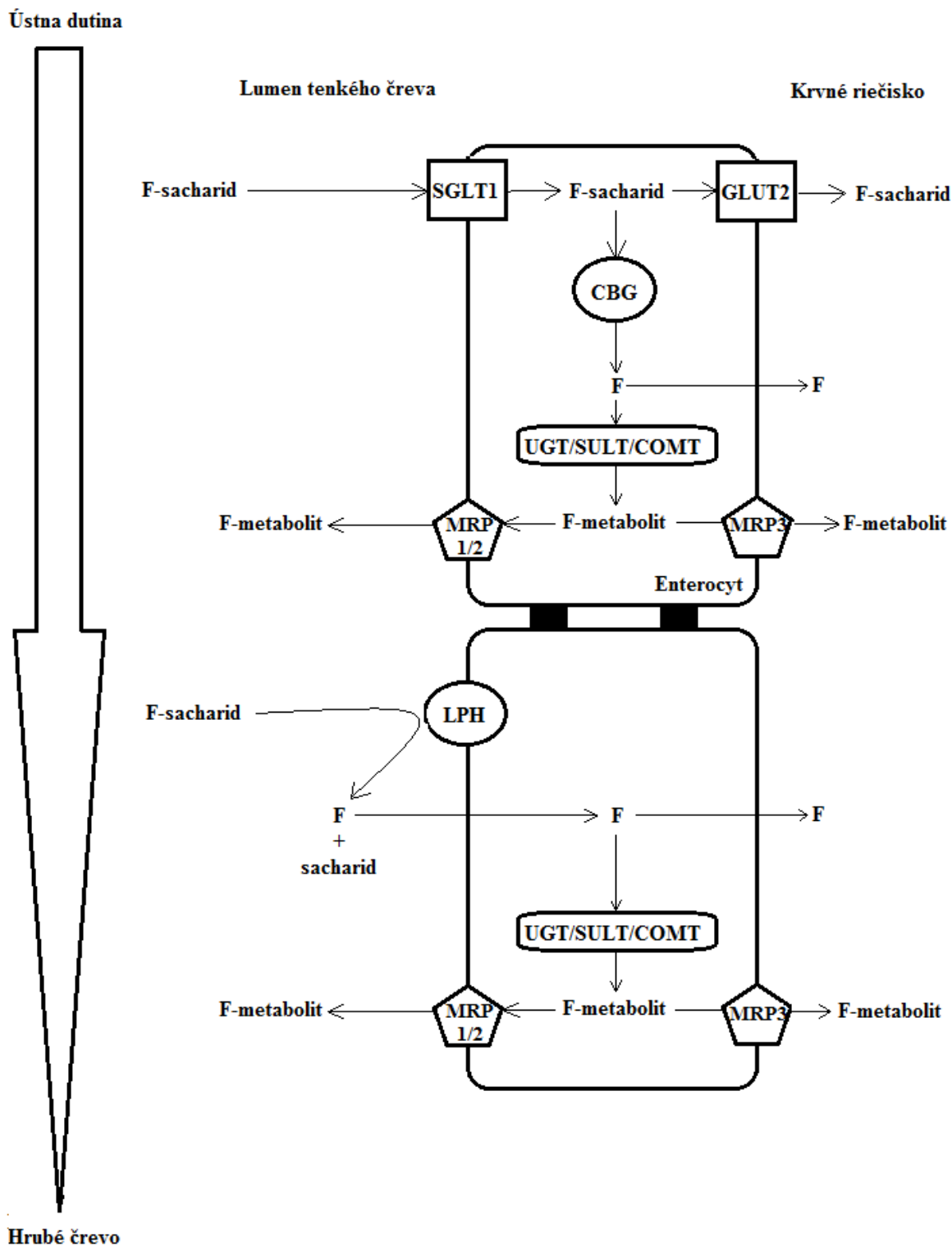


Obrázok 14: Redukcia naringenínu na príslušný 4,5,7,4'-tetrahydroxyflaván a desaturácia kruhu C naringenínu na apigenín.

Vlastné spracovanie podľa Orrego-Lagarón et al., 2016.

Ešte v bunkách tráviaceho traktu, pred vstupom do obehového systému sa aglykóny podrobia určitému stupňu druhej fázy metabolizmu. Pôsobením enzýmov, ako sú sulfotransferáza (SULT), uridín-5'-difosfátglukuronozyltransferáza (UGT) a katechol-*O*-metyltransferáza vznikajú príslušné metabolity. Môže však dochádzať k spätnému vychytávaniu vzniknutých metabolitov do lumen tenkého čreva. Toto vychytávanie zapríčiňuje rodina membránových prenášačov, adenosin triphosphate-binding cassette (ABC), vrátane multirezistentného proteínu (MRP) a P-glykoproteínu. MRP-3 a glukózový prenášač GLUT2 sa tiež účastina na spätnom vychytávaní metabolitov z bazolaterálnej strany enterocytov. Aktivita glukuronozyltransferázy a sulfotransferázy bola zistená nie len v čreve, ale aj v žalúdku. Dva metabolity, naringenín-glukuronid a naringenín-sulfát, boli detegované vo vzorkách zo žalúdku a tenkého čreva, pričom vyšší podiel bol v tenkom čreve. Tieto výsledky sa zhodujú s faktom, že vyššia aktivita týchto konjugačných enzýmov je v tenkom čreve než v žalúdku (Orrego-Lagarón et al., 2016; Del Rio et al., 2013).

Zhrnutie absorpcie a metabolizmu v tenkom čreve je na Obr. 15.



Obrázok 15: Možné spôsoby absorpcie a metabolizmu v tenkom čreve.

Skratky vid' predchádzajúci text.

5.1.1 Biologická dostupnosť

Z vyššie uvedeného vyplýva, že biologická dostupnosť flavanónov je významne ovplyvnená rozsahom procesov v tráviacom trakte. Je známe, že flavanóny vykazujú len veľmi nízku biologickú dostupnosť.

Manach et al. (2003) skúmal vplyv podanej dávky na výslednú biologickú dostupnosť. Podával subjektom pomarančovú šťavu v dvoch dávkach (0,5 a 1 liter), pričom 1 liter šťavy obsahoval dvojnásobné množstvo hesperetínu a naringenínu oproti 0,5 litrovej šťave. Hodnoty c_{\max} však nekorešponovali s podanou dávkou, ale líšili sa až trojnásobne. Vzťah medzi podanou dávkou a maximálnou plazmatickou koncentráciou nie je lineárny.

Vplyv na biologickú dostupnosť flavanónov má aj ich rozpustnosť a typ podávanej šťavy. Pri spracovaní ovocia a príprave štiav, časť flavanónov ostáva rozpustná, ale časť precipituje. *In vitro* aj *in vivo* štúdie dokazujú, že rozpustené flavanóny sú viac dostupné, zatiaľ čo vyvrážené flavanóny sú vo vode nerozpustné, ťažko rozpustné dokonca aj v alkohole a ich opätovné rozpustenie je potrebné silné organické rozpúšťadlo, akým je dimetylsulfoxid (Baker a Cameron, 1999; Gil-Izquierdo et al., 2001; Tomás-Barberán a Clifford, 2000).

Rozdiely vo farmakokinetike a biologickej dostupnosti sa vyskytujú aj medzi dobrovoľníkmi participujúcimi na klinických štúdiách. Hoci je pri testovaní snaha o čo najvhodnejšie podmienky, vo výsledku sa môžu hodnoty jednotlivcov navzájom líšiť. Vplyv na variabilitu môže mať pohlavie, vek, BMI, genetická predispozícia a pod. (Erlund et al., 2001; Vallejo et al., 2010).

Okrem endogénnych faktorov, môže mať na biologickú dostupnosť flavanónov vplyv aj zloženie potravy. Napríklad vysoký obsah vlákniny, divalentné minerály, či potrava bohatá na bielkoviny by mohli znižovať absorpciu flavonoidov (Bohn, 2014).

Podobne aj podávanie probiotík, *Bifidobacterium longum*, môže ovplyvniť biologickú dostupnosť. Dobrovoľníkom bola nárazovo podaná pomarančová šťava spolu s probiotikami alebo bez nich. V druhej časti boli dobrovoľníci po dobu 4 týždňov denne suplementovaní probiotikami a po tejto dobe im bola podaná rovnaká šťava. Šťava v oboch prípadoch obsahovala celkovo 196 μmol polyfenolov, z čoho 56 μmol boli naringénin-*O*-glykozidy a 111 μmol hesperetín-*O*-glykozidy. Nárazové podanie šťavy spolu alebo bez probiotík nespôsobilo zmenu v biologickej dostupnosti, pričom metabolity hesperetínu

a naringenínu boli vylúčené močom v množstve 22% vzhľadom na podanú dávku, a hlavné fenolické a aromatické kyseliny vzniknuté v hrubom čreve boli vylúčené z 21% vzhľadom na podanú dávku. Avšak, konzumácia pomarančovej šťavy po 4 týždňoch pravidelnej dennej suplementácie probiotikami spôsobila nárast vylučovania metabolitov na 27% vzhľadom na podanú dávku, a vylučovanie fenolických katabolitov tiež vzrástlo na 43%. Nie je však celkom známe ako došlo k tomuto nárastu. *In vitro* síce *Bifidobacterium longum* vykazuje ramnozidázovú aktivitu voči p-nitrofenyl- α -ramnopyranozidu ako substrátu, no za anaérobnej inkubácie tejto baktérie spolu s hesperetín-7-*O*-rutinozidom a naringenín-7-*O*-rutinozidom nedošlo k štiepeniu rutinozidu na glukozid, ani tohto na aglykón. No zvýšená biologická dostupnosť po dlhodobom podávaní probiotík pozorovaná *in vivo* vedie k otázke, či by dlhodobý príjem probiotík nemohol byť prospešný pre črevnú mikroflóru, čo by vo výsledku mohlo zvýšiť aj biologickú dostupnosť podávaných flavanónov (Avila et al., 2009; Pereira-Caro et al., 2015; Pereira-Caro et al., 2016).

V nasledujúcich tabuľkách sú spracované rôzne farmakokinetické parametre hesperetínu (Tab. 8) a naringenínu (Tab. 9), ktoré boli zistené v jednotlivých štúdiách.

Tabuľka 8: Farmakokinetické parametre – hesperetín.

Počet subjektov	Vek	Podaná látka	Prijatá dávka		AUC		c _{max}		T _{max}	T _{1/2}	Zdroj
			µmol	mg	µmol · h/L	µg · h/L	µmol/L	µg/L	h	h	
8	26 ± 5	PŠ	417 ± 86	126 ± 26	10.3 ± 8.2	3099 ± 2464	2.20 ± 1.58	655 ± 479	5.4 ± 1.6	2.2 ± 0.8	Erlund et al., 2001.
5	25 ± 1	PŠ	363,5 ± 12,2	109,9 ± 3,7	4,19 ± 1,11	1366 ± 335	0,46 ± 0,07	139 ± 21	5,40 ± 0,40	-	Manach et al., 2003.
5	25 ± 1	PŠ	727 ± 24,6	219,9 ± 7,4	9,28 ± 1,95	2805 ± 859	1,28 ± 0,13	387 ± 39	5,80 ± 0,37	-	Manach et al., 2003.
6	25 ± 5	čistý aglykón	-	135	-	4300,49 ± 1697,20	-	825,78 ± 410,63	3,67 ± 0,52	3,05 ± 0,91	Kanaze et al., 2007.
7	25,7 ± 1,1	PŠ	-	51	-	195,5	-	43,4	5,3	-	Gardana et al., 2007.
7	25,7 ± 1,1	PŠ	-	102	-	396,4	-	78,9	5,1	-	Gardana et al., 2007.
20	18-80 rokov	pomaranč	-	79,7 ± 17,7	-	376 ± 508	-	28,8 ± 37,3	7,00 ± 4,23	-	Brett et al., 2009.
20	18-80 rokov	PŠ	-	71,8 ± 8,1	-	346 ± 363	-	30,9 ± 38,0	6,20 ± 2,04	-	Brett et al., 2009.

Pomarančová šťava (PŠ), area under the curve (AUC), maximálna plazmatická koncentrácia (c_{max}), čas, za ktorý bola dosiahnutá c_{max} (T_{max}), plazmatický polčas (T_{1/2}).

Vlastné spracovanie.

Tabuľka 9: Farmakokinetické parametre – naringenín.

Počet subjektov	Vek	Podaná látka	Prijatá dávka		AUC		C _{max}		T _{max}	T _{1/2}	Zdroj
			µmol	mg	µmol · h/L	µg · h/L	µmol/L	µg/L	h	h	
8	26 ± 5	GŠ	731 ± 155	199 ± 42	27.7 ± 26.3	7534 ± 7151	5.99 ± 5.36	1628 ± 1459	4.8 ± 1.1	2.2 ± 0.1	Erlund et al., 2001
8	26 ± 5	PŠ	85 ± 7	23 ± 2	2.6 ± 1.6	719 ± 437	0.64 ± 0.40	175 ± 110	5.5 ± 2.9	1.3 ± 0.6	Erlund et al., 2001.
5	25 ± 1	PŠ	83,0 ± 7,7	22,6 ± 1,9	0,43 ± 0,17	117 ± 46	0,06 ± 0,02	16,5 ± 5	4,60 ± 0,60	-	Manach et al., 2003.
5	25 ± 1	PŠ	166,1 ± 15,6	45,2 ± 4,0	1,29 ± 0,33	351 ± 90	0,20 ± 0,04	54 ± 11	5,00 ± 0,45	-	Manach et al., 2003.
6	25 ± 5	čistý aglykón	-	135	-	8841,51 ± 2728,57	-	2009,51 ± 770,81	3,67 ± 0,82	2,31 ± 0,40	Kanaze et al., 2007.
7	25,7 ± 1,1	PŠ	-	6	-	53,9	-	16,4	5	-	Gardana et al., 2007.
7	25,7 ± 1,1	PŠ	-	12	-	95,6	-	53,9	5	-	Gardana et al., 2007.
20	18-80 rokov	pomaranč	-	11,8 ± 5,5	-	230± 283	-	23± 32,1	5,88 ± 1,83	-	Brett et al., 2009.
20	18-80 rokov	PŠ	-	9,4 ± 0,7	-	176 ± 170	-	14,3± 14,4	4,46± 2,56	-	Brett et al., 2009.

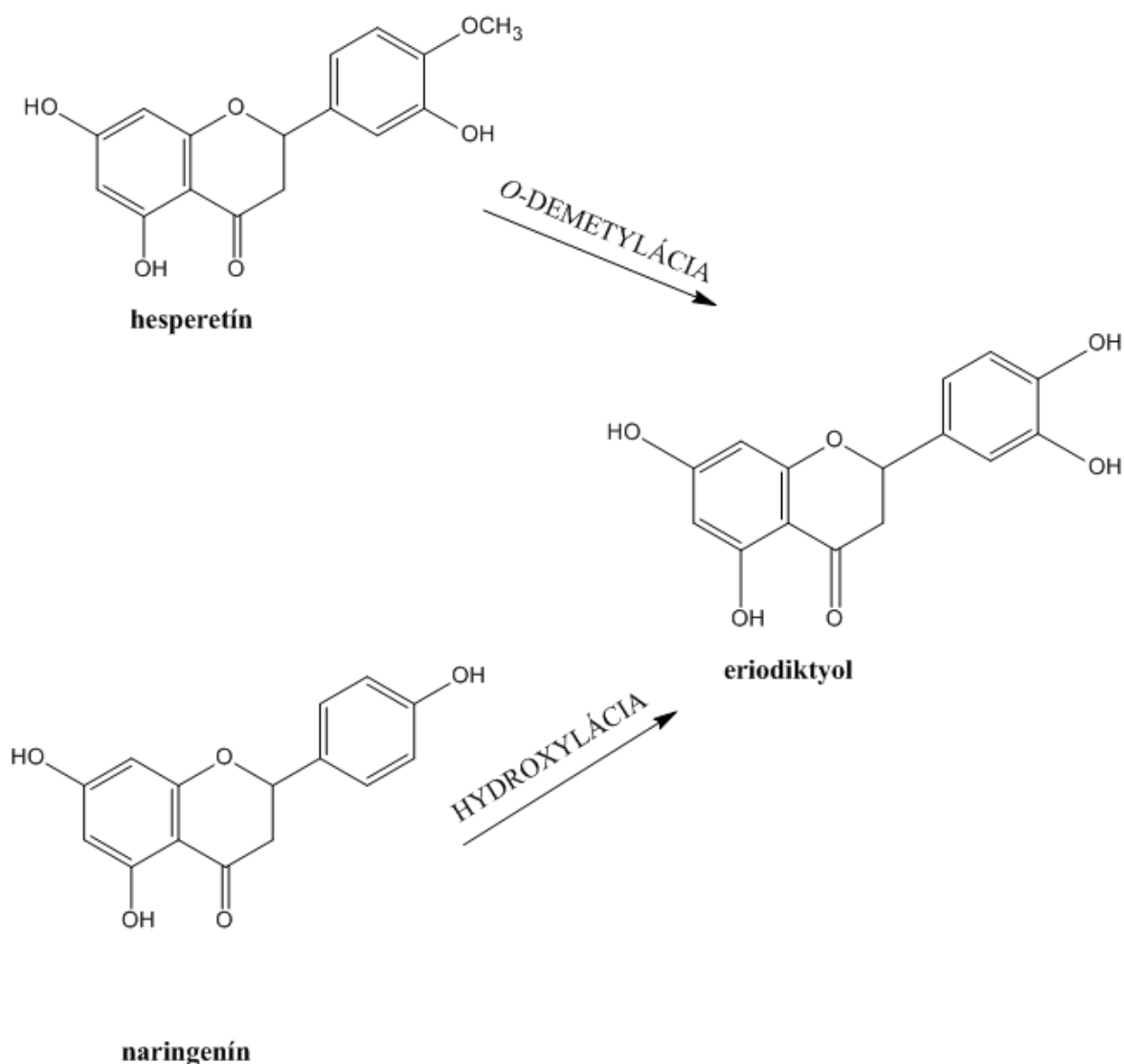
Grapefruitová šťava (GŠ), ďalšie skratky vid' Tab. 8.

Vlastné spracovanie.

5.2 Metabolizmus v pečeni

Po vstrebaní flavanónov z tenkého čreva, sa krvným riečiskom dostávajú do pečene, kde sú nasledovne metabolizované. Najskôr sú podrobené I. fáze metabolizmu, na ktorej sa podieľa monooxygenázový systém, cytochróm P450. V ľudskom organizme je exprimovaných 57 génov kódujúcich CYP450, ktoré sú rozdelené do 18 rodín s rôznymi izoformami. Na metabolizme flavonoidov sa podieľajú hlavne CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP3A4 a CYP2C9, pričom prevládajúcou formou je CYP3A4, nachádzajúca sa práve v tenkom čreve, ako bolo zmienené vyššie, a v pečeni, kde zohráva kľúčovú úlohu.

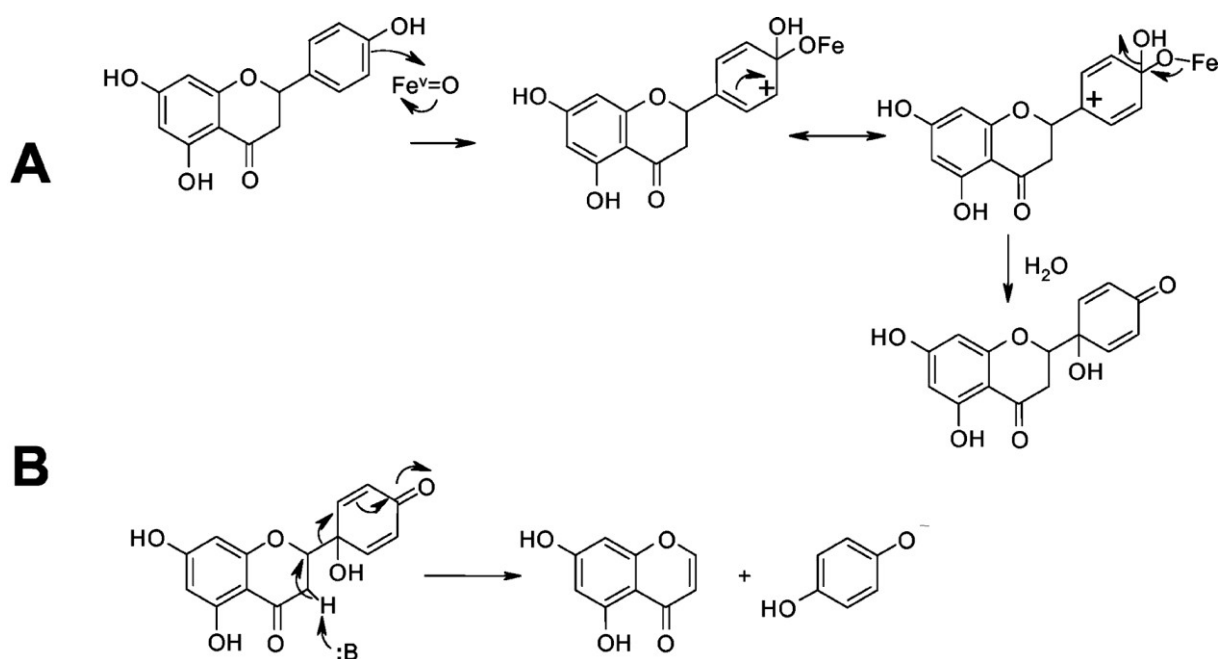
Fáza I v pečeni zahŕňa najmä oxidáciu a *O*-demetyláciu (Cassidy et al., 2017). Hlavnou štruktúrou v molekule flavonoidu, na ktorej dochádza k biotransformácii je kruh B. Dôležitý je pritom počet a pozícia hydroxylových a metoxylových skupín na kruhu B. Flavonoidy, ktoré neobsahujú žiadnu hydroxylovú skupinu v kruhu B, alebo tie, ktoré obsahujú v molekule 4'-hydroxylovú skupinu, sú *in vitro* za použitia potkaních ale aj ľudských mikrozómov premenené na príslušné 3',4'-dihydroxyderiváty. Podobne je tomu s flavonoidmi obsahujúcimi metoxylovú skupinu v pozícii 4'. 4'-Metoxyderiváty sú demetylované a vznikajú príslušné hydroxyderiváty. Flavanóny, ktoré obsahovali dve alebo viac hydroxylových skupín, alebo u 3'-metoxyderivátov neboli detegované žiadne metabolity. Hlavným metabolitom naringenínu aj hesperetínu je eriodiktyol. Hoci je eriodiktyol spoločný pre oba tieto aglykóny, jeho vznik je u oboch rozdielny. Zatiaľ čo u hesperetínu dochádza k demetylácii v polohe 4', u naringenínu dochádza k hydroxylácii v polohe 3' (Obr. 16, Nielsen et al., 1998; Nikolic a van Breemen, 2004; Breinholt et al., 2000).



Obrázok 16: Hlavný metabolit I. fázy metabolizmu hesperetínu a naringenínu, eriodiktyol.

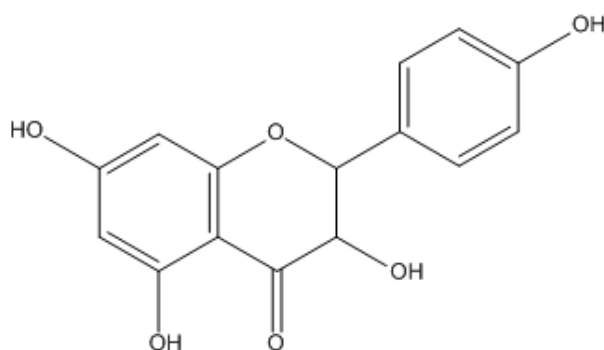
Vlastné spracovanie.

Ďalšími možnými metabolitmi naringenínu, vznikajúcimi pôsobením potkaních pečenevých mikrozomálnych enzýmov, sú látky s hydroxychinónovou štruktúrou (Obr. 17-A), pričom v niektorých prípadoch následne dochádza k štiepeniu kruhu B a vzniká 5,7-dihydroxychromón (Obr. 17-B). Vo veľmi malom množstve vzniká aj 3-hydroxynaringenín, tiež nazývaný aromadendrín (Obr. 17). Naringenín sa môže metabolizovať aj na flavón (apigenín) s nasýteným kruhom C (Obr. 19). Rovnako tak je tomu v tenkom čreve (Obr. 14). Vzniku apigenínu predchádza krok, v ktorom je vytvorený radikál, následne dochádza dehydrogenácii na príslušný flavón (Nikolic a van Breemen, 2004).



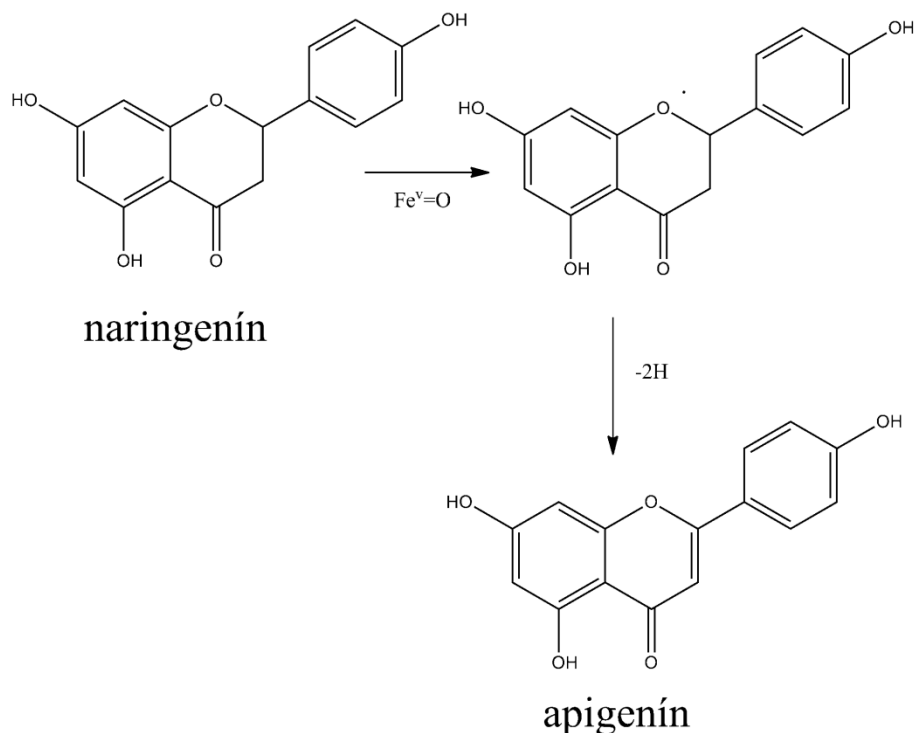
Obrázok 17: Vznik hydroxychinónu z naringenínu (A) a následné štiepenie na 5,7-dihydroxychromón (B).

Obrázok prevzatý z Nikolic a van Breemen, 2004.



Obrázok 18: Aromadendrin, 3-hydroxynaringenin.

Vlastné spracovanie podľa Nikolic a van Breemen, 2004.

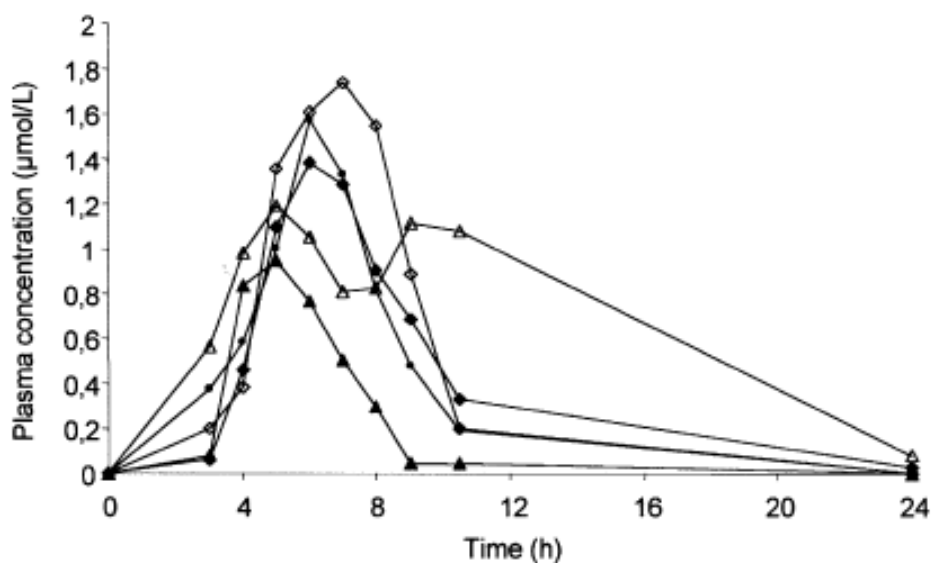


Obrázok 19: Konverzia flavanónu (naringenínu) na príslušný flavón (apigenín).

Vlastné spracovanie podľa Nikolic a van Breemen, 2004.

Enzýmy II. fázy metabolizmu, ktorými sú uridín-5'-difosfát glukuronyltransferáza, sulfotransferáza a catechol-*O*-metyltransferáza, však vykazujú omnoho vyššiu aktivitu. Vysokú aktivitu potvrdzuje aj fakt, že aglykóny sú v krvnom obehú buď úplne neprítomné, alebo sa v ňom nachádzajú len v nízkych koncentráciách. Preto oxidačné a *O*-demetylované metabolity vznikajúce v pečeni sú menej významné z hľadiska celkového množstva metabolitov. Väčšina metabolitov je vo forme glukuronidovaných, sulfátovaných a metylovaných konjugátov. Vďaka vyššej polarite týchto produktov sú prostredníctvom obličiek vylučované do moču. No môžu byť aj žľou alebo činnosťou efluxných transportérov vylúčené naspäť do tenkého čreva, kde sú mikroflórou hydrolyzované na príslušné aglykóny. Tento extenzívny metabolizmus spôsobuje nízke plazmatické hladiny, a tým ďalej znižuje biologickú dostupnosť (Cassidy a Minihane, 2017; Del Rio et al., 2013; Hollman, 2014; Thilakarathna a Vasantha Rupasinghe, 2013).

Metabolity vylúčené do čreva sa môžu v niektorých prípadoch opätovne vstrebať a byť biologicky dostupné. Poukazujú na to kinetické krivky plazmatických koncentrácií, kedy sa u jedného z piatich skúmaných subjektov vyskytujú dva píky (Obr. 20). Druhý pík v čase 10 h pravdepodobne korešponduje s reabsorpciou metabolitov vylúčených žľou do tenkého čreva (Manach et al., 2003; Thilakarathna a Vasantha Rupasinghe, 2013).



Obrázok 20: Kinetické krivky plazmatických koncentrácií po podaní pomarančovej šťavy prislúchajúce 5 testovaným subjektom, pričom u jedného (Δ) sa vyskytujú dva píky súvisiace s reabsorpciou metabolitov.

Obrázok prevzatý z Manach et al., 2003.

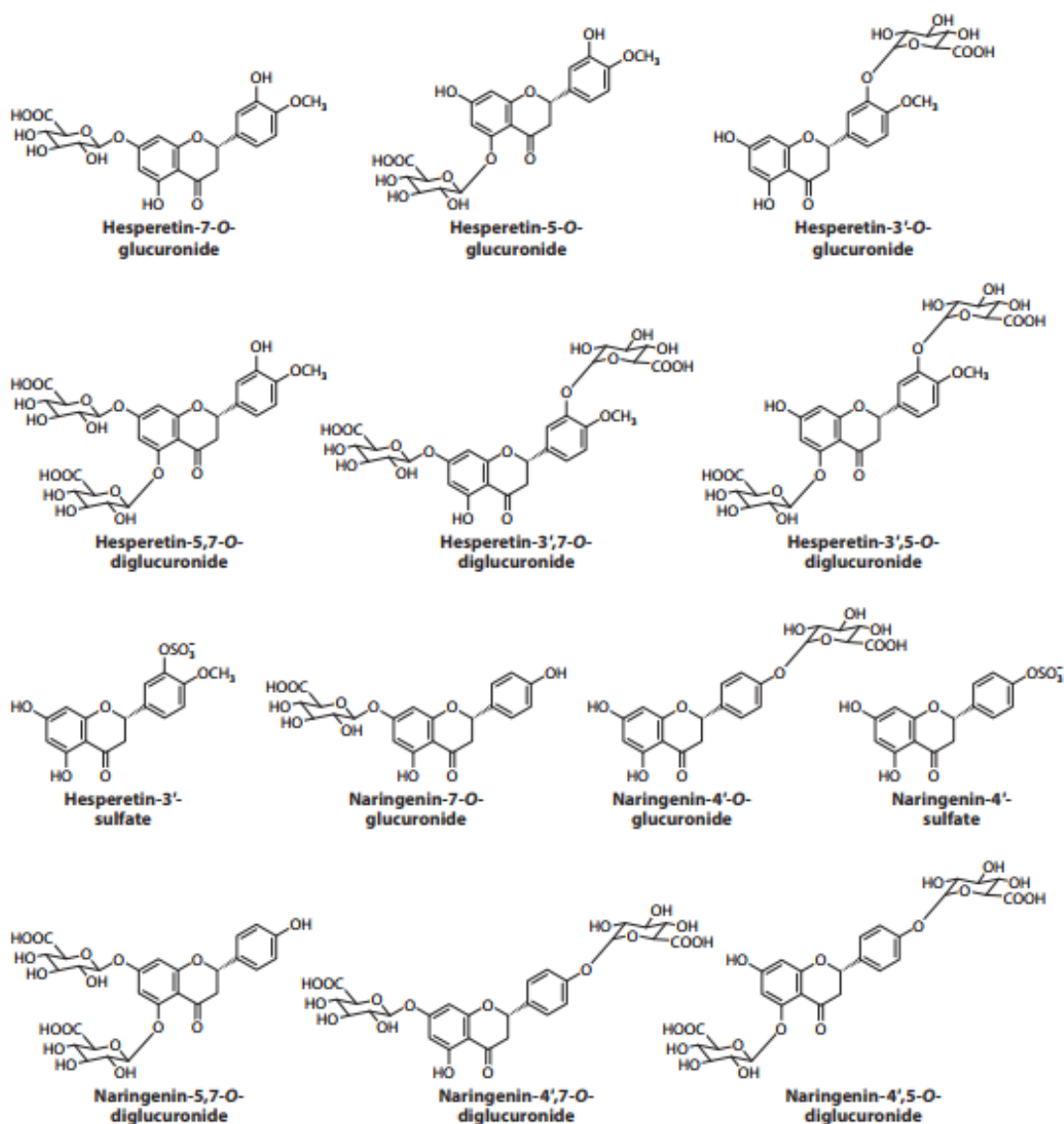
UGT katalyzuje prenos zvyšku glukurónovej kyseliny z UDP-glukurónovej kyseliny na flavonoid. Rodina UGT enzýmov zahŕňa 22 izoforiem, medzi ktoré patria UGT1A (UGT1A1, UGT1A3, UGT1A4, UGT1A5, UGT1A6, UGT1A7, UGT1A8, UGT1A9, UGT1A10), UGT2A (UGT2A1, UGT2A2, UGT2A3), UGT2B (UGT2B4, UGT2B7, UGT2B10, UGT2B11, UGT2B15, UGT2B17, UGT2B28), UGT3 (UGT3A1, UGT3A2) a UGT8 (UGT8A1) (Mackenzie et al., 2005). V ľudskom organizme sa tiež nachádza 10 rôznych izoforiem SULT. Tieto enzýmy pripájajú na flavonoidy zvyšok kyseliny sírovej. V ľudskom tele boli detegované SULT1A1, SULT1A2, SULT1A3 (je kódovaná SULT1A3 a SULT1A4, preto často nazývaná aj SULT1A3/4), SULT1B1, SULT1C2, SULT1C4, SULT1E1, SULT2A1, SULT2B1_v2 a SULT4A1_v2 (Riches et al., 2009). Zatiaľ čo činnosťou UGT a SULT vznikajú hydrofilnejšie molekuly, pôsobenie COMT vedie k lipofilnejším produktom. Tie, aby mohli byť z organizmu vylúčené, musia byť následne glukuronidované alebo sulfátované (Cassidy a Minihane, 2017).

Na metabolizme hesperetínu sa podieľajú enzýmy UGT a SULT. Hesperetín je konjugovaný prevažne v pozícii 7 a 3' (Brand et al., 2010). Zaujímavé je, že nedochádza ku konjugácii hydroxylovej skupiny v pozícii C₅ (Exarchou et al., 2002).

Hlavnými enzýmami podieľajúcimi sa na vzniku hesperetín-7-*O*-glukuronu sú UGT1A9, UGT1A1, UGT1A7, UGT1A8 a UGT1A3. UGT1A7 však pripája zvyšok glukurónovej kyseliny hlavne v pozícii 3', čím vzniká hesperetín-3'-*O*-glukuronid. Izoformy UGT1A6 a UGT2B4 produkujú len hesperetín-7-*O*-glukuronid. Izoformy UGT1A1, UGT1A8, UGT1A9, UGT1A10, UGT2B7 a UGT2B15 katalyzujú vznik metabolitov v oboch pozíciách. Hesperetín je metabolizovaný hlavne izoformou UGT1A9 a účinok glukuronidácie postupne klesá v poradí UGT1A9 > UGT1A1 > UGT1A7 > UGT1A3 > UGT1A8 > UGT1A10 > UGT2B7 = UGT2B15 > UGT2B4.

Výsledkom pôsobenia SULT je hesperetín-7-*O*-sulfát a hesperetín-3'-*O*-sulfát. Izoformy SULT1C4 a SULT2A1 katalyzujú vznik 7-*O*-sulfátu, zatiaľ čo SULT1A1, SULT1A2, SULT1E1 sú zodpovedné za sulfatáciu v pozícii 3'. Pôsobením SULT1C2 vznikajú oba produkty, ale preferenčne hesperetín-7-*O*-sulfát, zatiaľ čo pôsobením SULT1A3 a SULT1B1 vznikajú preferenčne konjugáty v pozícii 3' (Brand et al., 2010). Celé spektrum metabolitov je ukázané na Obr. 21.

V *in vivo* systémoch však UGT a SULT pôsobia v rovnakom čase, čo má za následok vznik glukuronidov aj sulfátov a to v rôznom pomere. V štúdií, kedy sa dobrovoľníkom po nočnom hladovaní podal jednorázovo 1 liter pomarančovej šťavy obsahujúcej 444mg/l hesperidínu, boli v plazme detegované glukuronidy (87%) aj sulfo-glukuronidované metabolity (13%), no nenašli sa v nej žiadne čisto sulfátované formy. V inej štúdií sa podávala pomarančová šťava, ktorá obsahovala 410mg/l hesperidínu. V plazme sa našli len glukuronidy, ale v moči boli zistené aj sulfátované formy. Autori si to vysvetľujú tým, že istú úlohu v II. fáze metabolizmu môžu zohrávať aj obličky, v ktorých je exprimovaná SULT1A1 zodpovedná za vznik malého množstva sulfátovaných derivátov. V tretej štúdií boli dobrovoľníkom podávané buď pomaranče (161mg hesperidínu) alebo pomarančová šťava (145mg hesperidínu). V plazme boli detegované hesperetín-7-*O*-glukuronid, hesperetín-3'-*O*-glukuronid a hesperetín-3'-*O*-sulfát. Tieto rozdiely zistené v jednotlivých štúdiách možno vysvetliť rozličnou účinnosťou jednotlivých enzýmov v závislosti na mieste ich výskytu ako aj interindividuálnymi rozdielmi v biologických systémoch (Brand et al., 2010).



Obrázok 21: Hlavné metabolity hesperetínu a naringenínu.

5.3 Metabolizmus črevnou mikroflórou v hrubom čreve

Zlúčeniny, ktoré sa nevstrebajú v tenkom čreve, putujú ďalej do hrubého čreva, kde sú rozkladané za účasti črevnej mikroflóry na jednoduchšie látky, ktoré môžu dokonca vykazovať určitú biologickú aktivitu (Thilakarathna a Vasantha Rupasinghe, 2013).

Hrubé črevo osídľujú kmene enterobaktérií, ako sú *Bifidobacterium longum* a *Lactobacillus rhamnosus*. *In vitro* vykazujú glukozidázovú a ramnozidázovú aktivitu a podieľajú sa na katabolizme flavanónov (Pereira-Caro et al., 2016). Prvým krokom je odštiepenie rutinozidu z molekuly, čím vzniká aglykón. *In vivo*, uvoľnený aglykón môže difundovať po koncentračnom spáde do krvi, pričom časť je ďalej metabolizovaná na glukuronidované alebo sulfátované metabolity. Ďalšia časť môže byť vylúčená prostredníctvom fekálií. Väčšina aglykónov je však pôsobením mikroorganizmov štiepená (Nielsen et al., 2006; Pereira-Caro et al., 2015). K štiepeniu dochádza na heterocyklickom kruhu, obsahujúcom atóm kyslíka. Vzniknuté produkty zahrňujú množstvo rôznych hydroxylovaných fenyلكarboxylových kyselín. V závislosti na type flavonoidu vznikajú buď fenyloctové kyseliny, fenypropiónové kyseliny alebo valerolaktóny. Pri štiepení flavanónov vznikajú fenypropiónové kyseliny. Tieto fenyلكarboxylové kyseliny sú v tkanivách podrobené ďalšej bakteriálnej degradácii a premene pomocou ľudských enzýmov. Výsledkom je, že niektoré fenypropiónové kyseliny sú oxidované na kyselinu benzoovú (Hollman, 2004). V menšej miere môže dochádzať aj ku skracovaniu postranného reťazca, a tým k zmene fenypropiónovej kyseliny na kyselinu fenyloctovú. Táto kyselina potom môže byť v pečeni prevedená na kyselinu hippurovú (Pereira-Caro et al., 2015; Pereira-Caro et al., 2016). Baktérie v hrubom čreve okrem štiepenia produkujú aj glykozidázy, glukuronidázy a sulfatázy, ktoré sú schopné zbaviť konjugované flavonoidy od naviazanej cukornej zložky, glukurónovej kyseliny a síranu. Baktérie osídľujúce ľudské črevo dokážu hydrolyzovať nie len *O*-glykozidy, ale aj *C*-glykozidy (Hollman, 2004).

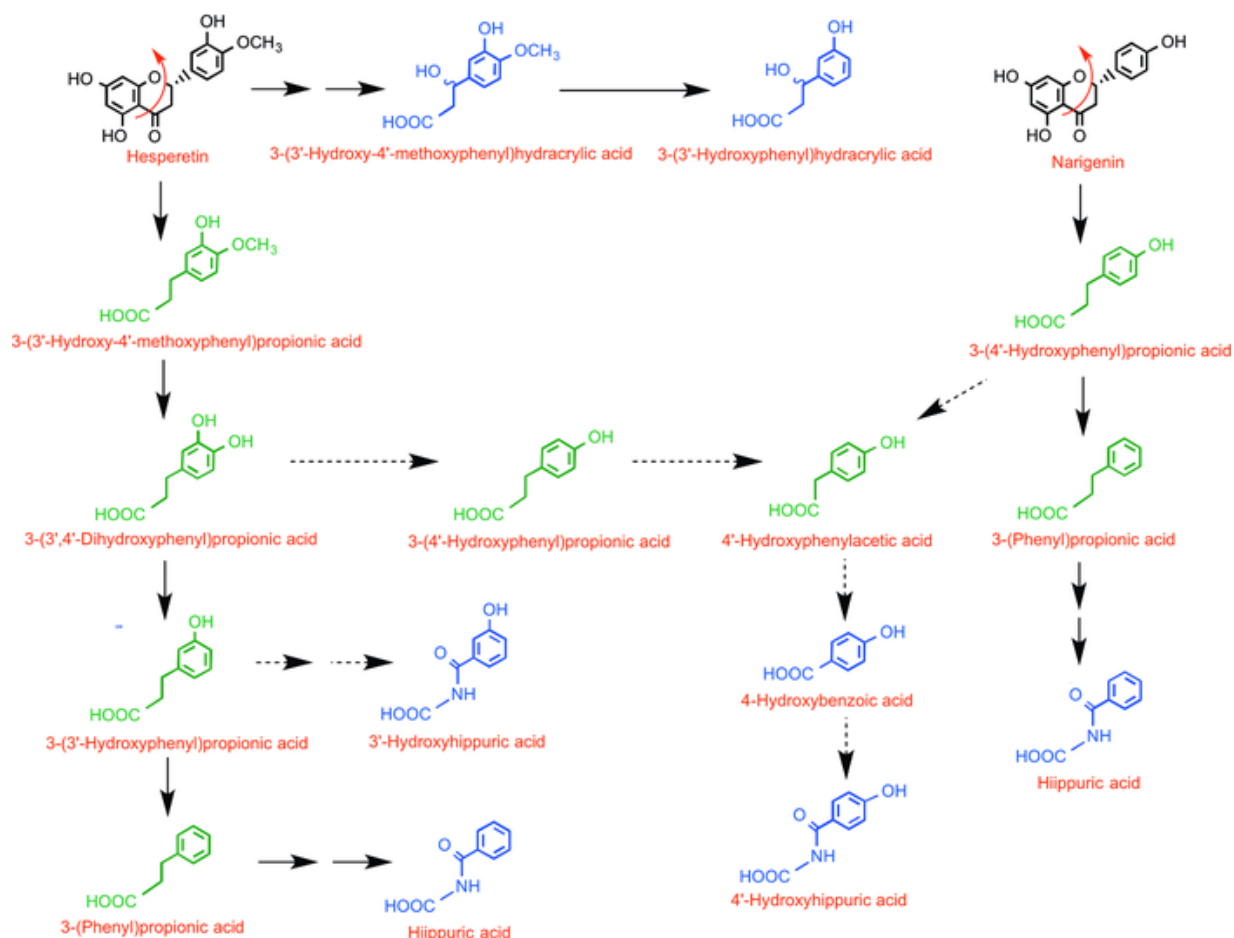
Úloha črevnej mikroflóry pri rozklade hesperetínu a naringenínu bola skúmaná za použitia *in vitro* fermentácie, pričom testované zlúčeniny boli inkubované za anaeróbných podmienok s fermentačným médiom obsahujúcim ľudské fekálie. Cieľom bolo určiť rozkladné produkty, ktoré vznikajú a kvantifikovať ich.

Ukázalo sa, že počas 24 hodín postupne dochádzalo k premenám flavanónov, pričom časom ubúdali pôvodné aglykóny a stúpal podiel príslušných katabolitov. Po 24 hodinách boli skoro všetky flavanóny degradované, pričom ostalo len 6-16% nezmeneného hesperetínu a 0-4% nezmeneného naringenínu.

Hlavným produktom degradácie hesperetínu bola 3-(3'-hydroxy-4'-metoxyfenyl)propiónová kyselina (Obr. 22). Po 1 h inkubácie boli zistené nízke hodnoty tohto katabolitu: 0,4 - 1,1 $\mu\text{mol/l}$. Táto kyselina následne podlieha demetylácii a vzniká kyselina 3-(3',4'-dihydroxyfenyl)propiónová, ktorá bola prvýkrát detegovaná až po 4 h

inkubácie. 3-(3',4'-Dihydroxyfenyl)propiónová kyselina dosiahla maximálne hodnoty medzi 6 – 8 h inkubácie a kompletne vymizla po 24 h. Pri vzorkách všetkých štyroch darcov fermentačného materiálu sa zistilo, že zmiznutie tohto metabolitu je spojené s postupným nárastom iného produktu, ktorý vzniká jej dehydroxyláciou, a to 3-(3'-hydroxyfenyl)propiónovej kyseliny, ktorá dosiahla maximálne hodnoty po 24 h fermentácie. 3-(Fenyl)propiónová kyselina bola prvýkrát detegovaná v čase 6 h a maximum mala u všetkých vzoriek po 24 h. Boli zistené aj malé množstvá iných katabolitov hesperetínu, konkrétne 3-(4'-hydroxyfenyl)propiónová kyselina a 4'-hydroxyfenyloctová kyselina, ktorá môže byť ďalej zmenená na 4'-hydroxyhippurovú kyselinu.

Hlavný degradačný produkt naringenínu, ktorý vznikol rozštiepením kruhu, sa objavil po 8 h a bola to 3-(4'-hydroxyfenyl)propiónová kyselina (Obr. 22). Jej hodnoty výrazne poklesli po 24 h. Tento pokles bol sprevádzaný vznikom značného množstva 3-(fenyl)propiónovej kyseliny, ktorá vznikla pravdepodobne medzi 8 a 24 hodinou dehydroxyláciou predošlého metabolitu. Skrátením postranného reťazca vzniklo malé množstvo 4'-hydroxyfenyloctovej kyseliny. Tá sa následne prevedie na kyselinu 4-hydroxybenzoovú a kyselinu 4'-hydroxyhippurovú. Okrem toho boli u všetkých vzoriek zistené aj nízke hladiny 3-(4'-hydroxyfenyl)octovej kyseliny. Porovnaním výsledkov s dátami získanými *in vitro* pozorovaním vylučovania fenolových a aromatických kyselín močom, boli odvodené možné katabolické cesty, ktoré sú znázornené na Obr. 22 (Pereira-Caro et al., 2015).



Obrázok 22: Schématické znázornenie možných katabolických ciest hesperetínu a naringenínu.

Zelené štruktúry – produkty získané *in vitro* pôsobením črevných baktérií; modré štruktúry – produkty detegované v moči, ale neprodukované pri inkubácii s ľudskými fekáliami.

Plné šípky – hlavné metabolické cesty; prerušované šípky – vedľajšie metabolické cesty.

Červené šípky – štiepenie jadier.

Obrázok prevzatý Pereira-Caro et al., 2015.

5.4 Distribúcia

Distribúcia popisuje pohyb a rozptýlenie flavonoidov v telesných tekutinách a tkanivách. Hlavným transportným proteínom je albumín, ktorý sa v plazme nachádza v množstve asi 42 g/l a podieľa sa na osmotickom tlaku zhruba z 80%. Ako väčšina plazmatických bielkovín je syntetizovaný v pečeni v množstve približne 0,7 mg/h na každý gram pečene,

čo predstavuje množstvo približne 10-15 g za deň. Albumín je neglykozylovaný proteín, ktorý pozostáva z 585 aminokyselín a má molekulovú hmotnosť 66,5 kDa.

Albumín v ľudskom tele zastáva viacero funkcií, medzi ktoré patria antikoagulácia, likvidácia voľných radikálov, inhibícia agregácie krvných doštičiek a preprava mnohých endogénnych aj exogénnych látok. Je schopný reverzibilne viazať malé molekuly, ako sú mastné kyseliny, aminokyseliny, liečivá a anorganické ióny. Naviazaním týchto nízko molekulárnych látok na albumín poklesne ich filtrácia v obličkách, čo ovplyvní ich renálnu klírens a v konečnom dôsledku aj biologickú dostupnosť (Ding a Peng,2015; Cao et al., 2011).

Posilnenie väzby ligand – albumín môže zvyšovať plazmatický polčas daného ligandu a jeho stabilitu. Napríklad, po požití 50 mg polyfenolov (ich aglykónov) je priemerný eliminačný polčas katechínov a flavanónov 2-3 hodiny, zatiaľ čo polčas izoflavónov je 5-8 hodín a flavonolov 18-20 hodín. Toto poradie korešponduje so zvyšujúcou sa afinitou aglykónov k albumínu (Khan et al., 2011).

Interakcie medzi liečivami a plazmatickými proteínmi významne ovplyvňujú distribúciu, množstvo voľnej frakcie liečiva v krvnom riečisku a tiež metabolizmus. Preto je veľmi dôležité skúmať vzájomné vzťahy medzi flavanónmi a plazmatickým albumínom. Štruktúra, väzby, energetická náročnosť a mnoho ďalších faktorov môžu ovplyvniť afinitu polyfenolických látok k plazmatickým bielkovinám, a tým aj distribúciu a transport v krvnom riečisku (Cao et al., 2011).

Vlastnosti, ktoré vplývajú na afinitu polyfenolov k plazmatickým bielkovinám sú:

- Jedna alebo viac hydroxylových skupín naviazaných na kruhu B (napr. 3', 4' dihydroxylové skupiny na kruhu B) zvyšujú afinitu flavonoidov k plazmatickým bielkovinám. Na druhej strane, hydroxylová skupina na kruhu C túto afinitu oslabuje.
- Prítomnosť nenasýtenej väzby medzi uhlíkmi C₂ a C₃, ktorá je konjugovaná s karbonylovou skupinou na uhlíku C₄, zvyšuje afinitu k plazmatickým bielkovinám.
- V závislosti na mieste pripojenia a povahe cukornej zložky, môže glykozylácia znížiť afinitu k plazmatickým bielkovinám.

- Metylácia hydroxylových skupín zvyšuje afinitu k plazmatickým bielkovinám, a to 2-16 krát.
- Katechíny s naviazanou gallovou kyslinou vykazujú vyššiu afinitu k plazmatickým bielkovinám, ako tie bez kyseliny gallovej. Rovnako tak katechíny v trans konfigurácii v polohe C₂-C₃ vykazujú vyššiu afinitu než tie v konfigurácii cis (Xiao a Kai, 2012).

Štruktúrne sa albumín skladá z troch homologických domén (I, II a III), ktoré sú vzájomne usporiadané do tvaru srdca. Každá doména je tvorená dvomi subdoménami (A a B), ktoré majú tvar helixu a sú pospájané 17 disulfidickými väzbami. Existujú dve hlavné väzobné miesta pre liečivá a iné xenobiotiká. Miesto 1, nazývané tiež ako warfarín-azapropazónové miesto, nachádzajúce sa v subdoméne IIA. Má tvar dutiny, ktorej vnútorné steny sú tvorené hydrofóbnymi reťazcami, ale vstup do tejto dutiny je obklopený pozitívne nabitými časťami. Zvláštnym rysom tohto miesta je objemný heterocyklický anión s negatívnym nábojom, zvyšok tryptofánu, ktorý je umiestnený uprostred. V tomto mieste sa viažu na albumín látky ako azapropazón, kyselina dijódosalicylová, fenylbutazón a warfarín. Miesto 2 sa nachádza v subdoméne IIIA a je známe ako indol-benzodiazepínové miesto. Je takmer rovnako veľké ako miesto 1 a má tvar hydrofóbnej dutiny, pričom pri vstupe do dutiny sú naviazaná dve zvyšky aminokyselín, a to arginín a tyrozín. Ligandy viažuce sa v mieste 2 sú napríklad diazepam, ibuprofén, flufenámová kyselina a propofol (Khan et al., 201; Ding a Peng, 2015).

Flavanóny sa môžu viazať v oboch miestach, teda v subdoméne IIA aj IIIA. Avšak vyššiu afinitu k subdoméne IIA. V oboch subdoménach sa viažu pomocou vodíkových väzieb. Ale v subdoméne IIA existuje navyše interakcia medzi kruhom C a indolovým jadrom tryptofánu, na ktorej sa podieľajú π elektróny (Tu et al., 2015; Ding a Peng, 2015).

Fenolové (aromatické hydroxylové) skupiny hrajú dôležitú úlohu pri väzbe flavonoidu na albumín a pri zmene jeho sekundárnej štruktúry. Flavonoid vstupuje do dutiny, kde sa viaže pomocou vodíkových väzieb. Tieto väzby vznikajú medzi hydroxylovými skupinami a skupinami C=O a N-H, ktoré sú súčasťou hlavného polypeptidového reťazca a spôsobujú zmenu α -helixovej štruktúry albumínu (Xie et al., 2005).

Interakcie medzi flavonoidmi a albumínom predurčujú ich biologickú dostupnosť a toxikológiu. Vzájomné naviazanie albumínu a jednotlivých flavonoidov sa môže hodnotiť pomocou fluorescenčnej spektroskopie. Podmienkou pre to, aby látka vykazovala

fluorescenciu je prítomnosť tzv. fluoroforov. Albumín obsahuje 3 fluorofory, ktoré prispievajú k fluorescencii. Sú to zvyšky aminokyselín, a to fenylalanín, tryptofán, a tyrozín, pričom tryptofán zohráva najdôležitejšiu úlohu a vzhľadom na jeho vysokú citlivosť sa používa ako cieľový prvok pri skúmaní (Ding a Peng ,2015; Liu et al., 2014).

Pri skúmaní intenzity fluorescencie sa zistilo, že pri postupnom zvyšovaní koncentrácie flavonoidov dochádza k znižovaniu fluorescencie (Príloha 3). Keď je dosiahnutý pomer komplexu albumín:flavonoid 1:1, tento komplex viac nevykazuje fluorescenciu. Z toho možno usúdiť, že molekuly flavonoidov sa viažu v blízkosti tryptofánu, a tým dochádza k zhasaniu fluorescencie. Po naviazaní flavonoidov dochádza k zmene terciálnej štruktúry proteínu, a teda aj k zmene molekulárnej konformácie (Liu et al., 2014; Cao et al., 2011).

Ako bolo uvedené vyššie, schopnosť flavonoidov naviazať sa na albumín súvisí primárne s ich štruktúrou. Logicky je tomu tak aj u flavanónov: voľná hydroxylová skupina na uhlíku C₇ naviazaná na kruhu A hesperetínu a naringenínu spôsobuje zvýšenie afinity k albumínu, v porovnaní s hesperidínom a naringínom, ktoré majú na uhlíku C₇ naviazanú cukornú zložku. Vyplýva to z väzbových konštánt zistených u jednotlivých látok, kedy aglykóny majú rádovo vyššie hodnoty ako príslušné glykozidy (Tab. 10). Voľná hydroxylová skupina môže interagovať so zvyškami aminokyselín nachádzajúcimi sa na povrchu albumínu a vytvárať s nimi vodíkové väzby, čím dochádza k zvýšeniu afinity. Naviazaním sacharidu na túto hydroxylovú skupinu sa molekula flavonoidu značne zväčší, čo má za následok, že je ťažšie prístupná pre naviazanie sa do dutiny. Rovnako tak polárny sacharid má negatívny vplyv na orientáciu molekuly vo vzťahu k hydrofóbnemu prostrediu albumínu (Liu et al., 2014).

Tabuľka 10: Hodnoty väzbových konštánt (K_a) a počet väzbových miest (n) pre jednotlivé flavonoidy.

	K_a	n
Hesperetín	$5,59 \cdot 10^5$	1,08
Hesperidín	$2,50 \cdot 10^3$	0,74
Naringenín	$3,04 \cdot 10^5$	1,06
Naringín	$8,70 \cdot 10^2$	0,63

Bližšie vysvetlenie K_a a n je v Prílohe č. 4.

Údaje prevzaté z Tab. 2, z publikácie Liu et al., 2014.

Vzrastajúci počet hydroxylových skupín na kruhoch A a B je spojený s rastúcou afinitou flavanónov k albumínu. Na druhej strane, glykozylácia znižuje afinitu k albumínu kvôli veľkosti a zvýšeniu polaritu. Metylácia citrusových flavanónov na uhlíku 3' zvyšuje afinitu k albumínu. Naviazaním metylovej skupiny na hydroxyl sa zvýši lipofilita flavanónu, ktorá zohráva dôležitú úlohu vo väzbe na albumín. Toto zníženie polaritu má za následok to, že molekula flavanónu môže ľahšie preniknúť do hydrofóbnej dutiny proteínu, ktorá je za normálnych okolností ukrytá, pretože štruktúra albumínu je komplikovane usporiadaná.

Afinita flavónu apigenínu k albumínu je asi 10 000–krát vyššia než afinita naringenínu. Tento fakt má za následok konjugácia dvojitej väzby so 4-oxo skupinou, ktorá zvyšuje afinitu k albumínu. Rozdiel medzi flavónmi a flavanónmi je práve v prítomnosti dvojitej väzby v polohe 2,3 (Cao et al., 2011; Liu et al., 2014).

Konjugované metabolity flavanónov sú tiež viazané na albumín. Skúmané boli niektoré glukuronidované metabolity. Zistilo sa, že v porovnaní s naringenínom a hesperetínom, glukuronidácia len slabo destabilizuje komplex flavanón-albumín, pričom tento účinok je o niečo silnejší pri glukuronidácii kruhu B. Väzbové konštanty naringenín-4'-O-β-D-glukuronidu a hesperetín-3'-O-β-D-glukuronidu sú trochu nižšie než tie, ktoré prislúchajú naringenín-7-O-β-D-glukuronidu a hesperetín-7-O-β-D-glukuronidu (Tab. 11), (Khan et al., 2011).

Tabuľka 11 : Väzbové konštanty (K) vybraných ligandov ľudskeho albumínu.

	K		K
Hesperetín	$5,9 \cdot 10^3$	Naringenín	$10,4 \cdot 10^3$
Hesperetín-3'-O-β-D-glukuronid	$3,0 \cdot 10^3$	Naringenín-4'-O-β-D-glukuronid	$4,6 \cdot 10^3$
Hesperetín-7-O-β-D-glukuronid	$9,2 \cdot 10^3$	Naringenín-7-O-β-D-glukuronid	$8,0 \cdot 10^3$

Vlastné spracovanie podľa Khan et al., 2011.

Distribučné objemy zistené po podaní 135mg hesperetínu a naringenínu, teda flavanónov vo forme čistých aglykónov, boli 143,78 litrov pre hesperetín a 47,37 litrov pre naringenín (Kanaze et al., 2007).

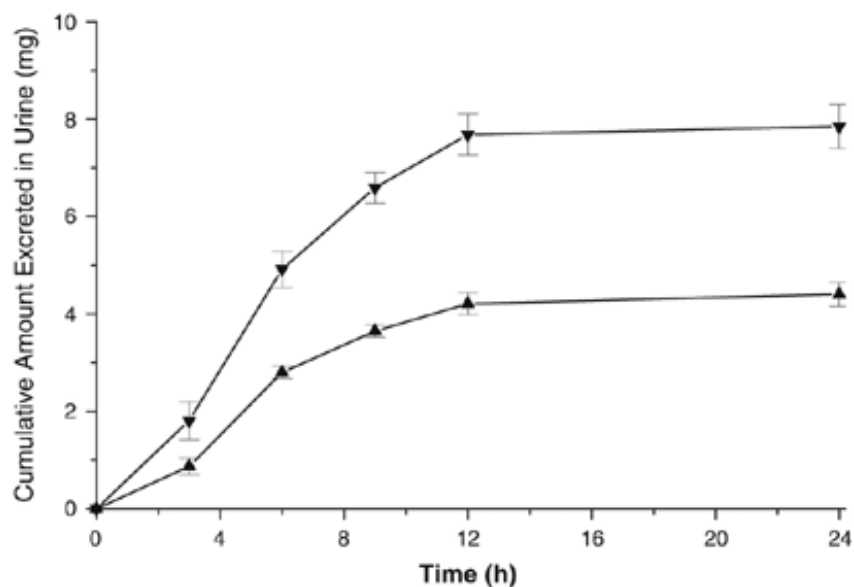
5.5 Exkrécia

Za hlavný eliminačný orgán sa vo všeobecnosti považujú obličky. Aj flavonoidy sú z organizmu vylučované najmä do moču. Rovnako ako v plazme, tak aj v moči sa flavanóny nachádzajú takmer výhradne v konjugovaných formách. Ide hlavne o glukuronidy alebo sulfoglukuronidy. V starších štúdiách bolo nutné pred identifikáciou a kvantifikáciou hesperetínu a naringenínu ich konjugáty s kyselinou glukuronidovou a kyselinou sírovou najprv podrobiť enzymatickej reakcii, aby došlo k uvoľneniu príslušných aglykónov, ktoré možno potom stanoviť. Na hydrolýzu glukuronidov a sulfátov sa používajú enzýmy glukuronidázy alebo sulfatázy. β-glukuronidáza štiepi zároveň β-glukuronidy aj β-glukozidy (Ameer et al., 1996; Erlund et al., 2001; Manach et al., 2003).

Ako pri absorpcii, tak aj pri vylučovaní zohráva významnú úlohu forma, v akej sú flavanóny prijímané. Čas, za ktorý sa flavanóny začnú vylučovať a doba, v ktorej dochádza k maximálnemu vylučovaniu sa líši podľa toho, či sú zlúčeniny podávané vo forme glykozidov, alebo aglykónov. Platí, že po podaní čistých aglykónov dochádza k vylučovaniu už v intervale 0-3 hodín od požitia a k maximálnemu vylučovaniu metabolitov dochádza asi po 4,5 hodine od konzumácie zlúčenín. Konzumácia flavanónov vo forme glykozidov, teda aj konzumácia pomarančovej a grapefruitovej šťavy má za

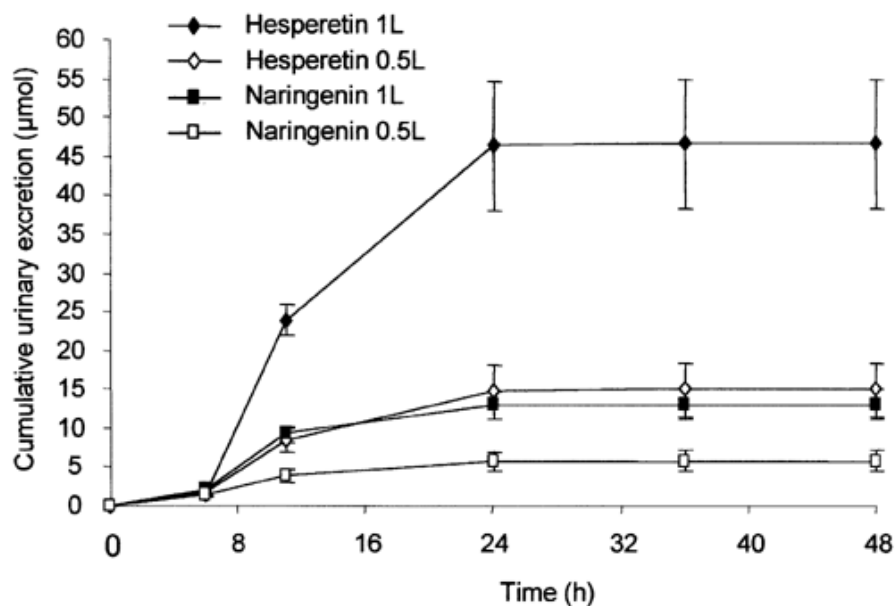
následok, že k vylučovaniu dochádza neskôr. Väčšinou až po 6 hodinách od konzumácie ovocných štiav a k maximálnemu vylučovaniu dochádza v priebehu 6-11 hodín (Erlund et al., 2001; Kanaze et al., 2007; Manach et al., 2003).

Pre porovnanie sú uvedené nasledujúce obrázky, kde možno vidieť, že renálne vylučovanie po podaní čistých aglykónov (Obr. 23) začína skôr, než po podaní šťavy (Obr. 24).



Obrázok 23: Krivky kumulatívneho renálneho vylučovania hesperetínu (▲) a naringenínu (▼) po jednorazovom podaní 135 mg čistých aglykónov.

Obrázok prevzatý z Kanaze et al., 2007.



Obrázok 24: Krivky kumulatívneho renálneho vylučovania hesperetínu (H) a naringenínu (N) po podaní 0,5 l alebo 1 l pomarančovej šťavy (PŠ).

Obsah aglykónov v podávanej PŠ: 0,5 litra PŠ: 363,5 µmol H (109,9 mg H); 1 liter PŠ: 727,7 µmol H (219,9 mg H); 0,5 litra PŠ: 83,0 µmol N (22,6 mg N); 1 liter PŠ: 166,1 µmol N (45,2mg N).

Obrázok prevzatý z Manach et al., 2003.

Relatívne renálne vylučovanie, vyjadrené ako percentuálny podiel množstva vylúčených metabolitov do moču vzhľadom na podanú dávku, je možné považovať za indikátor miery absorpcie len v prípade, že zanedbáme ďalšie možné spôsoby vylučovania. Renálne vylučovanie môže byť ovplyvnené viacerými faktormi. Vysoká koncentrácia zlúčenín v plazme má za následok zníženie reabsorpcie v obličkách, a tým aj rýchlejšie vylučovanie. Ďalšími faktormi ovplyvňujúcimi vylučovanie sú: väzba na plazmatické bielkoviny, kedy zlúčeniny nena viazané na bielkoviny sú vylučované rýchlejšie, prietok moču obličkami a pH moču (Erlund et al., 2001; Manach et al., 2003).

Veľkosť dávky nemá výrazný vplyv na hodnoty relatívneho renálneho vylučovania, ktoré je vyjadrené ako percentuálny podiel vylúčených metabolitov vzhľadom na podanú dávku. Ovplyvňuje skôr celkové množstvo vylúčených látok, kedy po podaní 1 litra šťavy boli tieto hodnoty približne dvojnásobne vyššie, než po podaní 0,5 litra (Tab. 12). K tomuto záveru dospeli v štúdiu, ktorej sa zúčastnilo päť zdravých dobrovoľníkov, ktorým bol v dvoch rôznych dňoch podávaný 1 liter a 0,5 litra pomarančovej šťavy. Hodnota relatívneho renálneho vylučovania naringenínu bola pri podaní 0,5 litra ($7,11 \pm 1,86\%$) a 1

litra ($7,87 \pm 1,69\%$) skoro zrovnateľná. Pre hesperetín, bol rozdiel medzi percentuálnym vylučovaním po podaní 1 litra ($6,41 \pm 1,32\%$) a po podaní 0,5 litra ($4,13 \pm 1,18\%$) trochu väčší (Kanaze et al., 2007; Manach et al., 2003).

Tabuľka 12: Hodnoty celkového a relatívneho renálneho vylučovania hesperetínu a naringenínu.

	Hesperetín		Naringenín	
	0,5 l šťavy	1 l šťavy	0,5 l šťavy	1 l šťavy
Prijatá dávka (mg)	109,9 ± 3,7	219,9 ± 7,4	22,6 ± 1,9	45,2 ± 4,0
Celkové renálne vylučovanie (mg)	4,54 ± 1,06	14,10 ± 2,36	1,60 ± 0,34	3,56 ± 0,63
Relatívne renálne vylučovanie (%)	4,13 ± 1,18	6,41 ± 1,32	7,11 ± 1,86	7,87 ± 1,69

Hodnoty prevzaté z Tab. 1, z publikácie Manach et al., 2003.

Na vylučovanie môže mať vplyv aj súčasné podávanie potravy bohatej na tuky. Zdá sa, že tuky majú väčší vplyv na viac hydrofóbne flavonoidy, než na polárne. V tejto súvislosti boli študované aj flavanóny, kedy sa sledoval vplyv podávania jogurtu na ich vylučovanie a na biologickú dostupnosť (Mullen et al., 2008a; Roowi et al., 2009; Scheidt et al., 2004). Mullen a kol. (2008a) podával subjektom plnotučný jogurt (3,8%) spolu s pomarančovou šťavou obsahujúcou 102,6 mg hesperetín-7-*O*-rutinosidu. Jogurt nemal vplyv c_{max} ani T_{max} hesperetín-7-*O*-glukuronidu a hesperetín-3'-*O*-glukuronidu. Teda neovplyvnil absorpciu. Ovplyvnená bola však renálna exkrécia metabolitov v prvom časovom intervale (0-5 h), kedy jogurt výrazne znížil vylučovanie týchto metabolitov. No neboli pozorované rozdiely v exkrécii v intervale 0-24 h. Jogurt nemá vplyv na vyprázdňovanie žalúdka ani na prechod jedla z ústnej dutiny do čreva, ako tomu bolo v inej štúdii Mullena a kol. (2008b). Ten podával subjektom jahody obsahujúce antokyány spolu s krémom, ktorý obsahoval 48% tuku. Došlo pri tom k zníženiu T_{max} a zníženiu renálneho vylučovaniu metabolitov, navyše došlo aj k spomaleniu vyprázdňovania žalúdka. Bolo tomu tak kvôli vyššiemu obsahu tuku v podávanom kréme (48%) než v jogurte (3,8%).

HPLC analýzou sa podarilo identifikovať metabolity vylúčené močom. Štúdie sa zúčastnilo 12 dobrovoľníkov, ktorým bola podaná pomarančová šťava obsahujúca 584 μmol polyfenolických zlúčenín, pričom 537 μmol tvorili flavanóny. V moči sa nachádzal hesperetín-3'-*O*-glukuronid, hesperetín-7-*O*-glukuronid, hesperetín-3',7-*O*-diglukuronid, hesperetín-5,7-*O*-diglukuronid, hesperetín-3',5-*O*-diglukuronid, hesperetín-3'-*O*-sulfát, hesperetín-*O*-glukuronid-*O*-sulfát, naringenín-4'-*O*-glukuronid, naringenín-7-*O*-glukuronid, naringenín-4',5-*O*-diglukuronid, naringenín-5,7-*O*-diglukuronid, naringenín-4',7-*O*-diglukuronid. Najväčšiu časť metabolitov tvorili hesperetín-*O*-glukuronidy, naringenín-*O*-glukuronidy a hesperetín-3'-*O*-sulfát (Bredsdorff et al., 2010; Pereira-Caro et al., 2014).

Množstvá hlavných metabolitov vylúčených v moči sú zhrnuté v nasledujúcej Tab. 13.

V moči sa nachádzajú tiež produkty katabolického odbúravania flavonoidov vo forme fenolických zlúčenín. V prvých dvoch hodinách od podania dochádza len k minimálnemu vylučovaniu katabolitov. Po 4 h sú detegované nasledujúce zlúčeniny: 3-(3'-hydroxy-4'-metoxyfenyl)hydrakrylová kyselina, 3-(3'-hydroxy-4'-metoxyfenyl)propiónová kyselina, 3-(3'-metoxy-4'-hydroxyfenyl)propiónová kyselina a 3'-hydroxyhippurová kyselina. Tieto produkty sa nachádzajú v moči len po podaní pomarančovej šťavy, ale nie po konzumácii placebo nápoja. Po požití oboch nápojov boli nájdené: 3-(3'-hydroxyfenyl)hydrakrylová kyselina, 4-hydroxybenzoová kyselina, 3-metoxy-4-hydroxyfenyloctová kyselina, 4-hydroxyfenyloctová kyselina, hippurová kyselina a 4'-hydroxyhippurová kyselina (Pereira-Caro et al., 2014).

Okrem renálneho vylučovania existujú aj iné spôsoby vylučovania. Flavanóny, ktoré sa z tráviaceho traktu dostanú do pečene, sú premenené na príslušné metabolity. Tieto metabolity môžu byť spätne vedené žľou do tenkého čreva, odkiaľ sú vylúčené do stolice (Crozier et al., 2010; Erlund et al., 2001). Tento spôsob vylučovania je u ľudí len veľmi málo preskúmaný, pretože prioritne dochádza k eliminácii prostredníctvom obličiek. No pri použití potkanov ako testovaných subjektov sa zistilo, že flavanóny sú vylučované žľou prevažne vo forme glukuronidov. Aglykóny nie sú vylučované týmto spôsobom. Glukuronidáciou sa zvýši molekulovú hmotnosť a zároveň aj polarita molekuly. To je dôležitým predpokladom toho, aby opätovne nedošlo k reabsorbovaniu do systémovej cirkulácie (Hackett et al., 1979).

Tabuľka 13: Identifikácia a kvantifikácia flavanónov v podanej pomarančovej šťave (PŠ) a hlavných metabolitov hesperetínu, a naringenínu vylúčených v moči.

Flavanóny identifikované v PŠ	
Typ	Množstvo (μmol)
Naringenín-7- <i>O</i> -rutinozid	114
Hesperetín-7- <i>O</i> -rutinozid	329
4'- <i>O</i> -metyl-naringenín-7- <i>O</i> -rutinozid	19
Naringenín-7- <i>O</i> -rutinozid-4'- <i>O</i> -glucozid	51
Hesperetín-7- <i>O</i> -rutinozid-3'- <i>O</i> -glukozyd	19
Metabolity hesperetínu identifikované v moči	
Typ	Množstvo (μmol)
Hesperetín- <i>O</i> -diglukuronid	9,9 \pm 3,4
Hesperetín- <i>O</i> -sulfát- <i>O</i> -glukuronid	7,7 \pm 2,6
Hesperetín- <i>O</i> -sulfát- <i>O</i> -glukozyd	1,6 \pm 0,7
Hesperetín-7- <i>O</i> -glukuronid	4,7 \pm 1,6
Hesperetín-3'- <i>O</i> -glukuronid	19,0 \pm 6,5
Hesperetín-3'- <i>O</i> -sulfát	18,2 \pm 7,3
Metabolity naringenínu identifikované v moči	
Typ	Množstvo (μmol)
Naringenín- <i>O</i> -diglukuronid	2,5 \pm 0,7
Naringenín-4'- <i>O</i> -diglukuronid	9,7 \pm 2,8
Naringenín-7- <i>O</i> -glukuronid	9,2 \pm 2,1

Hodnoty prevzaté z Pereira-Caro et al., 2014.

V nasledujúcich tabuľkách sú zhrnuté výsledky štúdií, ktoré sa zaoberali renálnym vylučovaním flavanónov – hesperetínu (Tab. 14) a naringenínu (Tab. 15).

Tabuľka 14: Hodnoty renálneho vylučovania hesperetínu.

Vek	Podaná látka	Prijatá dávka		Renálna klírens	Celkové renálne vylučovanie		Relatívne renálne vylučovanie	Zdroj
26±5	PŠ	417±86 µmol	126 ± 26 mg	2,4 ± 0,5 L/h	22,3 ± 16,7 µmol	6,74 ± 5,06 mg	5,3 ± 3,1	Erlund et al., 2001.
25 ± 1	PŠ	363,5 ± 12,2 µmol	109,9 ± 3,7 mg	-	15,0 ± 3,5 µmol	4,54 ± 1,06 mg	4,13 ± 1,18	Manach et al., 2003.
25 ± 1	PŠ	727,7 ± 24,6 µmol	219,9 ± 7,4 mg	-	46,7 ± 7,80 µmol	14,10 ± 2,36 mg	6,41 ± 1,32	Manach et al., 2003.
25 ± 5	čistý aglykón	-	135 mg	497,42 ± 138,36 ml/min	-	-	3,26 ± 0,44	Kanaze et al., 2007.

Tabuľka 15: Hodnoty renálneho vylučovania naringenínu.

Vek	Podaná látka	Prijatá dávka		Renálna klírens	Celkové renálne vylučovanie		Relatívne renálne vylučovanie	Zdroj
26 ± 5	GŠ	731 ± 155 µmol	199 ± 42 mg	8,4 ± 1,5 l/h	223,0 ± 180,0 µmol	60,78 ± 48,99 mg	30,2 ± 25,5	Erlund et al., 2001.
26 ± 5	PŠ	85 ± 7 µmol	23 ± 2 mg	0.4 ± 0.2 L/h	1,1 ± 0,87 µmol	0,29 ± 0,24 mg	1,1 ± 0,8	Erlund et al., 2001.
25 ± 1	PŠ	83,0 ± 7,7 µmol	22,6 ± 1,9 mg	-	5,9 ± 1,3 µmol	1,60 ± 0,34 mg	7,11 ± 1,86	Manach et al., 2003.
25 ± 1	PŠ	166,1 ± 15,6 µmol	45,2 ± 4,0 mg	-	13,1 ± 2,3 µmol	3,56 ± 0,63 mg	7,87 ± 1,69	Manach et al., 2003.
25 ± 5	Čistý aglykón	-	135 mg	258,57 ± 92,51 ml/min	-	-	5,81 ± 0,81	Kanaze et al., 2007.

6 Interakcie

Veľmi často sa môžeme stretnúť s interakciami medzi liečivami a podávanou potravou. Obzvlášť dôležité je zaoberať sa týmito interakciami v prípade, ak dôjde k zmene plazmatických koncentrácií liečiv. Interakcie medzi flavanónmi a liečivami možno rozdeliť do troch skupín, podľa spôsobu ovplyvnenia biologickej dostupnosti.

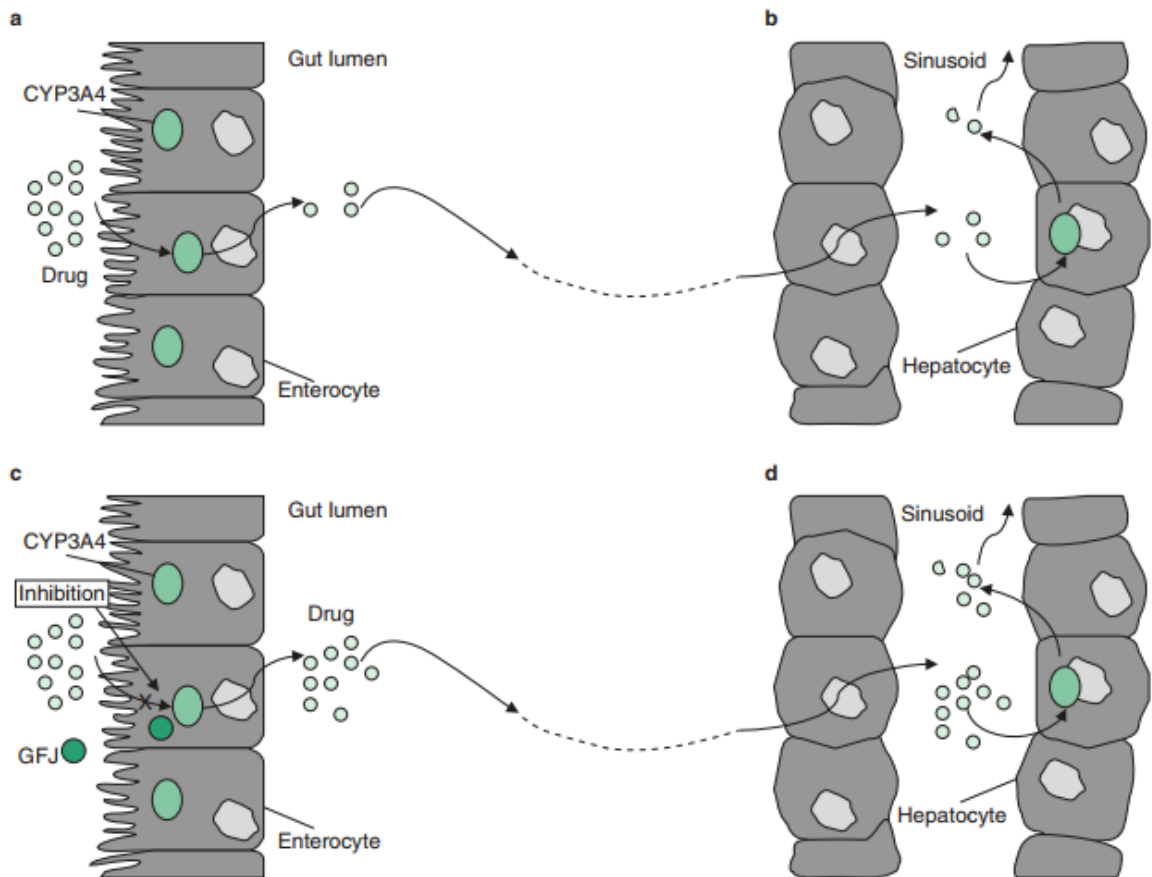
Môže ísť o interakcie na:

- cytochróme,
- efluxných transportéroch,
- influxných transportéroch,
- iné.

V niektorých prípadoch dochádza interakciám na viacerých úrovniach. Ďalej budú rozobrané jednotlivé možnosti a na záver budú zhrnuté v tabuľke.

V poslednej dobe bolo vykonaných viacero štúdií, ktoré sa zaoberali týmito interakciami a bolo pozorované, že pri podávaní grapefruitovej/pomarančovej šťavy došlo k zvýšeniu biologickej dostupnosti viacerých liečiv. Výsledkom toho boli vyššie plazmatické koncentrácie liečiv v organizme s následnými prejavmi nežiaducich účinkov daných liečiv. Asi prvým bolo odhalenie interakcie u pacientov trpiacich hypertenziou, ktorí užívali felodipín. Pôvodne bola táto štúdia zameraná na vysvetlenie interakcií medzi felodipínom a etanolom, pričom grapefruitová šťava bola použitá len na maskovanie nepríjemnej chuti etanolu. Zistilo sa, že pri podávaní felodipínu a etanolu (spolu s grapefruitovou šťavou) došlo u pacientov k výraznejšiemu zníženiu krvného tlaku, zvýšeniu srdcovej frekvencie a vyššiemu výskytu ortostatickej hypotenzie než u pacientov, ktorým bol podávaný len felodipín. Zdá sa, že k interakciám dochádza najmä na presystémovej úrovni, pretože po perorálnom podaní grapefruitovej šťavy došlo k zvýšeniu c_{\max} a AUC, no podanie grapefruitovej šťavy neovplyvnilo farmakokinetiku intravenózne podaného felodipínu (Bailey et al., 1989; Bailey et al., 1998b; Lundahl et al., 1997).

6.1 Interakcie na cytochróme P450



Obrázok 25: Schématické zobrazenie first-pass efektu v tenkom čreve a v pečeni.

Pôsobenie cytochrómu P450 bez grapefruitovej šťavy (GŠ) v tenkom čreve (a) a v pečeni (b); a v prítomnosti GŠ v tenkom čreve (c) a v pečeni (d). V prípade (c) a (d) je first-pass efekt inhibovaný GŠ, liečivo môže vo väčšej miere prestúpiť do pečene a odtiaľ vstúpiť do systémového obehu a stať sa biologicky viac dostupné (GŠ/GFJ, grapefruitová šťava).

Obrázok prevzatý z Seden et al., 2010.

Flavonoidy obsiahnuté v grapefruitovej šťave sú polyfenolické látky, ktoré obsahujú množstvo elektrónov, čo ich predurčuje byť vhodnými inhibítormi cytochrómu. Účinok grapefruitovej šťavy na metabolizmus liečiv závisí na ich povahe. Obecne má grapefruitová šťava väčší vplyv na liečivá, ktoré väčšmi podliehajú tzv. „first-pass“ efektu. Hlavný mechanizmus, ktorým grapefruitová šťava inhibuje cytochróm P450, je jeho rýchla a nevratná inhibícia, ktorá trvá aj dlhšiu dobu po podaní grapefruitovej šťavy. V štúdiu sa deviatim zdravým dobrovoľníkom podávala grapefruitová šťava 1, 4, 10 alebo 24 hodín pred užitím felodipínu, alebo súčasne s ním. S rastúcim časovým intervalom medzi

podaním šťavy a liečiva, síce klesala miera účinku na cytochróm, ale stále bola markantná. K zvýšeniu plazmatických hladín felodipínu došlo aj keď bola grapefruitová šťava podaná 24 hodín pred felodipínom. Tento predĺžený účinok súvisí s ireverzibilnou inhibíciou a potrebou syntézy enzýmov/transportérov *de novo*. Pravdepodobne, tiež môže dochádzať k degradácii cytochrómových enzýmov alebo dochádza k zníženiu ich translácie z mRNA. Proces transkripcie, teda prepis z molekúl DNA na mRNA, ostáva neovplyvnený (Bressler et al., 2006; Kane et al., 2000; Kiani et al., 2007; Lundahl et al., 1995). Potvrďuje to aj štúdia Lowna et al. (1997), kedy po podaní grapefruitovej šťavy desiatim zdravým dobrovoľníkom došlo k zníženiu koncentrácie CYP3A4, ale nepreukázalo sa príslušné zníženie množstva mRNA pre CYP3A4.

Primárne dochádza k inhibícii cytochrómu v tenkom čreve. Konzumácia grapefruitovej šťavy v množstve 3 poháre na deň po dobu 6 týždňov, má za následok down-reguláciu CYP3A4 v enterocytoch tenkého čreva, pričom znižujúca sa koncentrácia CYP3A4 v enterocytoch korešponduje so zvýšenou c_{max} felodipínu. Nedochádza však k ovplyvneniu množstva ani aktivity cytochrómu v hrubom čreve ani v pečeni. Účinok grapefruitovej šťavy na farmakokinetiku intravenózne podaného erytromycínu poukazuje na to, že zložky grapefruitovej šťavy sa vstrebajú v dostatočnom množstve na to, aby ovplyvnili aj aktivitu pečeneňových enzýmov. Platí, že pre inhibíciu cytochrómu v pečeni je potrebné väčšie množstvo grapefruitovej šťavy, t.j. 6-8 pohárov denne po dobu niekoľkých týždňov, alebo je potrebná konzumácia grapefruitovej šťavy o dvojnásobnej koncentrácii trikrát denne po dobu troch dní (Kane et al., 2000; Lown et al., 1997).

Grapefruitová šťava obsahuje mnoho zložiek s potenciálnym inhibičným účinkom, ako sú flavonoidy (napr. naringín, naringenín) či neflavonoidy. Cieľom viacerých štúdií bolo zistiť hlavnú zložku, ktorá je zodpovedná za spomínané interakcie. Najviac zastúpeným flavanómom v grapefruitovej šťave je naringín, ktorý však v *in vitro* pokusoch nevykázal žiadnu inhibičnú aktivitu na ľudský cytochrómový systém. Avšak, jeho aglykón – naringenín sa *in vitro* javí ako potenciálny inhibítor izoforiem CYP3A a CYP1A2. Ďalšími *in vitro* preukázanými inhibítormi cytochrómu sú dva furanokumaríny, bergamotín a 6', 7'- dihydroxybergamotín (Kane et al., 2000; Paine et al., 2004; Paine et al., 2005).

Pokusy *in vivo* však ukázali, že inhibícia CYP3A4 prostredníctvom naringenínu nie je tak silná ako sa predpokladalo. Naringín nebol schopný inhibovať cytochróm natoľko, aby došlo k ovplyvneniu farmakokinetiky súčasne podávaných liečiv. Prekvapením to nie je

pre izoformu CYP1A2, ktorá sa vo väčšej miere nachádza v pečeni a naringenín, ktorý vznikne po rozštiepení perorálne podaného narignínu, sa len vo veľmi malom množstve dostane do plazmy (Bailey et al., 1993a; Bailey et al., 1993b; Kane et al., 2000).

Slabý inhibičný účinok naringenínu môže tiež súvisieť s jeho štruktúrou. Je známe, že interakcie medzi substrátmi a enzýmami sú stereošpecifické a výsledná enzymatická odpoveď ako aj účinnosť je často viazaná na určitý enantiomér. Mnoho flavonoidov, nachádzajúcich sa bežne v prírode, sa vyskytuje vo forme racemickej zmesi, pričom jeden enantiomér väčšinou prevažuje. Naringenín je opticky aktívny flavonoid, ktorý obsahuje chirálne centrum na C₂ a v závislosti na podanej dávke je schopný inhibovať viacero izoformiem cytochrómu P450, ako CYP19, CYP2C9, CYP2C19 a CYP3A. Pri podaní čistých (*R*)- alebo (*S*)-foriem dochádza k inhibícii určitých izoformiem cytochrómu, ktorá korešponduje s podanou látkou. Zatiaľ čo (*S*)-naringenín je asi dvakrát účinnejší inhibítor CYP19 a CYP2C19, (*R*)-naringenín vykazuje dvojnásobne vyšší inhibičný potenciál voči CYP2C9 a CYP3A. Hodnoty IC₅₀ pre racemickú zmes naringenínu sa nachádzajú v strede medzi hodnotami pre čisté enantioméry (Tab. 16). Tieto výsledky dokazujú, že čisté enantioméry sú schopné selektívne inhibovať jednotlivé izoformy cytochrómu.

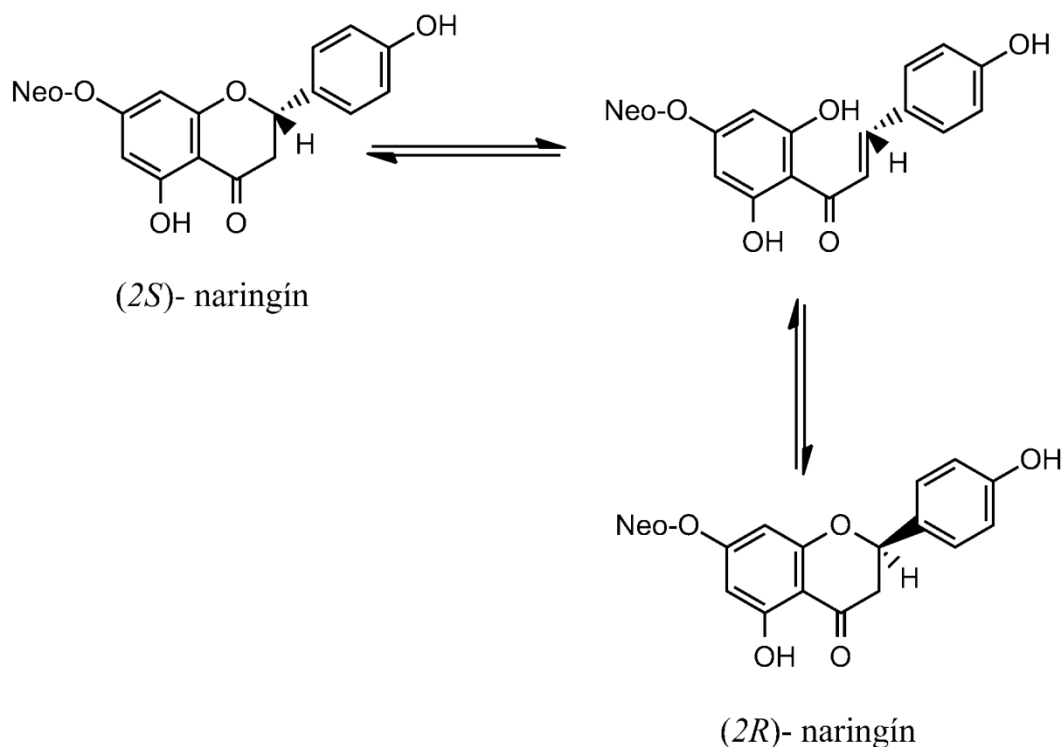
Tabuľka 16: Hodnoty IC₅₀ naringenínu pre inhibíciu jednotlivých izoformiem CYP450.

	CYP19	CYP2C9	CYP2C19	CYP3A
racemát	2,0 μmol	2,6 μmol	2,6 μmol	17,6 μmol
(<i>R</i>)-naringenín	2,8 μmol	1,6 μmol	4,9 μmol	9,7 μmol
(<i>S</i>)-naringenín	1,4 μmol	3,4 μmol	1,2 μmol	21,4 μmol

Vlastné spracovanie podľa Lu et al., 2011.

Výsledky tejto *in vitro* štúdie s čistými (*R*)- alebo (*S*)- enantiomérmi nemožno však presne aplikovať na *in vivo* systémy, pretože nie je úplne jasné, či aj v ľudskom organizme môže dochádzať k ich konverzii. Preto je ťažké odhadnúť možný inhibičný účinok grapefruitu a iných štiav na jednotlivé typy cytochrómu, a s tým súvisiace interakcie s liečivami. Je však potrebné zmieniť, že naringín, prekursor naringenínu, sa v grapefruitoch, horkom pomaranči a pomele vyskytuje ako (*2S*)- a (*2R*)- diastereoizomér, pričom prevláda jeho (*2S*)- forma (Lu et al., 2011). No v priebehu macerácie, kedy je etanolický roztok (*2S*)-

naringínu skladovaný pri izbovej teplote po dobu niekoľkých mesiacov, postupne dochádza k zmene (2*S*)- naringínu na (2*R*)- formu (Obr. 26, Caccamese et al., 2007).



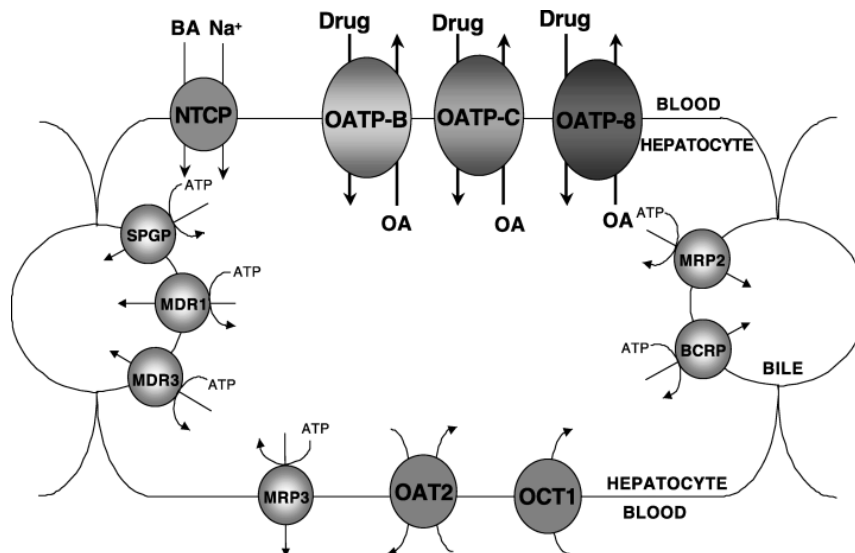
Obrázok 26: Konverzia (2*S*)- naringínu na (2*R*)- naringín v dôsledku otvorenia kruhu a neenzymetickej racemizácie na C₂.

Obrázok prevzatý z Caccamese et al., 2007.

Zdá sa, že za inhibičný vplyv grapefruitovej sú pravdepodobne zodpovedné furanokumaríny. Potvrdzujú to nasledujúce dve štúdie. Prvou je pomerne nová, randomizovaná, dvojito zaslepená, cross-over štúdia z roku 2016, v ktorej sa *in vivo* sledoval vplyv grapefruitovej šťavy so zníženým obsahom furanokumarínov na farmakokinetiku midazolamu. Dvanástim zdravým dobrovoľníkom bola podávaná normálna grapefruitová šťava, grapefruitová šťava so zníženým obsahom furanokumarínov a voda ako kontrolná vzorka. V druhej štúdii sa osemnástim subjektom podávala grapefruitová šťava, z ktorej boli furanokumaríny z 99% odstránené. Výsledky oboch štúdií preukázali, že po požití normálnej grapefruitovej šťavy došlo k inhibícii cytochrómu, a tým aj k zvýšeniu biologickej dostupnosti súčasne podávaných liečiv, zatiaľ čo po podaní upravených štiav k ovplyvneniu cytochrómu nedošlo (Kawaguchi-Suzuki et al., 2017; Paine et al., 2006).

6.2 Interakcie na prenášačoch

Kľúčovým faktorom pre pohyb liečiv v organizme sú, okrem iných, dôležité aj prenášače. Nedávne štúdie ukázali, že riadený pohyb liečiv v jednotlivých orgánoch, ako sú gastrointestinálny trakt, pečeň a obličky, vyžaduje prítomnosť a súčinnosť influxných a efluxných transportérov. Umiestnenie týchto prenášačov na špecifických membránových doménach môže ovplyvňovať biologickú dostupnosť perorálne podávaných liečiv a mieru ich renálneho alebo hepatálneho vylučovania. Príkladom môžu byť influxné prenášače nachádzajúce sa na bazolaterálnej doméne hepatocytov (Obr. 27), ktoré sprostredkovávajú hromadenie liečiva v bunke, zatiaľ čo efluxné prenášače sú zodpovedné za exkréciu liečiv do žlče (Kim et al., 2003).



Obrázok 27: Prenášače v pečeni, na ktorých môže dochádzať k inerakciám.

Obrázok prevzatý z Kim et al., 2003.

6.2.1 Efluxné prenášače

Existujú dva hlavné druhy transportérov. Medzi najznámejšie patrí rodina prenášačov ATP-binding cassette (ABC). Pôsobia ako efluxné transportéry a sú schopné prenášať širokú škálu xenobiotík z intracelulárneho prostredia do extracelulárneho prostredia proti koncentračnému spádu za využitia energie získanej z ATP. Dôležitou súčasťou je P-glykoproteín (ABCB) rodina. Skladá sa z MDR1 alebo P-glykoproteínu (multidrug resistance protein 1), BSEP (bile salt export pump), MRP (multidrug resistant associated protein) a BCRP (breast cancer resistance protein). MDR1 bol prvýkrát objavený

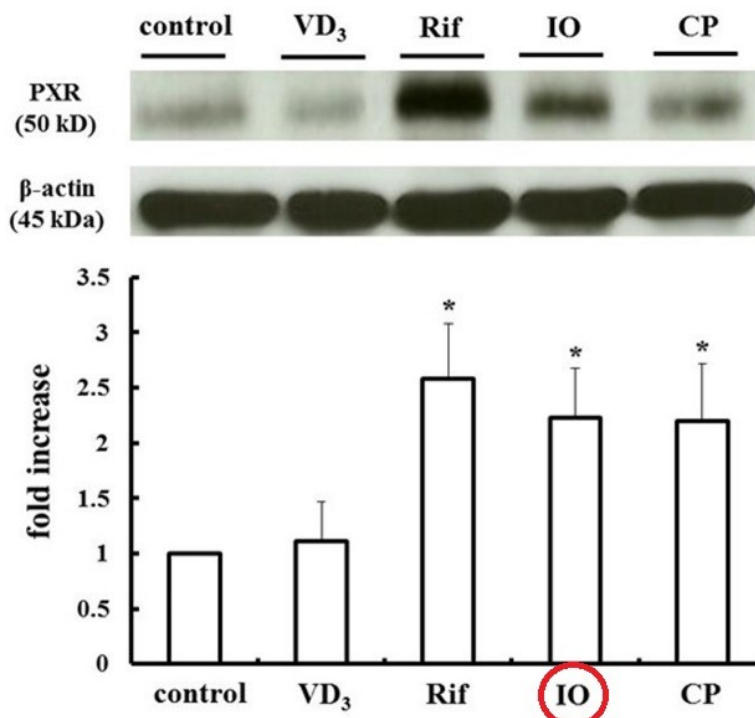
v nádorových bunkách a bol zodpovedný za skríženú rezistenciu na viaceré liečivá. MDR1 bol neskôr nájdený aj v normálnych tkanivách, ako napríklad v tenkom čreve, pečeni, obličkách, hematoencefalickej bariére. MDR1 je lokalizovaný na luminálnej strane enterocytov, kde umožňuje spätný transport už absorbovaných liečiv a v pečeni, presnejšie na membráne žľových kanálikov, kde uľahčuje prestup liečiva do žlče. Výsledkom toho je, že MDR1 prostredníctvom first-pass efektu znižuje biologickú dostupnosť perorálne podávaných liečiv.

Spoločný výskyt CYP3A4 a MDR1 v čreve a v pečeni poukazuje na jednotné obranné mechanizmy namierené proti absorpcii liečiv, avšak deje sa to prostredníctvom rôznych prostriedkov. Vo viacerých prípadoch vykazujú CYP3A4 a MDR1 prekrývajúcu sa substrátovú špecifickosť. Výsledkom ich vzájomného pôsobenia je zníženie biologickej dostupnosti liečiv. Príkladom môže byť malá biologická dostupnosť niektorých perorálne podávaných antirejekčných liekov (cyklosporín, takrolimus, serolimus). MDR1 vykazuje širokú substrátovú špecifickosť, ktorá sa v mnohých prípadoch prekrýva s CYP3A4. Na základe týchto poznatkov možno predpokladať, že látky inhibujúce CYP3A4 sú potenciálnymi adeptmi pre blokovanie MDR1.

Zriedená grapefruitová šťava, etylacetátový extrakt alebo jednotlivé zložky tejto šťavy preukázali *in vitro*, za použitia CaCo2 buniek, schopnosť znížiť eflux niekoľkých látok transportovaných pomocou MDR1 (cyklosporín, digoxín, fexofenadín, paklitaxel, ródamín123, saquinavir, talinolol, vinblastín). V dôsledku toho existuje možnosť, že grapefruitová šťava môže zvyšovať biologickú dostupnosť liečiv transportovaných pomocou MDR1 (Bailey et al., 2010).

Na prítomnosť P-gp ako aj CYP450 majú vplyv viaceré látky. Množstvo týchto proteínov závisí napríklad na 1α , 25-dihydroxyvitamíne D₃, ktorý prostredníctvom receptora vitamínu D zvyšuje ich expresiu (Schmiedlin-Ren et al., 2001). Expresia môže byť riadená aj inou cestou, a to prostredníctvom pregnán X receptora (PXR). PXR sa nachádza v rôznych tkanivách ľudského tela a patrí medzi jadrové receptory. Reguluje expresiu génov pre enzýmy a prenášače, ktoré sa podieľajú na metabolizme a vylučovaní liečiv. Preto látky, ktoré ovplyvňujú aktivitu PXR môžu ovplyvňovať absorpciu a metabolizmus súčasne podávaných liečiv (Qiao et al., 2013). Aktivita PXR závisí buď na ligandoch, ktoré sú schopné receptor aktivovať, alebo na priamej indukcii expresie PXR. Vo väčšine prípadov ide o prvý spôsob (Satsu et al., 2008; Yang et al., 2011).

Bol skúmaný vplyv etanolického extraktu z nezrelého pomaranču a citrónovej šupky na množstvo P-gp. Zistilo sa, že extrakt z pomaranča bol schopný up-regulovať P-gp, v dôsledku čoho došlo k zníženiu hladín digoxínu, ktorý je substrátom pre P-gp (Obr. 28).



Obrázok 28: Up-regulácia PXR proteínu účinkom rôznych činiteľov.

(VD₃, 1 α , 25-dihydroxyvitamín D₃; Rif, rifampicín; IO, etanolický extrakt z nezrelých pomarančov; CP, etanolický roztok z citrónovej šupky.

Obrázok prevzatý z Okada et al., 2017.

Grapefruit a jeho zložky boli skúmané, pretože došlo k zníženému efluxu digoxínu a vinblastínu, ktorý sa deje za účasti MDR1. Grapefruitová šťava, zhomogenizované časti grapefruitového plodu (albedo, cievne prvky obklopujúce jednotlivé segmenty a jadro, ktoré obsahovala aj semená boli oddelené, prečistené a zhomogenizované v mixéri) nijako neovplyvnili aktivitu MDR1. Naopak tomu bolo pri použití extraktu z grapefruitovej šupky (tento extrakt bol pripravený extrahovaním flaveda, albeda, cievnych prvkov a jadra pomocou absolútneho etanolu, následnou filtráciou a odparením na konečný roztok obsahujúci približne 5% etanolu), ktorý vykázal inhibičné účinky. Naringín je hlavnou zložkou grapefruitovej šťavy, a preto bol stanovený jeho obsah v šťave, zhomogenizovaných častiach a v extrakte, a to nasledovne. Šťava obsahovala 750 $\mu\text{mol/l}$, zhomogenizované časti 2300 $\mu\text{mol/l}$ a extrakt 33100 $\mu\text{mol/l}$. Inhibičná koncentrácia (IC₅₀) čistého naringínu, ktorá spôsobila pokles aktivity MDR1 transportéru o 50% bola 3000

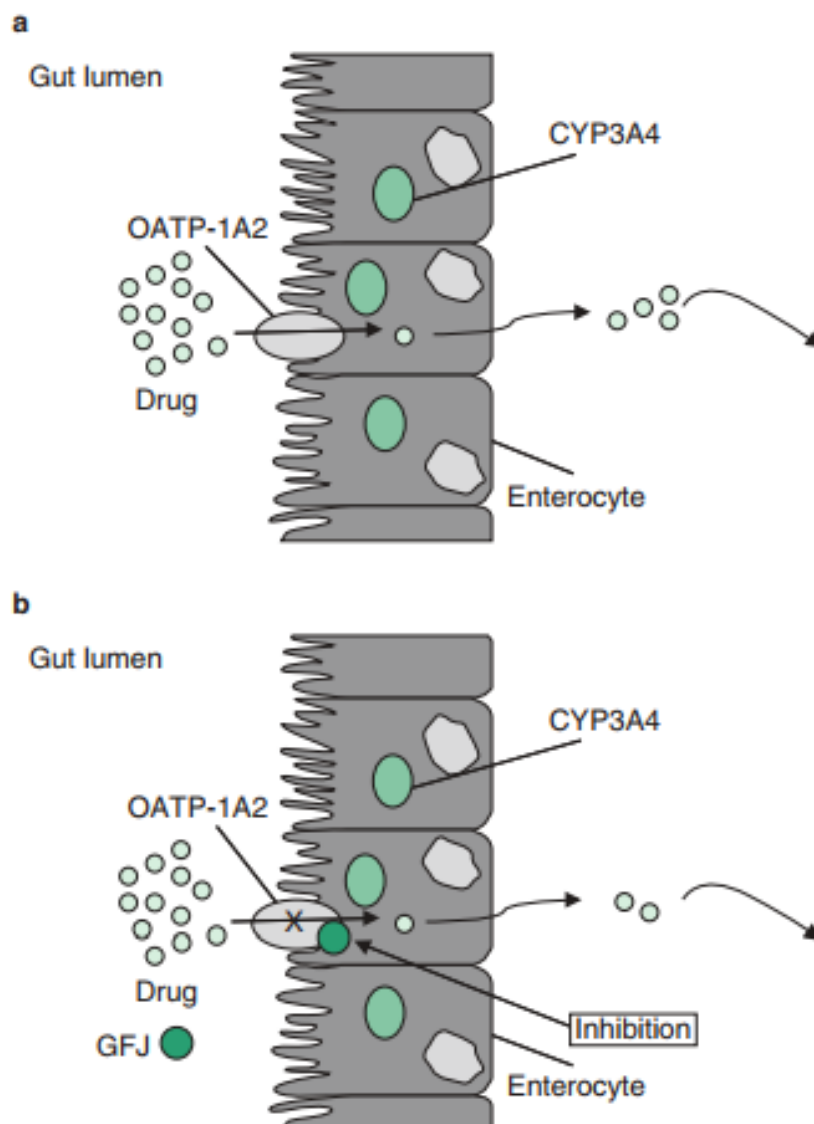
$\mu\text{mol/l}$. V dôsledku vysokého obsahu naringínu, by teda niektoré grapefruitové časti mohli znížiť účinok MDR1. No v komerčne dostupných grapefruitových šťavách sa koncentrácia naringínu pohybuje len okolo $750 \mu\text{mol/l}$, preto *in vivo* takéto bežne dostupné šťavy pravdepodobne nezapríčinia relevantný pokles aktivity P-gp (Dresser et al., 2002). K podobnému záveru dospel aj Becquemont et al. (2001). Išlo o randomizovanú, cross-over štúdiu s dvanástimi zdravými dobrovoľníkmi, ktorým bola podávaná grapefruitová šťava a sledovaný jej vplyv na farmakokinetiku digoxínu. Len mierne zmeny vo farmakokinetike digoxínu poukazujú na nevýznamnú inhibíciu P-gp a na to, že konzumácia grapefruitovej šťavy týmto spôsobom nezohráva dôležitú úlohu pri liekových interakciách (Becquemont et al., 2001).

6.2.2 Influxné prenášače

Druhou skupinou prenášačov sú influxné transportéry. Ide o transportéry patriace do SLC (solute carrier) nadrodiny, ktoré umožňujú prestup liečiv do vnútra buniek. OATPs (Organic Anion Transporting Polypeptides) predstavujú dôležitú rodinu transportných proteínov nezávislých na sodíku (Bailey et al., 2010).

Vyskytujú sa predovšetkým v orgánoch ako sú pečeň, tenké črevo a centrálna nervová sústava. Spočiatku sa predpokladalo, že substrátmi pre OATP transportéry sú len organické zlúčeniny vo forme aniónov. Avšak neskôr sa ukázalo, že OATP transportéry sú schopné prenášať aj kationy a neutrálne zlúčeniny. Zaujímavé je, že určité množstvo OATP transportérov a efluxných transportérov, majú spoločné substráty a súčinnosť medzi nimi určuje, či liečivá budú vstupovať do bunky, alebo budú vypudzované z bunky preč.

V štúdiách sa zistilo, že inhibícia OATP transportérov môže byť základom pre interakcie medzi rôznymi liečivami navzájom alebo medzi liečivom a potravou (Obr. 29, Kim et al., 2003).



Obrázok 29: Absorpcia liečiv v tenkom čreve pomocou OATP transportérov.

Bez grapefruitovej šťavy (GŠ) (a) a v prítomnosti GŠ (b). GŠ inhibuje prenášač, liečivo menej prestupuje cez stenu tenkého čreva, čoho výsledkom je znížená absorpcia a nižšia biologická dostupnosť (GŠ/GFJ, grapefruitová šťava).

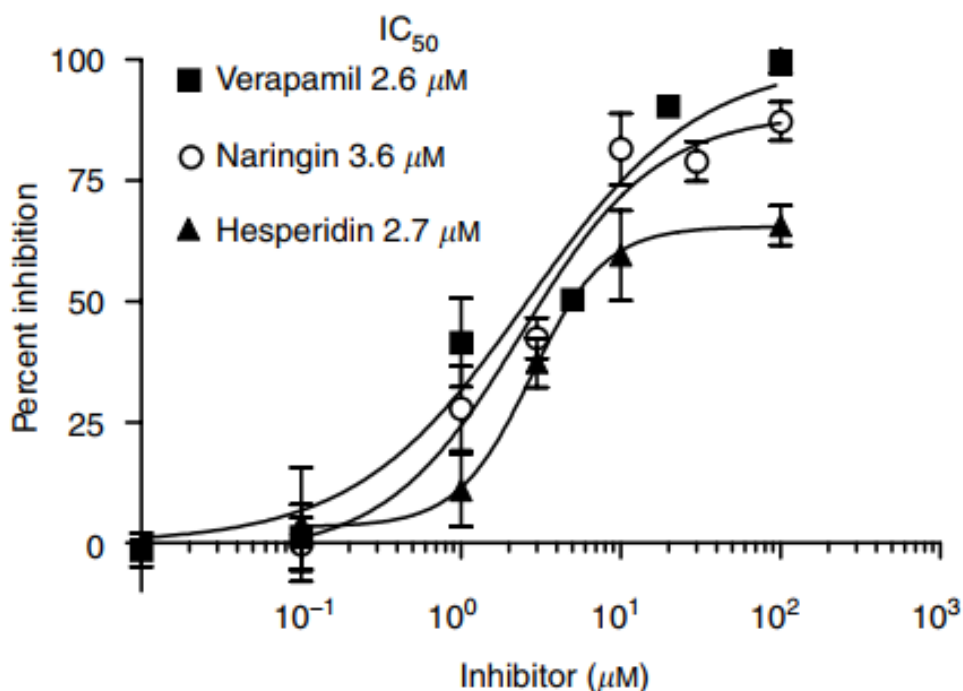
Obrázok prevzatý z Seden et al., 2010.

Bola skúmaná inhibičná účinnosť naringínu a hesperidínu, ktoré sa prirodzene vyskytujú v grapefruitovej a pomarančovej šťave, na transportéry nachádzajúce sa v čreve. Išlo o potkanie OATP3 a ľudský OATP1A2 transportér. Zistilo sa, že oba flavonoidy sú schopné znížiť influx do buniek, a teda inhibovať spomínané transportéry. Okrem toho, bol naringín schopný inhibovať influxný transportér o 50% už pri koncentrácii 5 $\mu\text{mol/l}$, a to je

koncentrácia 600-krát nižšia než koncentrácia, ktorá spôsobila ekvivalentný pokles aktivity MDR1 (viď kapitola 6. 2. 1) a 200-krát nižšia než obvykle zistená v grapefruitovej šťave (Dresser et al., 2002). OATP transportér je zodpovedný za influx fexofenadínu. Preto sa fexofenadín používa v štúdiách zaoberajúcich sa vplyvom rôznych látok na systémy (OATP, MDR1), ktoré môžu ovplyvniť biologickú dostupnosť liečiv. Hoci existuje množstvo druhov OATP transportérov, zistilo sa, že práve OATP1A2 zohráva kľúčovú úlohu pri absorpcii fexofenadínu v systémoch *in vivo*. Deväť dobrovoľníkov participujúcich na štúdiu požilo grapefruitovú šťavu, druhá kontrolná skupina konzumovala vodu. Sledovala sa expresia OATP1A2, ale aj MDR1 a CYP3A. Po biopsii z duodena neboli odhalené rozdiely v expresii OATP1A2 ani MDR1 medzi dvoma skupinami, no došlo k zníženiu množstva CYP3A. Súčasne došlo k poklesu fexofenadínu v plazme. Zaujímavý je ale fakt, že výsledky prislúchajúce potkaním *Oatp1b4* a *Oatp1b5* sú zrovnateľné s hodnotami pre OATP1A2. Svedčí to o medzidruhových rozdieloch v expresii a aktivite týchto transportérov (Glaeser et al., 2007).

Vodný roztok naringínu, ako jednej zo zložiek grapefruitovej šťavy, má veľmi podobný vplyv na biologickú dostupnosť fexofenadínu v porovnaní s grapefruitovou šťavou. Pri zrovnateľnom obsahu naringínu v podávanej grapefruitovej šťave a vo vodnom roztoku čistého naringínu došlo k zníženiu biologickej dostupnosti, príslušne na 55 a 75% oproti kontrolnému meraniu s vodou (Bailey et al., 1998a).

Boli vykonané pokusy, pre potvrdenie, že naringín a hesperidín sú naozaj schopné blokovat' aktivitu OATP. V *in vitro* štúdiu sa obe látky ukázali ako inhibítory tohto prenášača, pričom boli porovnávané s verapamilom, ktorý je preukázaný inhibítor OATP1A2 (Obr. 30). Naringín (IC_{50} 3,6 μ M), tak ako aj verapamil (IC_{50} 2,6 μ M), úplne znížili aktívny transport fexofenadínu. Hesperidín (IC_{50} 2,7 μ M) má podobné IC_{50} ako naringín, ale nespôsobuje úplnú inhibíciu OATP1A2 (Bailey et al., 2007).



Obrázok 30: Percentuálna inhibícia OATP1A2 pomocou verapamilu, naringínu a hesperidínu, vo vzťahu k ich koncentrácii vyjadrenej logaritmicke.

Obrázok prevzatý z Bailey et al., 2007.

Väčšina biologických procesov sa líši medzi jednotlivcami navzájom. Pri vyššej vrodenej aktivite influxných transportných enzýmov možno očakávať vyššiu biologickú dostupnosť liečiv, a naopak. Výsledkom toho je, že aktivita OATP transportérov môže byť geneticky ovplyvnená (Lee et al., 2005).

OATP1A2 je influxný prenášač, ktorý má širokú substrátovú špecifickosť. Preto je možné, že konzumácia grapefruitovej alebo pomarančovej šťavy spolu s množstvom iných liečiv môže zapríčiniť zmeny v biologickej dostupnosti liečiv, ktoré sú pomocou neho transportované. Absorpcia liečiv v tenkom čreve závisí na polarite daného liečiva a povahe vylúčených liečiv. Platí pri tom, že pre vstrebanie látok s vyššou polaritou a pre liečivá, ktoré sú vylučované v nezmenenej forme je potrebná prítomnosť influxných transportérov, než samotná pasívna difúzia. V dôsledku toho, pravdepodobne dôjde k významnému poklesu biologickej dostupnosti metotrexátu a sotalolu, ktoré sa vylučujú prevažne obličkami v nezmenenej forme, pri ich súčasnom podávaní s grapefruitovou alebo pomarančovou šťavou.

Boli vykonané testovania so substrátmi pre OATP1A2 transportér. Išlo o acebutolol, celiprolol, fexofenadín a talinolol s grapefruitovou šťavou; atenolol, celiprolol, ciprofloxacín a fexofenadín s pomarančovou šťavou. Dve liečivá, celiprolol a fexofenadín, boli testované s obidvomi šťavami, pričom došlo k podobnému poklesu biologickej dostupnosti. Táto podobnosť podporuje spoločný mechanizmus účinku grapefruitovej a pomarančovej šťavy. Navyše, podľa rozsahu interakcie určitého liečiva s jednou šťavou možno predvídať interakcie s druhou šťavou.

Aj u zmienených beta-blokátorov, atenololu, celiprololu a talinololu, došlo po podávaní spolu s grapefruitovou alebo pomarančovou šťavou k poklesu biologickej dostupnosti.

Substrátom OATP1A2 transportéru je imatinib, ktorý je metabolizovaný hlavne na CYP3A4. Pri podávaní imatinibu spolu s grapefruitovou šťavou pozorujeme skôr zvyšovanie jeho biologickej dostupnosti, než pokles, čo môže viesť jeho toxicite.

Fluorochinolónové antibiotiká majú široké spektrum pôsobenia a sú používané na liečbu mnohých infekcií. Baktericídny účinok závisí na koncentrácii liečiva. Platí, že k optimálnemu účinku dochádza, keď je pomer maximálnej plazmatickej koncentrácie a minimálnej inhibičnej koncentrácie väčší než 10. Pri podávaní ciprofloxacínu s pomarančovou šťavou došlo k výraznému poklesu biologickej dostupnosti. Toto zníženie účinku môže mať za zlyhanie liečby infekcií a prináša tiež vyššie riziko vzniku rezistencie.

Pre účinok L-tyroxínu, hormónu štítnej žľazy, je veľmi dôležitá jeho koncentrácia. Aj malé zmeny v dávkovaní a v absorpcii z gastrointestinálneho traktu môžu mať klinický dopad na účinok. Tyroxín sa, okrem iných, vstrebáva aj pomocou OATP1A2 transportéru a pri jednorazovom podaní spolu s grapefruitovou šťavou došlo k patričnému poklesu biologickej dostupnosti. Pravidelný príjem grapefruitovej alebo pomarančovej šťavy preto môže spôsobiť zmeny v ustálenej koncentrácii podávaného liečiva, a tak môže dôjsť až k poddávkovaniu (Bailey et al., 2010).

Aliskiren je priamy inhibítor renínu, ktorý sa uplatňoval v liečbe hypertenzie. Jednorazové podanie grapefruitovej šťavy AUC a rovnako tak maximálnu koncentráciu aliskirenu. Zníženie biologickej dostupnosti je zapríčinené inhibíciou OATP1A2 transportéru, ktorého substrátom je aliskiren (Rebello et al., 2012).

Na apikálnej strane membrány enterocytov sa nachádza aj ďalší prenášač, OATP2B1 transportér, ktorý sa podieľa na vstrebávaní niektorých liečiv. Grapefruitová

a pomarančová šťava bola schopná inhibovať tento transportér *in vitro* za použitia *Xenopus* oocytov, ktoré exprimujú práve prenášač OATP2B1. Naringenín, naringín, hesperetín a hesperidín, ako hlavné zložky štiav, boli schopné inhibície OATP2B1 a boli pre ne stanovené aj príslušné IC₅₀, ktoré sú zhrnuté v nasledujúcej Tab. 17 (Shirasaka et al., 2013).

Tabuľka 17: IC₅₀ pre jednotlivé flavanóny a ich aglykóny.

	IC ₅₀ (μM)
Naringín	4,63 ± 1,19
Naringenín	49,2 ± 7,6
Hesperidín	1,92 ± 0,28
Hesperetín	67,6 ± 29,5

Údaje v tabuľke prevzaté z Shirasaka et al., 2013.

Jedným zo substrátov OATP2B1 je aj glibenklamid, ktorý sa používa pri liečbe diabetu mellitu. V *in vitro* štúdií bolo toto liečivo podávané spolu s nariedenou grapefruitovou a pomarančovou šťavou v koncentrácii 5%, čo viedlo k zníženiu intracelulárnej akumulácie glibenklamidu. Interakcia medzi glibenklamidom a grapefruitovou šťavou bola skúmaná aj v istej klinickej štúdií, pričom nebol zistený vplyv šťavy na biologickú dostupnosť glibenklamidu. Tieto rozdiely zistené v *in vitro* a klinickej štúdií môžu byť zapríčinené tým, že glibenklamid spravidla podlieha rozsiahlej metabolizácii.

Ďalším prenášačom je OATP1B1 transportér, ktorý sa nachádza v hepatocytoch a je zodpovedný za intracelulárne hromadenie statínov. Pitavastatín, pravastatín, rosuvastatín sú vylučované v podstate bez zmeny. Klinické štúdiá zaoberajúce sa farmakokinetikou týchto liečiv ukázali, že u pitavastatínu došlo k miernemu zvýšeniu biologickej dostupnosti pri podávaní s grapefruitovou šťavou, ale u pravastatínu tomu tak nebolo. Tieto výsledky potvrdzujú, že grapefruitová alebo pomarančová šťava môže mať istý klinický účinok na OATP1B1 transportér. Dôvodom absencie účinku u pravastatínu nie je úplne jasný. Môže sa jednať o nízku afinitu komponent nachádzajúcich sa v šťavách k tomuto transportéru, dôvodom môže byť nedostatočná koncentrácia grapefruitovej šťavy v cirkulácii (Bailey et al. 2010).

6.3 Iný mechanizmus

Biologická dostupnosť liečiv, ktoré sú metabolizované pomocou sulfotransferáz alebo esteráz, môže byť ovplyvnená konzumáciou ovocných štiav. Žiaľ, nie je vykonané dostatočné množstvo kvalitných štúdií, ktoré by detailnejšie a presnejšie popísali tieto interakcie.

Zdá sa, že SULT1A1 a SULT1A3 by v tenkom čreve a pečeni mohla zohrávať úlohu v inaktivácii β_2 -agonistov, ktoré sa používajú ako bronchodilatanciá. *In vitro* bola grapefruitová šťava schopná inhibovať oba enzýmy. Naringín čiastočne inhiboval SULT1A3, inhibícia SULT1A1 zrejme prislúcha pôsobeniu kvercetínu. Iná *in vitro* štúdia sa odhalila, že esterázy sa spolu s CYP3A4 znižujú účinok proliečiv, liečiv vo forme esterov. Ide napr. o enalapril a lovastatín (Seden et al., 2010).

6.4 Prehľad interakcií

Možné interakcie jednotlivých skupín liečiv podľa mechanizmu účinku a výsledného ovplyvnenia biologickej dostupnosti sú uvedené v Tab. 18.

Tabuľka 18: Zhrnutie interakcií grepovej a pomarančovej šťavy obsahujúcej flavanóny.

Liečivo/skupina liečiv	Mechanizmus	Vplyv na BAV
Antiepileptiká		
Karbamazepín	inh. intestinálneho CYP3A4	zvýšenie
Antihistaminiká		
Fexofenadín	inh. intestinálneho OATP1A2	zníženie
Antimalariká		
Arteméter	inh. intestinálneho CYP3A4	zvýšenie
Primachín	inh. intestinálneho CYP3A4	zvýšenie
Antipsychotiká		
Pimozid*	inh. intestinálneho CYP3A4	potenciálne zvýšenie
Anxiolytiká/hypnotiká		
Midazolam	inh. intestinálneho CYP3A4	zvýšenie
Triazolam	inh. intestinálneho CYP3A4	zvýšenie
Buspiron	inh. intestinálneho CYP3A4	zvýšenie
Antiarytmiká		
Amiodarón	inh. intestinálneho CYP3A4	zvýšenie
Propafenón*	inh. intestinálneho CYP3A4	potenciálne zvýšenie
Dronedarón*	inh. intestinálneho CYP3A4	potenciálne zvýšenie
Betablokátory		
Acebutolol	inh. intestinálneho OATP1A2	zníženie
Atenolol	inh. intestinálneho OATP1A2	zníženie
Celiprolol	inh. intestinálneho OATP1A2	zníženie
Blokátory vápnikových kanálov		
Verapamil	inh. intestinálneho CYP3A4 + inh. P-gp	zvýšenie
Amlodipín	inh. intestinálneho CYP3A4	zvýšenie/nevýznamné zmeny vo FK (iné výsledky v rôznych štúdiách)
Felodipín	inh. intestinálneho CYP3A4	zvýšenie
Nikardipín	inh. intestinálneho CYP3A4	zvýšenie
Nimodipín	inh. intestinálneho CYP3A4	zvýšenie
Nifedipín	inh. intestinálneho CYP3A4	zvýšenie
Isradipín, lacidipín, lercanidipín*	inh. intestinálneho CYP3A4	potenciálne zvýšenie
Nisoldipín	inh. intestinálneho CYP3A4	zvýšenie
Inhibítory HMG-CoA reductázy - statíny		
Atorvastatín	inh. intestinálneho CYP3A4	zvýšenie
Lovastatín	inh. intestinálneho CYP3A4	zvýšenie
Simvastatín	inh. intestinálneho CYP3A4	zvýšenie

Iné liečivá ovplyvňujúce KVS		
Aliskirén	inh. intestinálneho OATP2B1	zníženie
Ivabradín*	inh. intestinálneho CYP3A4	potenciálne zvýšenie
Ranolazín*	inh. intestinálneho CYP3A4	potenciálne zvýšenie
Kortikosteroidy		
Budesonid*	inh. intestinálneho CYP3A4	potenciálne zvýšenie
Cytostatiká		
Nilotinib	inh. intestinálneho CYP3A4 + inh. P-gp	zvýšenie
Látky ovplyvňujúce GIT		
Cisaprid	inh. intestinálneho CYP3A4	zvýšenie
Imunosupresíva		
Cyklosporín	inh. intestinálneho CYP3A4 + potenciálna inh. P-gp	zvýšenie
Taktrolimus	inh. intestinálneho CYP3A4	zvýšenie
Sirolimus*	inh. intestinálneho CYP3A4 + potenciálna inh. P-gp	potenciálne zvýšenie
Opioidy		
Oxykodón	inh. intestinálneho CYP3A4	zvýšenie
Inhibítory PDE-5		
Sildenafil	inh. intestinálneho CYP3A4	zvýšenie
Tadalafil*	inh. intestinálneho CYP3A4	potenciálne zvýšenie
Vardenafil*	inh. intestinálneho CYP3A4	potenciálne zvýšenie
Liečivá na močovú inkontinenciu		
Darifenacín	inh. intestinálneho CYP3A4	potenciálne zvýšenie
Antibiotiká		
Ciprofloxacín	inh. intestinálneho OATP1A2	zníženie
Levofloxacín*	inh. intestinálneho OATP1A2	potenciálne zníženie
Hormóny štítnej žľazy		
L-tyroxín	inh. intestinálneho OATP1A2	zníženie

*neboli vykonané konkrétne klinické štúdie, ale interakcia sa predpokladá vzhľadom na farmakokinetiku liečiv.

Vlastné spracovanie podľa Bailey et al., 2010; Maeda et al., 2007; Neuhofer et al., 2002; Seden et al., 2010.

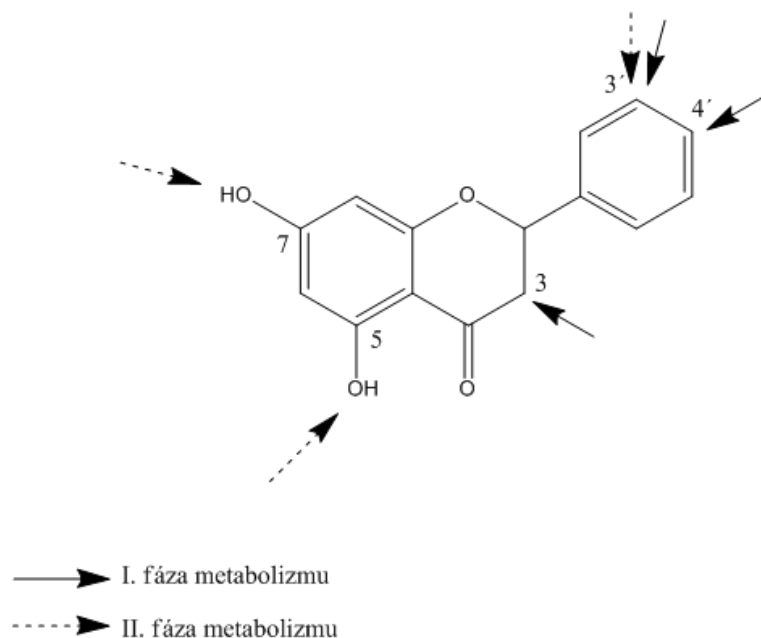
7 Diskusia

V našej práci sme sa snažili zhrnúť dostupné informácie o flavanónoch. Zaujímal nás hlavne ich osud v ľudskom organizme, ktorý má okrem iného význam pre zhodnotenie relevantnosti ich prípadného liečebného využitia a v neposlednom rade aj pre možné liekové interakcie..

V jednotlivých kapitolách sú spracované informácie od absorpcie, cez metabolizmus a distribúciu až po vylučovanie flavanónov, pričom isté množstvo faktorov, ktoré ovplyvňujú výslednú biologickú dostupnosť sa prelína medzi jednotlivými kapitolami. Ide napríklad o vplyv cukornej zložky, molekulovej hmotnosti, polarity molekuly, type podávanej šťavy atď. Kvôli vyššie uvedeným faktom vyplýva, že pri hodnotení biologickej dostupnosti flavanónov musíme pozerieť na procesy odohrávajúce sa v ľudskom tele komplexne a brať do úvahy nie len jeden proces, ale aj iné deje, ku ktorým následne môže dochádzať. Napríklad, ak hodnotíme vstrebávanie látky cez biologickú membránu v enterocytoch, výsledkom ktorého by bol vysoký prestup látky do systémovej cirkulácie a vysoká biologická dostupnosť, musíme zväžiť aj prípadný metabolizmus látky v enterocytoch alebo vychytávanie späť do lumen tenkého čreva, v dôsledku čoho biologická dostupnosť výrazne klesá.

Vo všeobecnosti je možné u flavanónov pozorovať len veľmi nízku biologickú dostupnosť, a teda nemôžeme očakávať nejaké závažné biologické účinky. Po podaní bežných ovocných štiav nedochádza k vysokým hodnotám plazmatických koncentrácií ani AUC hesperetínu a naringenínu. Časť z podaného množstva flavanónov sa síce vstrebáva, ale väčšina rýchlo podlieha I. a II. fáze metabolizmu sprostredkovanej cytochrómom P450, respektíve konjugačnými enzýmami, v tenkom čreve a v pečeni (Obr. 31). Výsledne konjugáty s kyselinou glukurónovou a/alebo sírovou sú väčšinou vylúčené do moču. No časť sa môže reabsorbovať, a tak byť znovu biologicky dostupná. Vplyv na biologickú dostupnosť majú aj črevné baktérie, ktoré sprostredkujú odštiepenie rutinozidu, pričom vzniká aglykón, ktorého ďalší osud môže pozitívne alebo negatívne ovplyvniť biologickú dostupnosť. Na jednej strane dochádza k vstrebaniu aglykónu do systémovej cirkulácie, na druhej strane môže byť vylúčený z organizmu vo forme stolice, alebo je štepený na rozličné látky s fenypropiónovou štruktúrou. Otázne je, či by tieto látky mohli mať nejaký biologický účinok. Recentné práce práve naznačujú, že niektoré z týchto mikrobiálnych

metabolitov môžu mať významné biologické účinky (Najmanová et al., 2016; Khan et al., 2015; Semaming et al., 2015).



Obrázok 31: Miesta v molekule flavanónov, na ktorých dochádza k I. a II. fáze metabolizmu.

Poloha 3', 4', v menšej miere aj poloha 3 sú hlavné miesta, na ktorých dochádza k I. fáze metabolizmu. Poloha 5 a 7, v menšej miere aj poloha 3' sú hlavné miesta, na ktorých dochádza k II. fáze metabolizmu, ku konjugácii.

Vlastné spracovanie.

Ak sú flavanóny užívané spolu s liečivami, je nutné odpovedať na otázku, či by nemohlo dochádzať k liekovým interakciám. Teoreticky do úvahy pripadajú interakcie na cytochróme P450 a na prenášačoch. Bolo pozorovaných viacero vystupňovaných nežiaducich účinkov pri podávaní ovocných štiav spolu s niektorými liečivami. Naringín ako látka obsiahnutá v grapefruitovej šťave nevykazuje inhibičný účinok na CYP450, ale jeho aglykón (naringenín) áno. Avšak po kritickom zhodnotení výsledkov, môžeme konštatovať že k interakciám nedochádza až v takom rozsahu ako by sme predpokladali, pretože ako sme už spomínali aglykóny sa v plazme skoro vôbec nevyskytujú. Navyše za metabolizmus liečiv je zodpovedná najmä izoforma CYP3A. Tú prednostne inhibuje (*R*)-naringenín, ktorý sa však v prírodných zdrojoch vyskytuje v menšej miere. Otázkou ale ostáva, či v ľudskom organizme nedochádza ku konverzii (*R*)-forma na (*S*)-formu.

CYP450 vykazuje prekrývajúcu sa substrátovú špecifickosť s P-gp, preto môže dochádzať k interakciám na tomto efluxnom transportére, avšak v komerčne dostupných šťavách sa nachádza naringín len v dost' nízkej koncentrácii na to, aby *in vivo* bol schopný inhibovať P-gp. Na druhej strane je táto koncentrácia postačujúca pre inhibíciu influxných prenášačov (OATP). Výsledky viacerých klinických štúdií poukazujú na to, že súčasné podávanie GŠ alebo PŠ môže ovplyvniť biologickú dostupnosť liečiv, hoci z vyššie uvedeného vyplýva, že by k tomu nemalo veľmi dochádzať. Vysvetliť si to môžeme tým, že musíme zohľadniť skutočnosť, že nedochádza len k inhibícii cytochrómu, alebo len k inhibícii transportérov, ale tieto deje prebiehajú súčasne, a tým sa zvyšuje vplyv na podávanie liečiv.

Napriek snahe čo najviac zjednotiť podmienky klinických štúdií, sa výsledky často nedajú úplne zovšeobecniť, pretože prebiehali za iných podmienok, boli použité iné analytické postupy, každý testovaný subjekt je individuálny. Mnohé faktory, ktoré by nás zaujímali, boli testované len *in vitro* alebo len u zvierat. Takže do budúcnosti sa núka ešte detailnejšie preskúmanie určitých súvislostí u ľudí.

Flavanóny je malá, no zaujímavá skupina látok, ktorých osud v ľudskom organizme je rozmanitý a ďalšie skúmania by mohli priniesť ešte ďalšie významné zistenia.

8 Záver

Flavanóny sú polyfenolické látky pozostávajúce z aglykónu a cukornej zložky, väčšinou ide o disacharid. Vyznačujú sa optickou aktivitou a nachádzajú sa hlavne v citrusových plodoch.

Po perorálnom podaní sa absorbujú prevažne v tenkom čreve, pričom aglykóny sa vstrebávajú pomocou pasívnej difúzie a u glykozidov zohráva dôležitú úlohu LPH a CBG v súčinnosti s SGLT1. V tenkom čreve, ale aj v pečeni, podliehajú extenzívnemu metabolizmu prostredníctvom CYP450, pričom vznikajú prevažne glukuronidy a sulfáty. V hrubom čreve sú za účasti črevných baktérií deglykozylované a degradované na látky o nižšej molekulovej hmotnosti, prevažne s fenypropiónovým skeletom. Tie sú buď vylučované z organizmu, alebo dochádza k opätovnému vstrebávaniu. Hlavným eliminačným orgánom sú obličky, ale môže dochádzať aj k vylučovaniu do stolice. Všetky procesy v ľudskom organizme sú úzko spojené so štruktúrou daných látok a môžu byť ovplyvnené viacerými endogénnymi aj exogénnymi faktormi. Biologická dostupnosť po perorálnom podaní je vzhľadom na vyššie uvedené skutočnosti nízka. No napriek tomu, bolo pozorovaných viacero interakcií s liečivami, ku ktorým dochádza pri ich súčasnom podávaní. Zdá sa, že k týmto interakciám dochádza na presystémovej úrovni, hlavne na CYP450 a na prenášačoch.

9 Použité zdroje

Ameer B, Weintraub RA, Johnson JV, Yost RA, Rouseff RL. Flavanone absorption after naringin, hesperidin, and citrus administration. *Clin Pharmacol Ther.* 1996;60(1):34-40.

Avila M, Jaquet M, Moine D, Requena T, Peláez C, Arigoni F, Jankovic I. Physiological and biochemical characterization of the two alpha-L-rhamnosidases of *Lactobacillus plantarum* NCC245. *Microbiology.* 2009;155(Pt 8):2739-49.

Bailey DG, Arnold JM, Munoz C, Spence JD. Grapefruit juice – felodipine interaction: mechanism, predictability, and effect of naringin. *Clin Pharmacol Ther.* 1993a;53(6):637-42.

Bailey DG, Arnold JM, Strong HA, Munoz C, Spence JD. Effect of grapefruit juice and naringin on nisoldipine pharmacokinetics. *Clin Pharmacol Ther.* 1993b;54(6):589-94.

Bailey DG, Dresser GK, Leake BF, Kim RB. Naringin is a major and selective clinical inhibitor of organic anion-transporting polypeptide 1A2 (OATP1A2) in grapefruit juice. *Clin Pharmacol Ther.* 2007;81(4):495-502.

Bailey DG, Kreeft JH, Munoz C, Freeman DJ, Bend JR. Grapefruit juice-felodipine interaction: effect of naringin and 6',7'-dihydroxybergamottin in humans. *Clin Pharmacol Ther.* 1998a;64(3):248-56.

Bailey DG, Malcolm J, Arnold O, Spence JD. Grapefruit juice–drug interactions. *Br J Clin Pharmacol.* 1998b; 46(2):101–110.

Bailey DG, Spence JD, Edgar B, Bayliff CD, Arnold JM. Ethanol enhances the hemodynamic effects of felodipine. *Clin Invest Med.* 1989;12(6):357-62.

Bailey DG. Fruit juice inhibition of uptake transport: a new type of food-drug interaction. *Br J Clin Pharmacol.* 2010;70(5):645-55.

Baker RA, Cameron RG. Clouds of Citrus juices and juice drinks. *Food Technol.* 1999;53:64–69.

- Balasundram N, Sundram K, Samman S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial byproducts: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem.* 2006;99:191-203.
- Becquemont L, Verstuyft C, Kerb R, Brinkmann U, Lebot M, Jaillon P, Funck-Brentano C. Effect of grapefruit juice on digoxin pharmacokinetics in humans. *Clin Pharmacol Ther.* 2001;70(4):311-6.
- Bocco A, Cuvelier ME, Richard H, Berset C. Antioxidant Activity and Phenolic Composition of Citrus Peel and Seed Extracts. *J Agric Food Chem.* 1998;46(6):2123-2129.
- Bohn T. Dietary factors affecting polyphenol bioavailability. *Nutr Rev.* 2014;72(7):429-52.
- Brand W, Boersma MG, Bik H, Hoek-van den Hil EF, Vervoort J, Barron D, Meinel W, Glatt H, Williamson G, van Bladeren PJ, Rietjens IM. Phase II metabolism of hesperetin by individual UDP-glucuronosyltransferases and sulfotransferases and rat and human tissue samples. *Drug Metab Dispos.* 2010;38(4):617-25.
- Bredsdorff L, Nielsen ILF, Rasmussen SE, Cornett C, Barron D, Bouisset F, Offord E, Williamson G. Absorption, conjugation and excretion of the flavanones, naringenin and hesperetin from α -rhamnosidase-treated orange juice in human subjects. *Br J Nutr.* 2010;103(11):1602-1609.
- Breinholt VM, Offord EA, Brouwer C, Nielsen SE, Brøsen K, Friedberg T. In vitro investigation of cytochrome P450-mediated metabolism of dietary flavonoids. *Food Chem Toxicol.* 2002;40(5):609-16.
- Bressler R. Grapefruit juice and drug interactions. Exploring mechanisms of this interaction and potential toxicity for certain drugs. *Geriatrics.* 2006;61(11):12-8.
- Brett GM, Hollands W, Needs PW, Teucher B, Dainty JR, Davis BD, Brodbelt JS, Kroon PA. Absorption, metabolism and excretion of flavanones from single portions of orange fruit and juice and effects of anthropometric variables and contraceptive pill use on flavanone excretion. *Br J Nutr.* 2009; 101(5): 664-675.

- Caccamese S, Bianca S, Santo D. Racemization at C-2 of naringin in sour oranges with increasing maturity determined by chiral high-performance liquid chromatography. *J Agric Food Chem.* 2007;55(10):3816-22.
- Cao H, Chen L, Xiao J. Binding Citrus flavanones to human serum albumin: effect of structure on affinity. *Mol Biol Rep.* 2011;38(4):2257-62.
- Cassidy A, Minihane AM. The role of metabolism (and the microbiome) in defining the clinical efficacy of dietary flavonoids. *Am J Clin Nutr.* 2017;105(1):10-22.
- Crozier A, Jaganath IB, Clifford MN. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat Prod Rep.* 2009;26(8):1001-43.
- Davies NM, Yáñez JA, editors. *Flavonoid pharmacokinetics: Methods of Analysis, Preclinical and Clinical Pharmacokinetics, Safety, and Toxicology.* New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2013.
- Day AJ, Canada FJ, C Diaz J, Kroon PA, McLauchlan R, Faulds CB, Plumb GW, R.A Morgan M, Williamson G. Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase. *FEBS Letters.* 2000;468(2-3):166-170.
- Day AJ, DuPont MS, Ridley S, Rhodes M, Rhodes MJC, Morgan MRA, Williamson G. Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver β -glucosidase activity. *FEBS Letters.* 1998;436(1):71-75.
- Del Rio D, Rodriguez-Mateos A, Spencer JP, Tognolini M, Borges G, Crozier A. Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxid Redox Signal.* 2013;18(14):1818-92.
- Ding F, Peng W. Biological activity of natural flavonoids as impacted by protein flexibility: an example of flavanones. *Mol Biosyst.* 2015;11(4):1119-33.
- Dresser GK, Bailey DG, Leake BF, Schwarz UI, Dawson PA, Freeman DJ, Kim RB. Fruit juices inhibit organic anion transporting polypeptide-mediated drug uptake to decrease the oral availability of fexofenadine. *Clin Pharmacol Ther.* 2002;71(1):11-20.
- Erlund I, Meririnne E, Alfthan G, Aro A. Plasma kinetics and urinary excretion of the flavanones naringenin and hesperetin in humans after ingestion of orange juice and grapefruit juice. *J Nutr.* 2001;131(2):235-41.

- Exarchou V, Nenadis N, Tsimidou M, Gerothanassis IP, Troganis A, Boskou D. Antioxidant activities and phenolic composition of extracts from Greek oregano, Greek sage, and summer savory. *J Agric Food Chem*. 2002;50(19):5294-9.
- Fang Xie, Xinxin Ding, Qing-Yu Zhang. An update on the role of intestinal cytochrome P450 enzymes in drug disposition. *Acta Pharm Sin B*. 2016;6(5): 374–383.
- Gentili B, Horowitz RM. Conversion of naringin to neohesperidin and neohesperidin dihydrochalcone. U.S. Patent. 1968;3:375,242.
- Gil-Izquierdo A, Gil MI, Ferreres F, Toma's-Barbera'n FA. In vitro availability of flavonoids and other phenolics in orange juice. *J Agric Food Chem*. 2001;49:1035–1041.
- Glaeser H, Bailey DG, Dresser GK, Gregor JC, Schwarz UI, McGrath JS, Jolicoeur E, Lee W, Leake BF, Tirona RG, Kim RB. Intestinal Drug Transporter Expression and the Impact of Grapefruit Juice in Humans. *Clin Pharmacol Ther*. 2007;81:362–370.
- Hackett AM, Marsh I, Barrow A, Griffiths LA. The biliary excretion of flavanones in the rat. *Xenobiotica*. 1979;9(8):491-501.
- Hollman PCH, Bijlsman MNCP, van Gameren Y, Cnossen EPJ, de Vries JHM, Katan MB. The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man. *Free Radic Res*. 1999;31(6):569-573.
- Hollman PCH. Absorption, Bioavailability, and Metabolism of Flavonoids. *Pharm Biol*. 2004;42:74-83.
- Johnston K, Sharp P, Clifford M, Morgan L. Dietary polyphenols decrease glucose uptake by human intestinal Caco-2 cells. *FEBS Lett*. 2005;579(7):1653-7.
- Kanaze FI, Bounartzi MI, Georgarakis M, Niopas I. Pharmacokinetics of the citrus flavanone aglycones hesperetin and naringenin after single oral administration in human subjects. *Eur J Clin Nutr*. 2007; 61(4): 472-7.
- Kane GC, Lipsky JJ. Drug-grapefruit juice interactions. *Mayo Clin Proc*. 2000;75(9):933-42.
- Kawaguchi-Suzuki M, Nasiri-Kenari N, Shuster J, Gmitter FG Jr, Cancalon P, de Oliveria F, Kight J, Handberg EM, Pepine CJ, Frye RF, Cooper-DeHoff RM. Effect of Low-

Furanocoumarin Hybrid Grapefruit Juice Consumption on Midazolam Pharmacokinetics. *J Clin Pharmacol.* 2017;57(3):305-311.

Khan AK, Rashid R, Fatima N, Mahmood S, Mir S, Khan S, Jabeen N, Murtaza G. Pharmacological activities of protocatechuic acid. *Acta Pol Pharm.* 2015;72(4):643-50.

Khan MK, Rakotomanomana N, Dufour C, Dangles O. Binding of citrus flavanones and their glucuronides and chalcones to human serum albumin. *Food Funct.* 2011;2(10):617-26.

Kiani J, Imam SZ. Medicinal importance of grapefruit juice and its interaction with various drugs. *Nutr J.* 2007;6:33.

Kim RB. Organic anion-transporting polypeptide (OATP) transporter family and drug disposition. *Eur J Clin Invest.* 2003;33 Suppl 2:1-5.

Kodan A, Kuroda H, Sakai F. A stilbene synthase from Japanese red pine (*Pinus densiflora*): implications for phytoalexin accumulation and down-regulation of flavonoid biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(5):3335-9.

Lee W, Glaeser H, Smith LH, Roberts RL, Moeckel GW, Gervasini G, Leake BF, Kim RB. Polymorphisms in human organic anion-transporting polypeptide 1A2 (OATP1A2): implications for altered drug disposition and central nervous system drug entry. *J Biol Chem.* 2005;280(10):9610-7.

Ley JP, Krammer G, Reinders G, Gatfield IL, Bertram HJ. Evaluation of bitter masking flavanones from *Herba Santa* (*Eriodictyon californicum* (H. and A.) Torr., Hydrophyllaceae). *J Agric Food Chem.* 2005;53(15):6061-6.

Liu S, Guo C, Guo Y, Yu H, Greenaway F, Sun MZ. Comparative binding affinities of flavonoid phytochemicals with bovine serum albumin. *Iran J Pharm Res.* 2014;13(3):1019-28.

Lown KS, Bailey DG, Fontana RJ, Janardan SK, Adair CH, Fortlage LA, Brown MB, Guo W, Watkins PB. Grapefruit juice increases felodipine oral availability in humans by decreasing intestinal CYP3A protein expression. *J Clin Invest.* 1997; 99(10): 2545–2553.

Lu WJ, Ferlito V, Xu C, Flockhart DA, Caccamese S. Enantiomers of naringenin as pleiotropic, stereoselective inhibitors of cytochrome P450 isoforms. *Chirality*. 2011;23(10):891-6.

Lundahl J, Regårdh CG, Edgar B, Johnsson G. Effects of grapefruit juice ingestion--pharmacokinetics and haemodynamics of intravenously and orally administered felodipine in healthy men. *Eur J Clin Pharmacol*. 1997;52(2):139-45.

Lundahl J, Regårdh CG, Edgar B, Johnsson G. Relationship between time of intake of grapefruit juice and its effect on pharmacokinetics and pharmacodynamics of felodipine in healthy subjects. *Eur J Clin Pharmacol*. 1995;49(1-2):61-7.

Mackenzie PI, Bock KW, Burchell B, Guillemette C, Ikushiro S, Iyanagi T, Miners JO, Owens IS, Nebert DW. Nomenclature update for the mammalian UDP glycosyltransferase (UGT) gene superfamily. *Pharmacogenet Genomics*. 2005;15(10):677-85.

Maeda T, Takahashi K, Ohtsu N, Oguma T, Ohnishi T, Atsumi R, Tamai I. Identification of Influx Transporter for the Quinolone Antibacterial Agent Levofloxacin. *Mol Pharm*. 2007;4(1):85-94.

Manach C, Morand C, Gil-Izquierdo A, Bouteloup-Demange C, Rémésy C. Bioavailability in humans of the flavanones hesperidin and narirutin after the ingestion of two doses of orange juice. *Eur J Clin Nutr*. 2003;57(2):235-42.

Minoggio M, Bramati L, Simonetti P, Gardana C, Iemoli L, Santangelo E, Mauri PL, Spigno P, Soressi GP, Pietta PG. Polyphenol pattern and antioxidant activity of different tomato lines and cultivars. *Ann Nutr Metab*. 2003;47(2):64-9.

Mullen W, Archeveque MA, Edwards CA, Matsumoto H, Crozier A. Bioavailability and metabolism of orange juice flavanones in humans: impact of a full-fat yogurt. *J Agric Food Chem*. 2008;56:11157-11164.

Mullen W, Edwards CA, Serafini M, Crozier A. Bioavailability of pelargonidin-3-O-glucoside and its metabolites in humans following the ingestion of strawberries with and without cream. *J Agric Food Chem*. 2008;56:713-19.

Najmanová I, Pourová J, Vopršalová M, Pilařová V, Semecký V, Nováková L, Mladěnka P. Flavonoid metabolite 3-(3-hydroxyphenyl)propionic acid formed by human microflora decreases arterial blood pressure in rats. *Mol Nutr Food Res*. 2016;60(5):981-91.

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;42(1):29-42.

Neuhofel AL, Wilton JH, Victory JM, Hejmanowski LG, Amsden GW. Lack of bioequivalence of ciprofloxacin when administered with calcium-fortified orange juice: a new twist on an old interaction. *J Clin Pharmacol*. 2002;42(4):461-6.

Nielsen IL, Chee WS, Poulsen L, Offord-Cavin E, Rasmussen SE, Frederiksen H, Enslin M, Barron D, Horcajada MN, Williamson G. Bioavailability is improved by enzymatic modification of the citrus flavonoid hesperidin in humans: a randomized, double-blind, crossover trial. *J Nutr*. 2006;136(2):404-8.

Nielsen SE, Breinholt V, Justesen U, Cornett C, Dragsted LO. In vitro biotransformation of flavonoids by rat liver microsomes. *Xenobiotica*. 1998;28(4):389-401.

Nikolic D, van Breemen RB. New metabolic pathways for flavanones catalyzed by rat liver microsomes. *Drug Metab Dispos*. 2004;32(4):387-97.

Okada N, Murakami A, Urushizaki S, Matsuda M, Kawazoe K, Ishizawa K. Extracts of Immature Orange (*Aurantii fructus immaturus*) and Citrus Unshiu Peel (*Citri unshiu pericarpium*) Induce P-Glycoprotein and Cytochrome P450 3A4 Expression via Upregulation of Pregnane X Receptor. *Front Pharmacol*. 2017;8:84.

Orrego-Lagarón N, Vallverdú-Queralt A, Martínez-Huélamo M, Lamuela-Raventós RM, Escribano-Ferrer E. Metabolic profile of naringenin in the stomach and colon using liquid chromatography/electrospray ionization linear ion trap quadrupole-Orbitrap-mass spectrometry (LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS) and LC-ESI-MS/MS. *J Pharm Biomed Anal*. 2016;120:38-45.

Paine MF, Criss AB, Watkins PB. Two major grapefruit juice components differ in intestinal CYP3A4 inhibition kinetic and binding properties. *Drug Metab Dispos.* 2004;32:1146–53.

Paine MF, Criss AB, Watkins PB. Two major grapefruit juice components differ in time to onset of intestinal CYP3A4 inhibition. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005;312:1151–60.

Paine MF, Widmer WW, Hart HL, Pusek SN, Beavers KL, Criss AB, Brown SS, Thomas BF, Watkins PB. A furanocoumarin-free grapefruit juice establishes furanocoumarins as the mediators of the grapefruit juice-felodipine interaction. *Am J Clin Nutr.* 2006;83(5):1097-105.

Pereira-Caro G, Borges G, Ky I, Ribas A, Calani L, Del Rio D, Clifford MN, Roberts SA, Crozier A. In vitro colonic catabolism of orange juice (poly)phenols. *Mol Nutr Food Res.* 2015;59(3):465-75.

Pereira-Caro G, Fernandez-Quiros B, Ludwig IA, Pradas I, Crozier A, Moreno-Rojas JM. Catabolism of citrus flavanones by the probiotics *Bifidobacterium longum* and *Lactobacillus rhamnosus*. *Eur J Nutr.* 2016;1-12.

Pereira-Caro G, Oliver CM, Weerakkody R, Singh T, Conlon M, Borges G, Sanguansri L, Lockett T, Roberts SA, Crozier A, Augustin MA. Chronic administration of a microencapsulated probiotic enhances the bioavailability of orange juice flavanones in humans. *Free Radic Biol Med.* 2015;84:206-14.

Qiao E, Ji M, Wu J, Ma R, Zhang X, He Y, Zha Q, Song X, Zhu LW, Tang J. Expression of the PXR gene in various types of cancer and drug resistance. *Oncol Lett.* 2013;5(4):1093-1100.

Rebello S, Zhao S, Hariry S, Dahlke M, Alexander N, Vapurcuyan A, Hanna I, Jarugula V. Intestinal OATP1A2 inhibition as a potential mechanism for the effect of grapefruit juice on aliskiren pharmacokinetics in healthy subjects. *Eur J Clin Pharmacol.* 2012;68(5):697-708.

Riches Z, Stanley EL, Bloomer JC, Coughtrie MW. Quantitative evaluation of the expression and activity of five major sulfotransferases (SULTs) in human tissues: the SULT “pie.”. *Drug Metab Dispos.* 2009;37:2255–2261.

- Roowi S, Mullen W, Edwards CA, Crozier A. Yoghurt impacts on the excretion of phenolic acids derived from colonic breakdown of orange juice flavanones in humans. *Mol Nutr Food Res.* 2009;53:S68–75.
- Satsu H, Hiura Y, Mochizuki K, Hamada M, Shimizu M. Activation of pregnane X receptor and induction of MDR1 by dietary phytochemicals. *J Agric Food Chem.* 2008;56(13):5366-73.
- Seden K, Dickinson L, Khoo S, Back D. Grapefruit-drug interactions. *Drugs.* 2010;70(18):2373-407.
- Semaming Y, Pannepetch P, Chattipakorn SC, Chattipakorn N. Pharmacological properties of protocatechuic Acid and its potential roles as complementary medicine. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2015;2015:593902.
- Serra H, Mendes T, Bronze MR, Simplício AL. Prediction of intestinal absorption and metabolism of pharmacologically active flavones and flavanones. *Bioorg Med Chem.* 2008;16(7):4009-18.
- Shirasaka Y, Shichiri M, Mori T, Nakanishi T, Tamai I. Major Active Components in Grapefruit, Orange, and Apple Juices Responsible for OATP2B1-Mediated Drug Interactions. *J Pharm Sci.* 2013; 102(9):3418-3426.
- Scheidt HA, Pampel A, Nissler L, Gebhardt R, Huster D. Investigation of the membrane localization and distribution of flavonoids by high-resolution magic angle spinning NMR spectroscopy. *Biochim Biophys Acta.* 2004;1663(1-2):97-107.
- Schmiedlin-Ren P, Thummel KE, Fisher JM, Paine MF, Watkins PB. Induction of CYP3A4 by 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 is human cell line-specific and is unlikely to involve pregnane X receptor. *Drug Metab Dispos.* 2001;29(11):1446-53.
- Spilková J, Martin J, Siatka T, Tůmová L, Kašparová M, editors. *Farmakognozie.* Praha: Nakladatelství Karolinum, 2016.
- Thelen K, Dressman JB. Cytochrome P450-mediated metabolism in the human gut wall. *J Pharm Pharmacol.* 2009;61(5):541-58.

- Thilakarathna SH, Vasantha Rupasinghe HP. Flavonoid Bioavailability and Attempts for Bioavailability Enhancement. *Nutrients*. 2013;5(9):3367–3387.
- Tomás-Barberán FA, Clifford MN. Flavanones, chalcones and dihydrochalcones – nature, occurrence and dietary burden. *J Sci Food Agric*. 2000;80:1073-1080.
- Tomko J. a kol. *Farmakognózia*. Martin: Osveta, 1999.
- Tripoli E, La Guardia M, Giammanco S, Di Majo D, Giammanco M. Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. *Food Chem*. 2007;104(2):466-479.
- Tu B, Wang Y, Mi R, Ouyang Y, Hu YJ. Evaluation of the interaction between naringenin and human serum albumin: Insights from fluorescence spectroscopy, electrochemical measurement and molecular docking. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 2015;149:536-43.
- Vallejo F, Larrosa M, Escudero E, Zafrilla MP, Cerdá B, Boza J, García-Conesa MT, Espín JC, Tomás-Barberán FA. Concentration and solubility of flavanones in orange beverages affect their bioavailability in humans. *J Agric Food Chem*. 2010;58(10):6516-24.
- Xiao J, Kai G. A review of dietary polyphenol-plasma protein interactions: characterization, influence on the bioactivity, and structure-affinity relationship. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2012;52(1):85-101.
- Xie MX, Xu XY, Wang YD. Interaction between hesperetin and human serum albumin revealed by spectroscopic methods. *Biochim Biophys Acta*. 2005;1724(1-2):215-224.
- Yang J, Luan X, Gui H, Yan P, Yang D, Song X, Liu W, Hu G, Yan B. Byakangelicin induces cytochrome P450 3A4 expression via transactivation of pregnane X receptors in human hepatocytes. *Br J Pharmacol*. 2011;162(2):441-51.

10 Prílohy

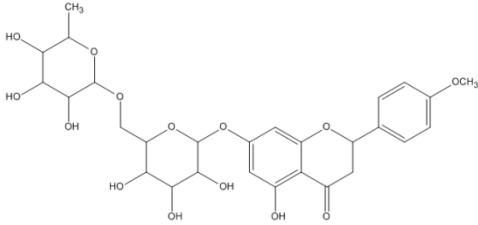
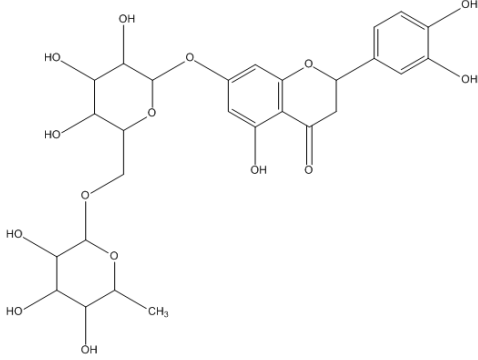
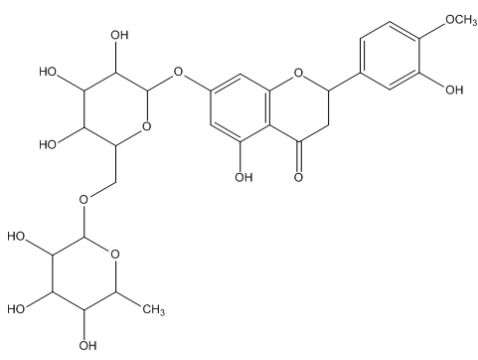
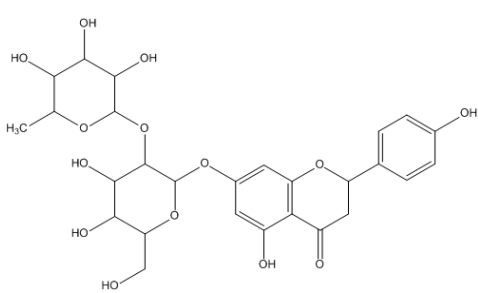
Príloha 1

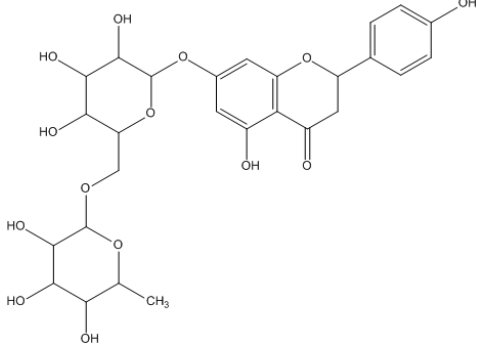
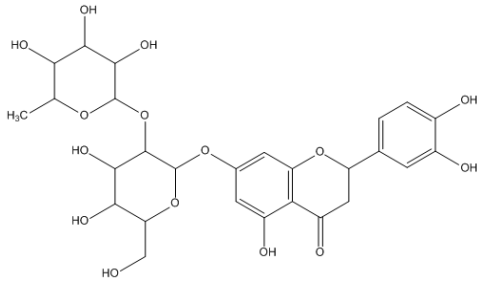
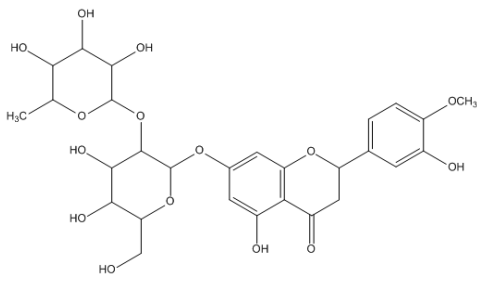
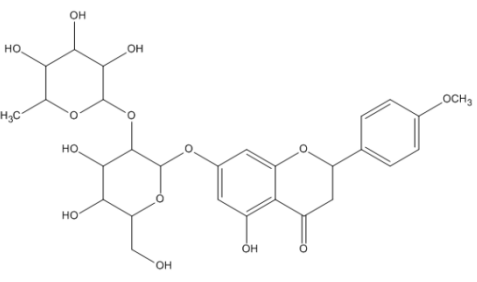
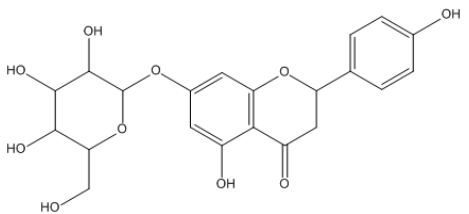
Prehľad a štruktúra jednotlivých aglykónov vyskytujúcich sa u flavanónov.

NÁZOV AGLYKÓNU	R ₁	R ₂	R ₃
eriodiktyol	OH	OH	OH
hesperetín	OH	OH	OCH ₃
homoeriodiktyol	OH	OCH ₃	OH
izosakuranetín	OH	H	OCH ₃
naringenín	OH	H	OH
pinocembrín	OH	H	H
pinostrobin	OCH ₃	H	H
sakuranetín	OCH ₃	H	OH

Vlastné spracovanie.

Prehľad flavanónov, ich zloženie a príslušný vzorec.

Flavonoidný glykozid	Aglykón	Cukorná zložka	Vzorec
didymín	izosakuranetín	rutinozid	
eriocitrín	eriodiktyol	rutinozid	
hesperidín	hesperetín	rutinozid	
naringín	naringenín	neohesperidozid	

narirutín	naringenín	rutinozid	
neeriocitrín	eriodiktyol	neohesperidozid	
neohesperidín	hesperetín	neohesperidozid	
poncirín	izosakuranetín	neohesperidozid	
prunín	naringenín	glukozid	

Vlastné spracovanie.

Príloha 2

Obrázok popisuje závislosť efektívnej mobility na pH.

M_e je efektívna mobilita, vyjadrená v $\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$, je definovaná ako rozdiel medzi zdanlivou pohyblivosťou (M_{app}) a elektroosmotickou pohyblivosťou M_{EOF} .

$$M_e = M_{\text{app}} - M_{\text{EOF}} = (L_c \cdot L_d) / V \cdot (1/t_{\text{app}} - 1/t_{\text{EOF}})$$

Kde L_c je dĺžka kapiláry k detektoru (cm), L_d je celková dĺžka kapiláry (cm), V je vložené napätie (V) a t_{app} a t_{EOF} sú migračné časy analyzovanej vzorky a neutrálneho markeru EOF (Serra et al., 2008).

Príloha 3

Zhášanie fluorescence možno popísať Stern-Volmerovou rovnicou:

$$F_0/F = 1 + K_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{sv} [Q];$$

pričom F_0 a F predstavujú intenzitu fluorescence albumínu v neprítomnosti a v prítomnosti zhášadla (v našom prípade flavonoidu), K_q je bimolekulárna zhášacia konštanta, τ_0 je doba trvania fluorescence daného fluoroforu v neprítomnosti zhášadla, $[Q]$ je koncentrácia zhášadla a K_{sv} je Stern-Volmerova konštanta zhášania.

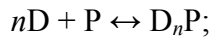
Väzbové konštanty potom možno vypočítať podľa nasledujúcej rovnice:

$$\log((F_0 - F) / F) = \log K_a + n \log [Q]$$

pričom K_a je väzbová konštanta a n je počet väzbových miest (Cao et al., 2011).

Príloha 4

K_a , zdanlivá asociačná konštanta, slúži pre opísanie stereošpecifických interakcií medzi flavonoidom a hovädzím sérovým (BSA) albumínom možno použiť. Pre väzbu BSA s flavonoidom platí:



pričom P je BSA, D je flavonoid, D_nP je komplex albumín-flavonoid a n je počet väzbových miest pre flavonoid.

Pre K_a platí:

$$K_a = [D_nP] / ([D]^n[P])$$

$$\log K_a = \log([D_nP] / [P]) - n \log[D].$$

Keďže D_nP komplex je:

$$[P] / ([P] + [D_nP]) = I / I_0;$$

tak rovnica zhášania je nasledovná:

$$\log K_a = \log(\Delta I / I) - n \log[D];$$

pričom $[D]$ je koncentrácia flavonoidu, I_0 je intenzita fluorescencie bez flavonoidu, I je intenzita fluorescencie v prítomnosti flavonoidu, a $\Delta I = I_0 - I$. K_a a n potom môžu byť vyjadrené z tohto posledného vzťahu.

Počet väzbových miest na molekule albumínu, pomocou ktorých sa flavonoid môže viazať na enzým je n (Liu et al., 2014).