UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

FACOLTA' DI SCIENZE MM.FF.NN.

LAUREA DI PRIMO LIVELLO IN
BIOLOGIA MOLECOLARE

ELABORATO DI LAUREA

Ossidazione epatica via CYP2C9 del diclofenac: effetto dei flavonoidi luteolina e diosmetina

TUTOR: Dott. Luigi Quintieri
Dipartimento di Farmacologia e Anestesiologia

LAUREANDA: Elisa Cesaro

Anno Accademico 2006/2007

INDICE

ABBREVIAZIONI 3

ABSTRACT 5

INTRODUZIONE 7

Il metabolismo dei farmaci 7

Generalità 7

Classificazione delle reazioni di biotrasformazione 7

I flavonoidi 8

Generalità 8

Effetti modulatori dei flavonoidi sul metabolismo degli xenobiotici 10

Contesto e scopo dello studio 10

MATERIALI E METODI 11

Prodotti chimici 11

Microsomi epatici 11

Condizioni generali di incubazione 11

Analisi della cinetica di formazione di 4'OH-diclofenac 12

Analisi HPLC dei surnatanti di incubazione 12

RISULTATI E DISCUSSIONE 15

BIBLIOGRAFIA 23

ABBREVIAZIONI

CYP: citocromo P450.
4'OH-diclofenac: 4'-idrossidiclofenac.
HPLC: cromatografia in fase liquida ad elevate prestazioni.
K_m: costante di Michaelis-Menten.
V_{max}: velocità massima della reazione.
K_i: costante di dissociazione del complesso inibitore-enzima.

ABSTRACT

Questo lavoro di tesi è stato condotto al fine di valutare, *in vitro*, l'effetto dei flavonoidi naturali diosmetina e luteolina sulla biotrasformazione epatica via citocromo CYP2C9 dell'antinfiammatorio diclofenac. In un primo gruppo di esperimenti la biotrasformazione del farmaco (5 μM) in 4'OH-diclofenac da parte di microsomi epatici umani è stata valutata in assenza (controllo) e in presenza di concentrazioni scalari (0,5-30 μM) di ciascun flavonoide, quantificando il prodotto di reazione mediante HPLC. Entrambi i composti si sono dimostrati in grado di inibire in modo concentrazione-dipendente la formazione di 4'OH-diclofenac, la diosmetina dimostrandosi, in tal senso, più potente della luteolina. Successivi esperimenti hanno valutato l'impatto della presenza di diosmetina (0-5μM) e luteolina (0-10 μM) sulla velocità di formazione del metabolita a partire da diverse concentrazioni iniziali di diclofenac (3-50 μM). La presenza nel mezzo di incubazione di diosmetina e luteolina ha determinato un aumento, in funzione della concentrazione di flavonoide presente, del valore di K_m della reazione non modificando, per contro, il valore della V_{max} (inibizione competitiva). Il successivo calcolo, per via grafica, delle K_i ha confermato la maggior potenza inibitoria della diosmetina nei confronti di CYP2C9. L'assunzione dei due flavonoidi può pertanto interferire con l'eliminazione di farmaci metabolizzati via CYP2C9.

INTRODUZIONE

IL METABOLISMO DEI FARMACI

Generalità

Gli organismi superiori possiedono sistemi enzimatici in grado di modificare la struttura della maggior parte delle sostanze esogene come farmaci, inquinanti ambientali e prodotti del metabolismo secondario delle piante e dei funghi definite, nel loro complesso, xenobiotici; come risultato delle modificazioni strutturali, si ottengono tipicamente composti dotati di minore idrofobicità e più facilmente eliminabili con le urine e con la bile. Il processo è noto come biotrasformazione o metabolismo degli xenobiotici e coinvolge enzimi presenti in diversi tessuti e nel plasma (Quintieri, 2006).

Spesso la biotrasformazione di un farmaco porta alla formazione di uno o più prodotti di reazione (definiti metaboliti) privi di attività biologica, o con minore attività rispetto al composto da cui derivano, e che sono generalmente più facilmente eliminabili dall'organismo. In altri casi, tuttavia la manipolazione enzimatica di un farmaco porta alla formazione di uno o più metaboliti attivi e con un profilo farmacologico (in termini di potenza, efficacia terapeutica, tossicità verso l'ospite) simile o differente rispetto al composto di partenza da cui derivano. Vi è inoltre la possibilità che l'attività *in vivo* di un farmaco possa dipendere strettamente dalla sua biotrasformazione in uno o più metaboliti attivi; tale processo è chiamato bioattivazione e il farmaco denominato "profarmaco". E' importante sottolineare che una diversa attività degli enzimi che prendono parte al metabolismo di un farmaco, conseguente ad esempio all'esposizione a induttori/inibitori enzimatici o a polimorfismo genico, può determinare una certa variabilità interindividuale e intraindividuale dell'entità della risposta terapeutica e/o dell'incidenza degli effetti tossici associati alla somministrazione di un farmaco.

Classificazione delle reazioni di biotrasformazione

Le reazioni di biotrasformazione, convenzionalmente suddivise in reazioni di fase I e di fase II, hanno luogo principalmente nel fegato (epatocita) ma anche in cellule localizzate in altri organi quali l'intestino tenue, il polmone ed il rene (Quintieri, 2006). Nelle reazioni di fase I vengono introdotti o smascherati nel substrato i gruppi funzionali quali ad esempio gruppi ossidrilici, carbossilici, amminici e tiolici, con formazione di prodotti definiti metaboliti di fase I. Le reazioni di fase II consistono generalmente in reazioni di coniugazione dei metaboliti di fase I con composti endogeni, l'acido glucuronico, l' acido solforico e il glutatione. Alcuni xenobiotici, tra i quali vari flavonoidi, possono subire direttamente reazioni di fase II a causa della presenza di opportuni gruppi funzionali come ossidrili alcolici o fenolici. La maggior parte delle reazioni di

fase I sono di tipo ossidativo e catalizzate da enzimi che appartengono alla superfamiglia citocromo P450 (CYP). Tali enzimi sono classificati in famiglie e sottofamiglie in relazione al grado di omologia della sequenza amminoacidica. Enzimi della stessa famiglia presentano almeno il 40% di omologia nella sequenza, mentre enzimi appartenenti alla stessa sottofamiglia presentano almeno il 55% di omologia nella sequenza amminoacidica (Nelson et al., 1996).

Nell'uomo, le proteine CYP più importanti nel metabolismo dei farmaci e degli xenobiotici in generale sono CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 e CYP3A4 (Quintieri, 2006). L'enzima CYP2C9, oggetto della presente tesi, è ritenuto responsabile del metabolismo di circa il 20% dei farmaci attualmente utilizzati nell'uomo, tra cui vari antidiabetici (es. la tolbutamide), la warfarina (un anticoagulante orale di largo impiego) e numerosi farmaci antinfiammatori non steroidei, tra cui il diclofenac (Yuan et al., 2002).

I FLAVONOIDI

Generalità

I flavonoidi sono composti polifenolici presenti nei frutti, nelle foglie e nei fiori di varie specie vegetali, rappresentando i pigmenti floreali della maggior parte delle angiosperme. Essi sono coinvolti nella difesa della pianta contro l'aggressione da agenti patogeni e dai raggi ultravioletti, specialmente se localizzati nelle cellule dell'epitelio fogliare (Manach et al., 2004). Si tratta di composti a basso peso molecolare, caratterizzati da una struttura fondamentale costituita da due anelli benzenici e un anello eterociclico a sei termini contenente un atomo di ossigeno (2-fenil-cromano).

I flavonoidi possono essere suddivisi, sulla base del livello di ossidazione dell'anello eterociclico, in sei sottoclassi: flavanoni, isoflavoni, antocianidine, flavonoli, flavanoli e flavoni (Ross e Kasum, 2002; Fig. I). I flavanoni (es. esperitina e narigenina) si ritrovano principalmente negli agrumi; gli isoflavoni (es. genisteina e daidzeina) sono tutti incolori e sono abbondanti nei legumi soprattutto nella soia. Le antocianidine (es. cianidina e malvidina) sono i pigmenti idrosolubili responsabili del colore rosso, blu e violetto di fiori e frutta e si ritrovano principalmente nei frutti di bosco, nelle melanzane e nel vino rosso; i flavonoli (es. quercitina e quercitolo), si ritrovano nella cipolla, nei broccoli, nei porri, in numerosi frutti e bevande ottenute a partire dai vegetali in particolare il tè e il vino rosso. I flavanoli (catechine) sono contenuti in alimenti come la cioccolata, il vino rosso e il tè verde. I flavoni, categoria a cui appartengono la luteolina e la diosmetina, sono particolarmente abbondanti nel prezzemolo e nel sedano (Manach et al., 2004).

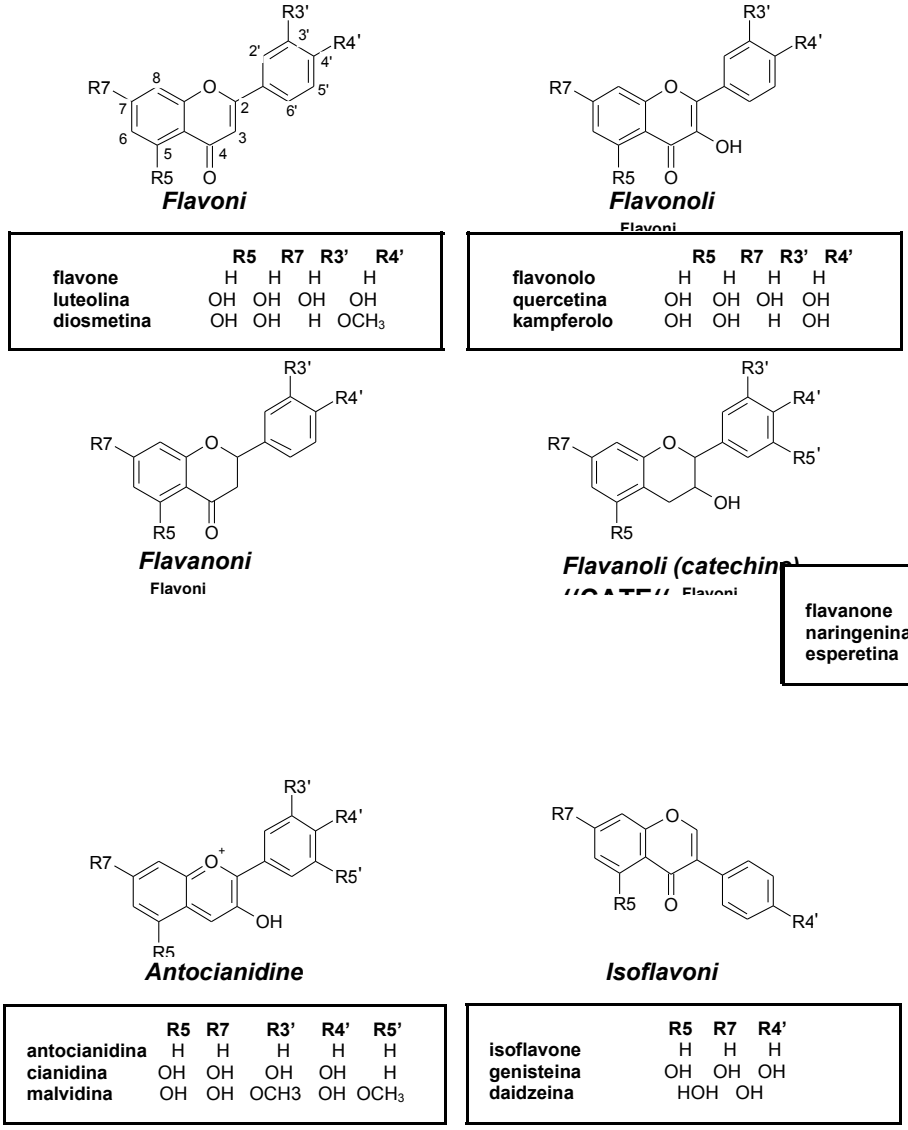


Fig. I. **Struttura delle principali classi di flavonoidi.**

I flavonoidi si possono riscontrare in natura in forma libera (agliconi) ma più frequentemente in forma coniugata con glucidi (glucosidi). Mentre i flavonoidi in forma libera (aglicone) possono essere facilmente assorbiti attraverso la mucosa intestinale, i flavonoidi glicosilati (glucosidi) necessitano dell'idrolisi da parte di glicosidasi presenti nella mucosa intestinale o secrete dalla microflora batterica del colon affinché l'aglicone possa essere rilasciato e assorbito (Manach et al., 2004). Numerosi flavonoidi, vanno incontro a biotrasformazione principalmente mediata da enzimi intestinali ed epatici, in metaboliti sia di fase I che di fase II. (Manach et al., 2004).

Effetti modulatori dei flavonoidi sul metabolismo degli xenobiotici

Numerosi flavonoidi presenti negli alimenti sono in grado di interagire direttamente con alcuni enzimi metabolizzanti gli xenobiotici, in particolare CYP1A2, CYP3A4 e sulfotransferasi, modulandone l'attività in senso inibitorio (Moon et al., 2006). Un numero limitato di flavonoidi tra cui la tangeretina presente nei frutti del genere *Citrus*, è inoltre in grado di stimolare, con meccanismo allosterico, l'attività del CYP3A4 (Moon et al., 2006). Alcuni flavonoidi infine, possono indurre la trascrizione di vari geni codificanti enzimi che metabolizzano gli xenobiotici, in particolare il CYP1A1, varie glucuroniltransferasi e glutatione-S-transferasi (Moon et al., 2006).

CONTESTO E SCOPO DELLO STUDIO

Ai flavonoidi sono attribuiti numerosi effetti benefici sulla salute umana. In particolare, recenti studi epidemiologici suggeriscono che l'assunzione di quantità relativamente elevate di tali composti con la dieta si associ ad una diminuzione del rischio di insorgenza di alcune malattie neoplastiche e cardiovascolari (Manach et al., 2004). Di conseguenza numerosi preparati erboristici contenenti concentrazioni relativamente elevate di vari flavonoidi, in particolare quercetina e luteolina, sono attualmente commercializzati e largamente impiegati come "integratori alimentari" (Halsted, 2003). In vari paesi tra cui l'Italia, sono inoltre commercializzate e utilizzate quali coadiuvanti nel trattamento delle varici, delle complicanze flebitiche, degli stati di fragilità capillare e delle emorroidi, alcune specialità farmaceutiche per uso orale (es. Daflon®, Arvenum®, Venosmine®) contenenti diosmina, un flavonoide a struttura glicosidica (diosmetina 7-ramnoglucoside; Lyseng-Williamson e Perry, 2003). Quest'ultimo, viene idrolizzato da glicosidasi del tubo digerente, con formazione di diosmetina (aglicone), prontamente assorbita attraverso la mucosa intestinale (Cova et al., 1992). Studi clinici recenti, condotti su volontari sani, suggeriscono una possibile riduzione dell'attività dell'enzima CYP2C9 a seguito della somministrazione orale di dosi terapeutiche di diosmina (Rajnarayana et al., 2003 e 2007). Sulla base di tali studi, e vista l'importanza giocata dal CYP2C9 nel metabolismo dei farmaci, ci siamo proposti di valutare, *in vitro*, l'effetto della diosmetina sulla biotrasformazione epatica dell'antinfiammatorio diclofenac nel suo metabolita 4'OH-diclofenac (attività *diclofenac 4'-idrossilasi*). L'ossidrilazione in posizione 4' del diclofenac è infatti, nell'uomo, catalizzata prevalentemente, se non esclusivamente, dall'enzima microsomiale CYP2C9 (Yuan et al., 2002). L'effetto della diosmetina sull'ossidazione epatica del diclofenac è stato confrontato con quello della luteolina, flavonoide strutturalmente correlato alla diosmetina (Fig. I) e per il quale vi sono recenti evidenze *in vitro* di inibizione dell'ossidazione in posizione 4' della tolbutamide, anch'essa una reazione *marker* di CYP2C9 (Foti et al., 2007).

MATERIALI E METODI

Prodotti chimici

Il diclofenac (sale di sodio) è stato ottenuto dalla MP Biomedicals Inc. (Aurora, OH, USA). Il 4'-idrossidiclofenac (4'OH-diclofenac) è stato acquistato dalla BD Biosciences (Woburn, MA, USA). Diosmetina e luteolina sono state ottenute dalla Chromadex (Santa Ana, CA, USA). Il NADPH è stato ottenuto dalla Sigma Aldich S.r.l. (Milano, Italia). Di ciascuno dei composti elencati sono state preparate soluzioni "madre" in un opportuno solvente (1 mM diclofenac sodico e 20 mM NADPH in acqua bidistillata; 10 mM luteolina e 20 mM 4'OH-diclofenac in metanolo; diosmetina 10 mM in dimetilformammide) conservate a 4°C (ad eccezione della soluzione acquosa di NADPH, preparata al momento dell'uso), e diluite opportunamente al momento dell'uso. Acetonitrile, metanolo e KH_2PO_4 sono stati acquistati dalla Carlo Erba Reagenti (Milano).

Microsomi epatici

I microsomi epatici umani impiegati nello studio, sono stati acquistati dalla XenotechLLC (Lenexa, KS, USA). La preparazione utilizzata, caratterizzata dal fornitore per quanto riguarda la concentrazione di proteina totale (20 mg/ml), era costituita da un *pool* di microsomi, ottenuti da tessuto epatico proveniente da 50 diversi donatori (21 femmine e 29 maschi).

Condizioni generali di incubazione

Il diclofenac è stato incubato in condizioni aerobie a 37 °C per 20 min con microsomi epatici umani (0,05 mg di proteina totale/ml) e NADPH (0,5 mM) in assenza (controllo) o in presenza di un flavonoide (luteolina o diosmetina; concentrazione finale 0,5-30 μM) in KH_2PO_4 0.1 M (pH 7,4; volume finale del mezzo di incubazione 200 μl). Ciascuna reazione è stata avviata mediante l'aggiunta del NADPH alla miscela dei rimanenti componenti, che era stata preincubata a 37 °C per 3 min. Le miscele di reazione di controllo sono state allestite in maniera tale da contenere un quantitativo di solvente organico (metanolo o dimetilformammide, rispettivamente, per luteolina e diosmetina) identico a quello presente nei campioni contenenti il flavonoide (1% v/v). Al termine del periodo di incubazione (20 min), a ciascun campione sono stati aggiunti 50 μl di acetonitrile freddo (tenuto in ghaccio), al fine di arrestare la reazione; successivamente i campioni sono stati agitati, utilizzando un Vortex, e poi centrifugati a 20.000 g a 4°C. Aliquote (100 μl) dei surnatanti ottenuti sono state successivamente analizzate mediante cromatografia liquida ad elevate prestazioni (HPLC).

Analisi della cinetica di formazione del 4'OH-diclofenac

Al fine di determinare i parametri cinetici (costante di Michaelis-Menten, K_m; velocità massimale, V_{max}) relativi alla conversione del diclofenac in 4'OH-diclofenac in assenza e in presenza di flavonoide, il substrato è stato incubato con microsomi epatici e NADPH (vedi "condizioni generali di incubazione") a concentrazioni comprese tra 3 e 50 µM (n=6). In esperimenti iniziali condotti in assenza di solvente organico nel mezzo d'incubazione, la concentrazione del diclofenac era compresa tra 1 e 50 µM (n=8). K_m e V_{max} sono stati determinati mediante regressione non lineare dei dati utilizzando l'equazione di Michaelis-Menten

$$V = \frac{V_{max} \cdot [S]}{[S] + k_m}$$

e il software GraphPad Prism, versione 3.03 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). I valori dei parametri cinetici ottenuti sono espressi come media ± errore standard di stima del parametro.

La costante di dissociazione del complesso inibitore-enzima (K_i) dei flavonoidi luteolina e diosmetina è stata determinata previa costruzione dei rispettivi grafici K_m/V_{max} *vs* concentrazione del flavonoide e successiva regressione lineare dei dati. L'intercetta con l'asse delle ascisse della retta ottenuta è pari a $-K_i$ (Segel, 1993).

Analisi HPLC dei surnatanti di incubazione

I surnatanti ottenuti sono stati analizzati mediante HPLC con rivelazione spettrofotometrica. Il metodo adottato, messo a punto recentemente nel laboratorio presso cui ho svolto il tirocinio di tesi, rappresenta la modifica di un protocollo di analisi HPLC per la determinazione del 4'OH-diclofenac in incubati del diclofenac con microsomi epatici e NADPH, descritto da Leeman et al. (1993).

L'apparecchiatura utilizzata consisteva in un sistema per cromatografia in fase liquida ad elevate prestazioni HP 1050 (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA), composto da una pompa quaternaria, un sistema di degasaggio dei solventi, un campionatore automatico, un comparto colonna termostatato, un rivelatore spettrofotometrico UV-visibile a lunghezza d'onda variabile fissato a 282 nm, ed un Personal Computer interfacciato che permetteva di controllare la strumentazione, l'acquisizione e l'elaborazione dei segnali con l'ausilio di un software appropriato (ChemStation for LC, Hewlett-Packard). La separazione cromatografia è stata condotta utilizzando una colonna a fase inversa Zorbax Eclipse XDB-C8 (4,6 x 150 mm, 5µm; Agilent Technologies; Palo Alto, CA, USA). La fase mobile utilizzata era costituita da una soluzione acquosa 20 mM di KH_2PO_4 (pH 7,4) e acetonitrile nel rapporto 80:20 v/v (solvente A) e 100% acetonitrile (solvente B). La soluzione acquosa è stata filtrata prima dell'uso utilizzando filtri di nylon da 0,2 µm (Albet, Spagna). Il programma di eluizione

adottato prevedeva una fase di eluizione isocratica con 100% del solvente A nei primi 10 min di corsa, seguita da una eluizione in gradiente lineare da 0% a 45% del solvente B nel corso dei successivi 10 min. L'eluizione del diclofenac e del suo metabolita è stata condotta a temperatura ambiente e al flusso costante di 1,0 ml/min .

Diclofenac e 4'OH-diclofenac (Fig. II) sono stati identificati nei campioni analizzati mediante il confronto con il tempo di ritenzione dei picchi ottenuti in seguito all'iniezione di soluzioni dei singoli composti puri. Nelle condizioni cromatografiche adottate i tempi di ritenzione di diclofenac e 4'OH-diclofenac erano rispettivamente 16,3 e 8,6 min. La determinazione quantitativa del 4'OH-diclofenac nei campioni analizzati (surnatanti di incubazione) è stata effettuata sulla base di curve di taratura ottenute giornalmente iniettando soluzioni a concentrazioni note del metabolita (*standard* di calibrazione preparati nella stessa matrice dei campioni sperimentali) e integrando l'area dei rispettivi picchi cromatografici (Fig. III).

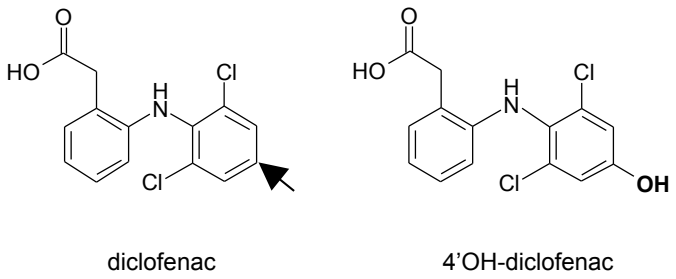


Fig II: Struttura chimica del diclofenac e del suo metabolita, 4'OH-diclofenac, prodotto via CYP2C9. La freccia indica il sito di ossidrilazione del substrato.

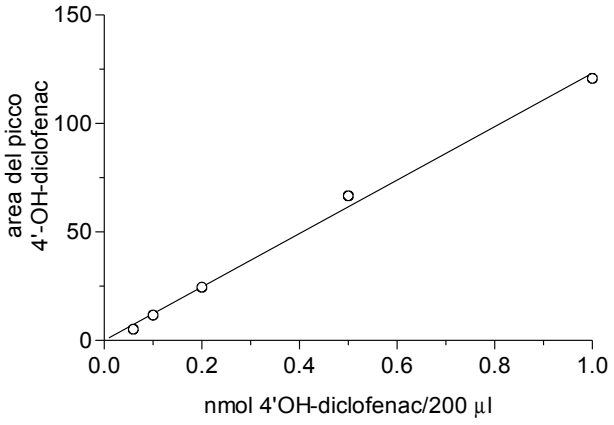


Fig. III. Esempio di curva di taratura utilizzata per la quantificazione del metabolita 4'OH-diclofenac.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Come riportato precedentemente, vari flavonoidi naturali sono noti per la loro capacità di modulare l'attività di importanti enzimi metabolizzanti i farmaci nell'uomo, tra cui il citocromo P450 (CYP) 1A2, il CYP3A4 e gli enzimi di fase II sulfotransferasi e glucuroniltransferasi (Moon et al., 2006). Essi sono pertanto potenzialmente in grado di interferire con il metabolismo intestinale ed epatico di vari farmaci, soprattutto se assunti in dosi relativamente elevate, come si può verificare in seguito all'utilizzo di integratori alimentari o preparazioni farmaceutiche contenenti tali composti.

Obiettivo primario del presente lavoro di tesi è stato quello di ottenere informazioni circa la capacità di un flavonoide naturale, la diosmetina, di influenzare l'attività catalitica del CYP2C9, enzima microsomiale espresso a livelli relativamente elevati sia nel fegato sia nell'intestino umano e responsabile del metabolismo di numerosi farmaci (Yuan et al., 2002). La diosmetina rappresenta infatti il prodotto di idrolisi, catalizzato da glicosidasi intestinali, della diosmina (diosmetina 7-ramnoglucoside), flavonoide glicosilato utilizzato in terapia umana nel trattamento di alcune malattie vascolari (Cova et al., 1992; Lyseng-Williamson e Perry, 2003). A tal fine, l'effetto della diosmetina sulla biotrasformazione del diclofenac, un substrato del CYP2C9, da parte di microsomi epatici umani è stato confrontato con quello della luteolina, flavonoide per il quale sono già disponibili in letteratura dati *in vitro* di inibizione dell'attività CYP2C9 epatica (inibizione dell'attività tolbutamide 4'-idrossilasi; Foti et al., 2007) e presente in vari preparati erboristici ed "integratori alimentari" (es. www.lutimax.com).

Il diclofenac è noto essere trasformato, via CYP2C9, in 4'OH-diclofenac (Yuan et al., 2002), metabolita che è stato facilmente identificato e quantificato nei surnatanti di incubazione del farmaco con microsomi epatici umani e NADPH, in assenza e in presenza di ciascuno dei flavonoidi studiati. In Fig. 1 è riportato, a titolo di esempio, un cromatogramma relativo all'analisi di una miscela di incubazione di microsomi epatici umani con diclofenac e NADPH.

Un primo gruppo di esperimenti è stato condotto al fine di valutare la cinetica di formazione del 4'OH-diclofenac da parte della preparazione microsomiale epatica acquistata dalla XenotechLLC (rappresentata da un *pool* di microsomi epatici umani ottenuti da 50 diversi donatori) che si intendeva utilizzare nei successivi saggi volti a caratterizzare l'interazione di diosmetina e luteolina con il CYP2C9 microsomiale. A tal fine i microsomi sono stati incubati, in presenza di NADPH, con concentrazioni crescenti di diclofenac (1-50 μM; n=8). Come mostrato in Fig. 2, la formazione di 4'OH-diclofenac segue una cinetica iperbolica (cinetica di Michaelis-Menten) confermata dalla linearità del corrispondente grafico di Eadie-Hofstee (velocità *vs* velocità/concentrazione del substrato; inserto di Fig. 2); ciò suggerisce il coinvolgimento nella reazione di un singolo enzima microsomiale (CYP2C9). Risultati analoghi sono stati ottenuti da Leemann e Collaboratori (1993).

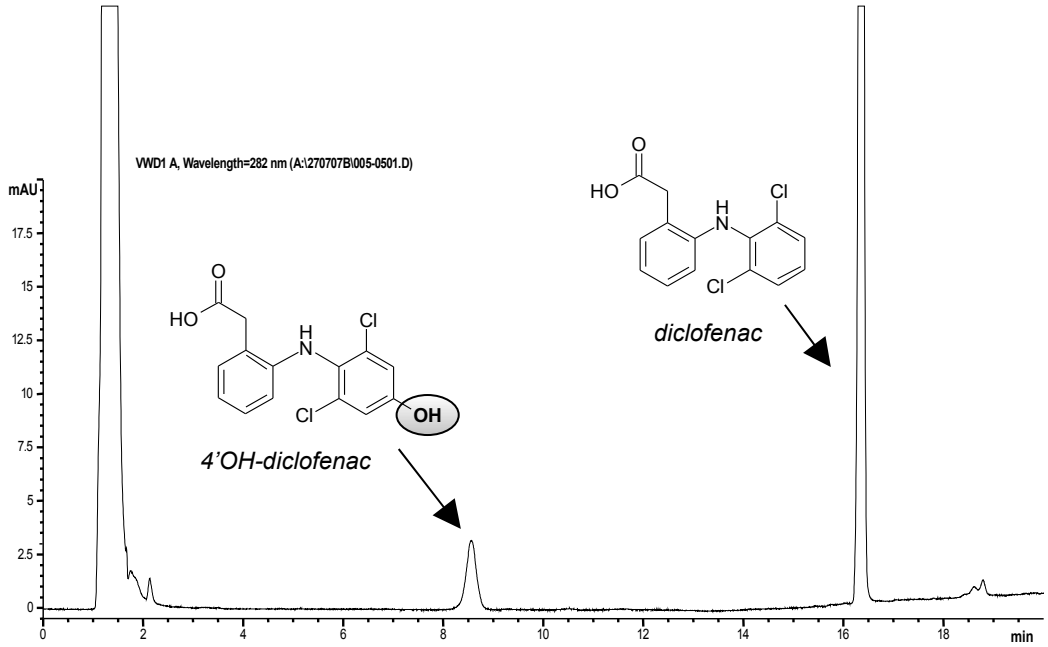


Fig. 1: Esempio di cromatogramma relativo alla separazione del diclofenac dal suo metabolita 4'OH-diclofenac. Il diclofenac (25 µM) era stato incubato per 20 min a 37°C con microsomi epatici umani (0,05 mg/ml) e NADPH (0,5 mM) e il relativo surnatante di incubazione analizzato mediante HPLC con rivelazione UV a 282 nm come descritto nella sezione "Materiali e metodi".

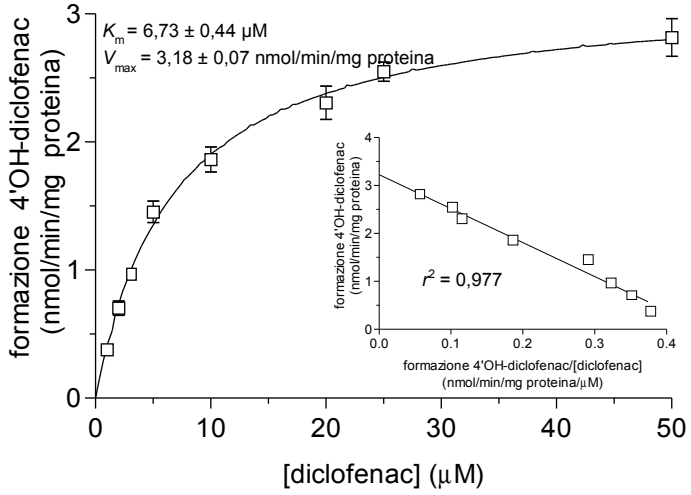


Fig 2: **Effetto della concentrazione di substrato (diclofenac) sulla velocità di formazione di 4'OH-diclofenac da parte di microsomi epatici umani.** Il diclofenac (1-50 µM; n=8) è stato incubato per 20 min a 37°C con microsomi epatici umani (0,05 mg/ml di proteina totale) in presenza di NADPH (0,5 mM) in 0,1 M KH_2PO_4 (pH 7,4). La formazione di 4'OH-diclofenac è stata valutata mediante HPLC come descritto nella sezione "Materiali e metodi". Ciascun valore rappresenta la media ± deviazione standard di tre determinazioni effettuate in esperimenti distinti. Nell'inserto è riportata la rappresentazione grafica dei dati secondo Eadie-Hofstee. I valori di K_m e V_{max} sono espressi come media ± errore standard di stima del parametro.

L'analisi dei dati ottenuti ha permesso di determinare i parametri cinetici della reazione K_m (costante di Michaelis-Menten) e V_{max} (velocità massima) i cui valori sono risultati rispettivamente pari a 6,73 ± 0,44 µM e 3,18 ± 0,07 nmol di 4'OH-diclofenac prodotto/min/mg proteina. E' interessante notare come il valore di K_m ottenuto (6,73 µM) risulti sovrapponibile a quello riportato da Leemann e Collaboratori (5,6 µM; Leemann et al., 1992).

Successivi esperimenti sono stati condotti al fine di valutare l'effetto di concentrazioni scalari di diosmetina e luteolina (0,5-30 µM) sulla velocità di produzione del 4'OH-diclofenac; in questi saggi la concentrazione del diclofenac nel mezzo di incubazione era pari a 5 µM (~K_m). I risultati riportati in Fig. 3, dimostrano come entrambi i flavonoidi siano in grado di inibire in modo concentrazione-dipendente l'attività diclofenac 4'-idrossilasi. In entrambi i casi una concentrazione di flavonoide pari a 30 µM si è dimostrata in grado di ridurre l'attività enzimatica al di sotto del limite di rivelazione del metodo (Fig. 3).

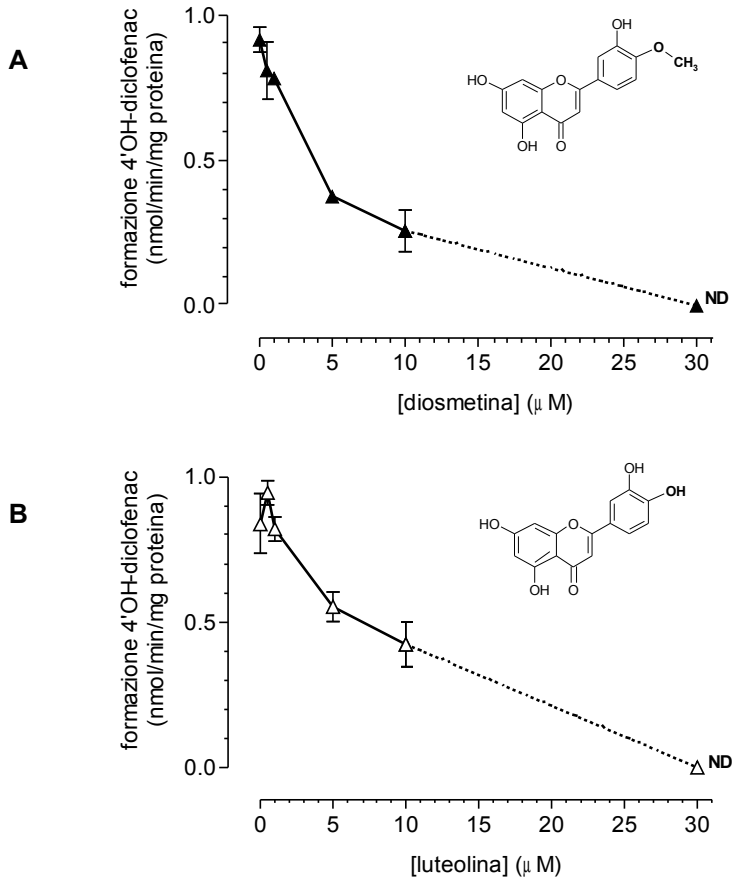
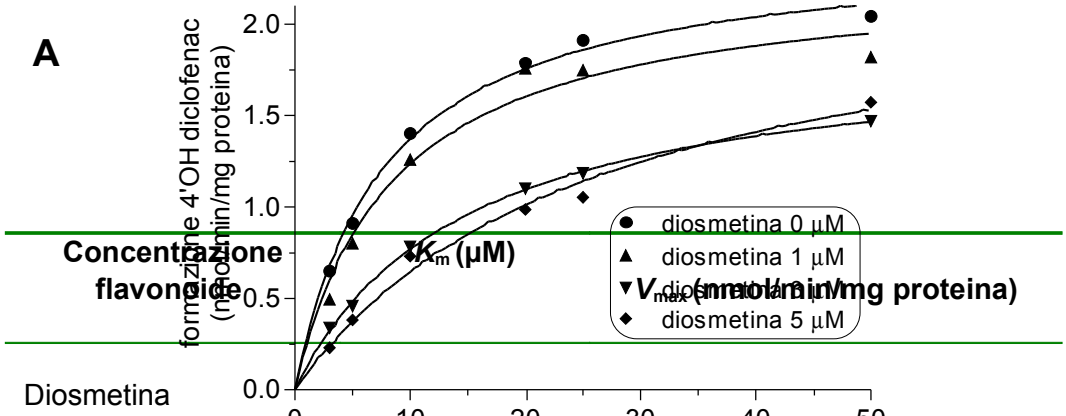


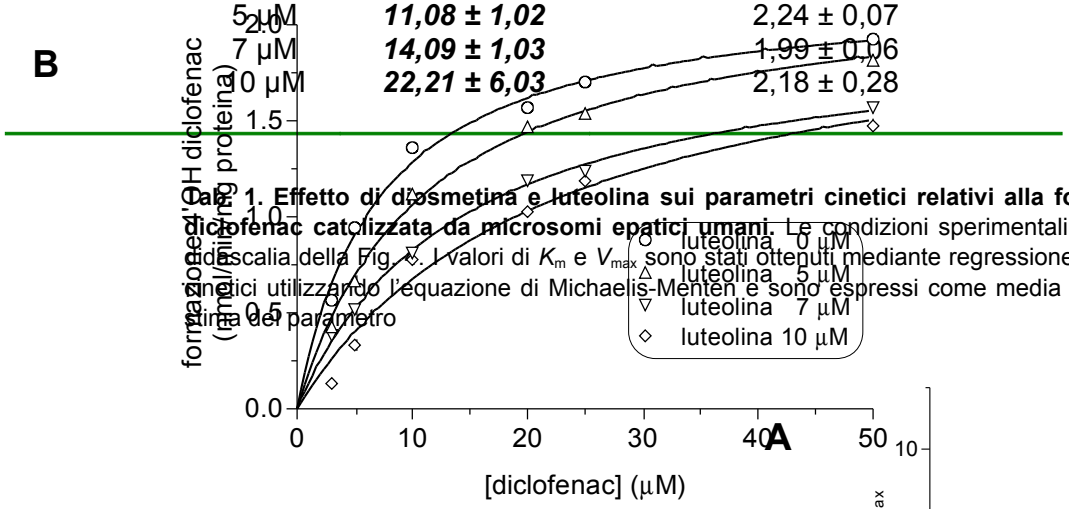
Fig. 3: **Effetto di concentrazioni crescenti di diosmetina (pannello A) e luteolina (pannello B) sull'attività diclofenac 4'-idrossilasi in microsomi epatici umani.** Il diclofenac (5 µM) è stato incubato in KH_2PO_4 0,1 M (pH 7,4) per 20 min a 37°C con microsomi epatici umani (0,05 mg/ml) in presenza di NADPH (0,5 mM) e in assenza (controllo) o in presenza di diosmetina o luteolina (0,5-30 µM). La formazione di 4'OH-diclofenac è stata valutata mediante HPLC come descritto nella sezione "Materiali e metodi". Ciascun valore rappresenta la media ± deviazione standard di tre determinazioni effettuate in esperimenti distinti.
ND: non rilevabile.

I dati ottenuti suggeriscono, inoltre, che la diosmetina possieda una maggiore capacità di inibizione dell'attività dell'enzima CYP2C9 rispetto alla luteolina, in quanto a tutte le concentrazioni utili testate (0,5-10 μM), l'effetto inibitorio della prima sulla produzione del metabolita 4'OH-diclofenac è risultato essere sensibilmente superiore rispetto a quello della seconda (massima inibizione rispettivamente al 71,9% e 49,3% a 10 μM).
E' interessante notare come in entrambi i gruppi di esperimenti l'attività enzimatica nei campioni di controllo sia risultata sensibilmente inferiore a quella osservata per la stessa concentrazione di substrato (5 μM) nei precedenti esperimenti di cinetica enzimatica [1,45 nmol/min/mg proteina (Fig. 2) *vs* 0,91 nmol/min/mg proteina (controllo diosmetina) e 0,84 nmol/min/mg proteina (controllo luteolina)]. Ciò è riconducibile alla presenza in tali campioni di una quantità pari all'1% (v/v) del solvente organico che è stato necessario utilizzare quale veicolo per la preparazione delle soluzione "madre" dei due flavonoidi (rispettivamente dimetilformammide e metanolo per diosmetina e luteolina). Analoghi effetti inibitori di dimetilformammide e metanolo sull'attività CYP2C9 (inibizione di ~40% dell'attività microsomiale epatica tolbutamide 4'-idrossilasi) sono stati osservati da Hickman e Collaboratori (1998).

Al fine di ottenere informazioni circa il meccanismo di inibizione dei flavonoidi considerati nei confronti del CYP2C9, è stato valutato l'effetto della presenza nel mezzo di incubazione di diosmetina e luteolina sulla cinetica di formazione del 4'OH-diclofenac. Microsomi epatici umani sono stati infatti incubati con concentrazioni crescenti di diclofenac (3-50 μM; n=6) in assenza (controllo; "0 μM flavonoide") e in presenza di tre diverse concentrazioni di luteolina e diosmetina. I risultati di tali esperimenti sono riassunti in Fig. 4.
La regressione non lineare dei dati ottenuti, utilizzando l'equazione di Michaelis-Menten (Fig. 4) ha permesso di calcolare i parametri cinetici di reazione i cui valori sono riportati in Tab. 1. La presenza nel mezzo di incubazione di diosmetina o luteolina ha determinato un aumento, in funzione della concentrazione di flavonoide presente, del valore di K_m non modificando, per contro, sensibilmente il valore di V_{max} (Tab. 1). Cio suggerisce che entrambi i flavonoidi fungano da inibitori competitivi dell'enzima microsomiale CYP2C9.
La determinazione dei parametri K_m e V_{max} della reazione di ossidazione in posizione 4' del diclofenac, in assenza e in presenza di diverse concentrazioni dei due flavonoidi, ha anche permesso la valutazione della costante di dissociazione del complesso inibitore-enzima (K_i), parametro che esprime l'affinità dell'inibitore per l'enzima stesso. Ponendo infatti in ordinata il rapporto K_m/V_{max} e in ascissa la concentrazione di flavonoide, sono stati costruiti dei grafici ("grafici secondari"; Segel, 1993), caratterizzati da un andamento lineare dei dati, dai quali è stato ottenuto il valore $-K_i$, rappresentato dall'intercetta della retta di regressione sull'asse delle ascisse (Fig. 5).



Concentrazione flavonoide	K_m (μM)	V_{max} (nmol/min/mg proteina)
Diosmetina		
0 μM	***7,75 ± 0,73***	2,43 ± 0,07
1 μM	***8,45 ± 1,90***	2,28 ± 0,17
3 μM	***14,67 ± 0,70***	1,90 ± 0,04
5 μM	***26,26 ± 5,33***	2,33 ± 0,24
Luteolina		
0 μM	***7,08 ± 0,87***	2,19 ± 0,08
5 μM	***11,08 ± 1,02***	2,24 ± 0,07
7 μM	***14,09 ± 1,03***	1,99 ± 0,06
10 μM	***22,21 ± 6,03***	2,18 ± 0,28



Tab. 1. Effetto di diosmetina e luteolina sui parametri cinetici relativi alla formazione di 4'OH-diclofenac catalizzata da microsomi epatici umani. Le condizioni sperimentali sono riportate nella didascalia della Fig. 4. I valori di K_m e V_{max} sono stati ottenuti mediante regressione non lineare dei dati cinetici utilizzando l'equazione di Michaelis-Menten e sono espressi come media ± errore standard di stima del parametro

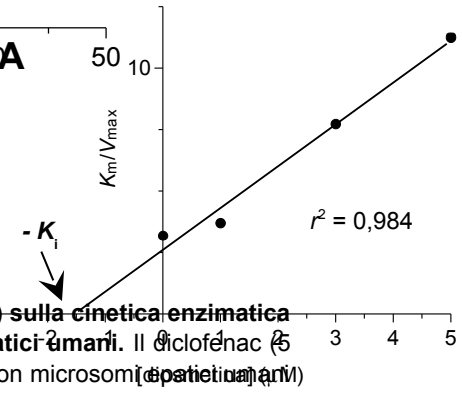


Fig. 4: Effetto di diosmetina (pannello A) e luteolina (pannello B) sulla cinetica enzimatica di formazione del 4'OH-diclofenac catalizzata da microsomi epatici umani. Il diclofenac (5 μM) è stato incubato in KH_2PO_4 0,1 M (pH 7,4) per 20 min a 37°C con microsomi epatici umani (0,05 mg/ml) in presenza di NADPH (0,5 mM) e in assenza (controllo; "0 μM flavonoide") o in presenza di diosmetina o luteolina (0,5-30 μM).
La formazione di 4'OH-diclofenac è stata valutata mediante HPLC come descritto nella sezione "Materiali e metodi". Ciascun valore rappresenta la media di due determinazioni effettuate in esperimenti distinti.

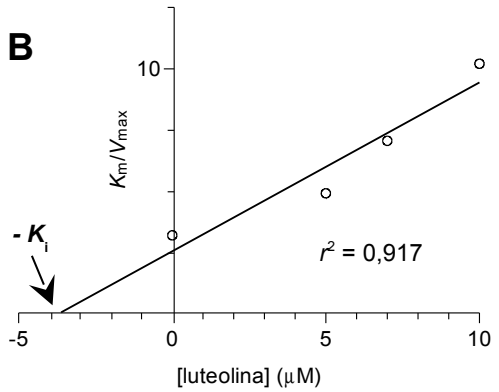


Fig 5. Grafico secondario (K_m/V_{max} vs concentrazione dell'inibitore) relativi all'effetto dei flavonoidi diosmetina (pannello A) e luteolina (pannello B) sulla cinetica di formazione di 4'OH-diclofenac da parte di microsomi epatici umani.

I valori di K_i di diosmetina e luteolina sono risultati essere pari rispettivamente a 1,58 e 3,78 μM; ciò conferma la maggior potenza della prima nell'inibire l'attività CYP2C9 già suggerita dalle curve concentrazione-effetto riportate in Fig. 3.

In conclusione i dati ottenuti dimostrano come diosmetina e luteolina siano in gradi di inibire sensibilmente e con meccanismo competitivo la biotrasformazione epatica del diclofenac in 4'OH-diclofenac, reazione nota per essere mediata dall'enzima CYP2C9 (Yuan, 2002). Entrambi i flavonoidi sono pertanto potenzialmente in grado di interferire *in vivo* con l'attività dell'enzima CYP2C9, e di modificare quindi l'eliminazione di farmaci metabolizzati da tale enzima, come suggerito da un recente studio di interazione in *vivo* tra diosmina e diclofenac (Rajnarayana, 2007).

BIBLIOGRAFIA

Cova D, De Angelis L, Giavarini F, Palladini G, Perego R. Pharmacokinetics and metabolism of oral diosmin in healthy volunteers. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol* (1992) **30**:29-33.

Foti RS, Wahlstrom JL, Wienkers LC. The in vitro drug interaction potential of dietary supplements containing multiple herbal components. *Drug Metab Dispos*. (2007) **35**:185-8.

Halsted CH. Dietary supplements and functional foods: 2 sides of a coin? *Am. J. Clin. Nutr.* (2003) **77**:1001S-1007S.

Hickman D, Wang JP, Wang Y, Unadkat JD. Evaluation of the selectivity of In vitro probes and suitability of organic solvents for the measurement of human cytochrome P450 monooxygenase activities.*Drug Metab Dispos.*(1998) **26**:207-15.

Leemann T, Transon C, Dayer P. Cytochrome P450TB (CYP2C): a major monooxygenase catalyzing diclofenac 4'-hydroxylation in human liver. *Life Sci.* (1993) **2**:29-34.

Lyseng-Williamson KA, Perry CM. Micronized purified flavonoid fraction: a review of its use in chronic venous insufficiency, venous ulcers and haemorrhoids. *Drugs* (2003) **63**:71-100.

Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability *Am. J. Clin. Nutr*. (2004) **79**:727-747

Moon YJ, Wang X, Morris ME. Dietary flavonoids: effects on xenobiotic Carcinogen metabolism. *Toxicol. in Vitro*. (2006) **20**:187-210.

Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, Stegeman JJ, Feyereisen R, Waxman DJ, Waterman MR, Gotoh O, Coon MJ, Estabrook RW, Gunsalus IC, Nebert DW. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* (1996) **6**:1-42.

Quintieri L. Biotrasformazione dei farmaci, in Dorigo P, Farmacologia generale, III ed. CEDAM, Padova, 2006, pp 144-173.

Rajnarayana K, Venkatesham A, Krishna DR. Bioavailability of diclofenac sodium after pretreatment with diosmin in healthy volunteers.*Drug Metabol Drug Interact* (2007) **22**:165-74.

Rajnarayana K, Reddy MS, Krishna DR. Diosmin pretreatment affects bioavailability of metronidazole. *Eur J Clin Pharmacol* (2003) **58**:803-7.

Ross JA, Kasum CM. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects and safety. *Annu. Rev. Phys*io. (2002) **22**:19-34.

Segel IH. Enzyme Kinetics, Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems. John Wiley and Sons Inc., New York (1993).

Yuan R, Madani S, Wei X, Reynolds K, Huang SM. Evaluation of cytochrome P450 probe substrates commonly used by the pharmaceutical industry to study in vitro drug interactions. *Drug Metab. Dispos*. (2002) **30**:1311-1319.