Utjecaj flavonoida na metaboličku aktivnost enzima citokrom P450 u uvjetima in vitro

Šarić Mustapić, Darija

Doctoral thesis / Disertacija

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:037159

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-25**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

BIOLOŠKI ODSJEK

Darija Šarić Mustapić

UTJECAJ FLAVONOIDA NA METABOLIČKU AKTIVNOST ENZIMA CITOKROM P450 U UVJETIMA *IN VITRO*

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2020.

University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE

DEPARTMENT OF BIOLOGY

Darija Šarić Mustapić

THE EFFECT OF FLAVONOIDS ON THE METABOLIC ACTIVITY OF CYTOCHROMES P450 *IN VITRO*

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2020

Ovaj doktorski rad izrađen je na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Željka Debeljaka i izv. prof. dr. sc. Mirze Bojića, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog doktorskog studija Biologija, pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te u okviru projekta "Metabolizam i interakcije biološki aktivnih spojeva i QSAR" Hrvatske zaklade za znanost (UIP-2014-09-5704).

Informacije of mentorima

izv. prof. dr. sc. Željko Debeljak

Dr. sc. Željko Debeljak, specijalist medicinske biokemije, voditelj je Odjela za kliničku kemiju, Zavoda za kliničku laboratorijsku dijagnostiku, KBC Osijek i izvanredni je profesor na Katedri za farmakologiju, Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Osijeku. Farmaceutsko-biokemijski fakultet, studij medicinske biokemije, završio je 1996. godine u Zagrebu. Stručni poslijediplomski studij završio je 2006. godine te stekao zvanje specijalista medicinske biokemije. Znanstveni poslijediplomski doktorski studij završio je 2007. godine u znanstvenom području biomedicine i zdravstva. Područja njegovog stručnog interesa protežu se od primjena računalnih metoda u biomedicini, preko farmakologije i dizajna lijekova do analitičkih tehnika u kliničkoj laboratorijskoj dijagnostici. Surađivao je na nekoliko projekata financiranih od strane Europske unije, Ministarstva znanosti i obrazovanja Republike Hrvatske te Hrvatske zaklade za znanost. Od 2017. do 2019. godine vodio je projekt financiran od strane Europskog fonda za regionalni razvoj te Ministarstva znanosti i obrazovanja Republike Hrvatske, pod nazivom „Research and Diagnostics of Malignant, Infective and Rare metabolic Diseases Based on MALDI TOF Technology". Koautor je 10 poglavlja u knjigama, 22 članka objavljenih u časopisima indeksiranim u Current Contents bazi, 14 članaka objavljena u časopisima indeksiranim u Web of Science bazi te je sudjelovao kao pozivni predavač na brojnim međunarodnim skupovima. Član je Hrvatskog društva farmakologa te Hrvatskog društva za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu.

izv. prof. dr. sc. Mirza Bojić

Dr. sc. Mirza Bojić izvanredni je profesor na Zavodu za farmaceutsku kemiju, Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Doktorat u području farmaceutskih znanosti stekao je na Sveučilištu u Zagrebu 2012. godine. Tijekom 2013. i 2014. godine, kao poslijedoktorand boravio je na Sveučilištu Vanderbilt, Nashville, TN, SAD u laboratoriju prof. dr. sc. F. P. Guengericha, jednog od pionira u području istraživanja citokroma P450. Voditelj je poslijediplomskog specijalističkog studija Toksikologije, kolegija Biokemija lijekova i Biokemijske osnove toksičnosti endobiotika i ksenobiotika te je uključen u izvođenje nastave studija farmacije na Sveučilištu u Mostaru. Znanstveni rad obuhvaća analitiku i biološke učinke flavonoida te matematičko modeliranje. Mentor je tri doktorska, jednog specijalističkog i 15 diplomskih radova. Surađivao je na nekoliko projekata financiranih od strane Europske unije (ESF, IPA, terminološki projekt EK), Nacionalnih instituta za zdravlje (NIH), Ministarstva znanosti Republike Hrvatske i Sveučilišta u Zagrebu. Od 2015. do 2018. godine vodio je uspostavni istraživački projekt Metabolizam i interakcije biološki aktivnih spojeva i QSAR. Koautor je jednog sveučilišnog udžbenika, tri poglavlja u knjizi, 34 znanstvena rada, 16 stručnih radova i preko 100 usmenih i posterskih priopćenja. Član je uredničkog odbora Farmaceutskog glasnika. Nacionalni je ekspert u području biomedicine i zdravstva pri Glavnom uredu za pismena prevođenja Europske komisije.

Zahvala

Najsrdačnije se zahvaljujem mentoru izv. prof. dr. sc. Željku Debeljaku na ukazanom povjerenju prilikom prihvaćanja obveze mentorstva te na strpljenju, stručnom vodstvu i korisnim savjetima tijekom izrade ovog doktorskog rada.

Zahvaljujem se mentoru izv. prof. dr. sc. Mirzi Bojiću na iznimnoj kolegijalnosti, posebice u završnoj fazi izrade disertacije.

Zahvaljujem se dr. sc. Hrvoju Rimcu, na nesebičnoj pomoći i stručnim savjetima, kao i kolegi dr. sc. Goranu Benkoviću na prijateljskoj suradnji tijekom izrade eksperimentalnog dijela rada. Također se zahvaljujem kolegi Martinu Kondži, mag. pharm. na susretljivosti i razumijevanju.

Prof. dr. sc. Vlasti Bradamante zahvaljujem se na pažljivom i strpljivom čitanju rada te stručnim i konstruktivnim savjetima u konačnom oblikovanju disertacije.

Veliko hvala HALMED-u na svekolikoj pomoći pri realizaciji ove disertacije.

Posebno zahvaljujem mojoj majci na razumijevanju, brojnim stručnim i životnim savjetima te podršci koju mi je pružala tijekom cijelog perioda izrade ove disertacije.

Hvala mom tati na podršci i ljubavi koju mi je pružao svih ovih godina, kao i cijeloj mojoj obitelji.

Veliko hvala suprugu Marinu na bezgraničnom razumijevanju i bezrezervnoj podršci, kao i sinu Jakovu i kćerkici Sari, mojim malim anđelima kojima ovaj rad i posvećujem...♥

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Doktorski rad

UTJECAJ FLAVONOIDA NA METABOLIČKU AKTIVNOST ENZIMA CITOKROM P450 U UVJETIMA *IN VITRO*

DARIJA ŠARIĆ MUSTAPIĆ

Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

U svrhu ispitivanja inhibicijskog učinka flavonoida na metaboličku aktivnost enzima citokrom P450, primijenjene su reakcije biotransformacije: 6β-hidroksilacija testosterona (CYP3A4), *O*-demetilacija dekstrometorfana (CYP2D6), *O*-deetilacija fenacetina (CYP1A2), 7-hidroksilacija kumarina (CYP2A6) i 6α-hidroksilacija paklitaksela (CYP2C8). Ostatna aktivnost enzima citokrom P450 određena je primjenom HPLC-DAD analitičke metode. Sedam flavonoida pokazalo je statistički značajan potencijal za inhibiciju CYP3A4 ($P < 0,05$), pet za inhibiciju CYP1A2, dok rezultati ispitivanja inhibicije enzima CYP2A6 ukazuju na značajan inhibicijski potencijal ukupno četiri flavonoida. Niti jedan ispitivani flavonoid nije pokazao statistički značajnu inhibiciju CYP2D6. Tri flavonoida inhibirala su aktivnost enzima CYP2C8. Za najpotentnije inhibitore (akacetin, krizin, apigenin), metodom molekularnog sidrenja, procijenila su se potencijalna vezna mjesta te najvjerojatnija konformacija kompleksa flavonoida i enzima CYP3A4. Rezultati molekularnog sidrenja pokazuju kako su energije vezanja molekulskih specija u aktivno mjesto CYP3A4 niže od energija vezanja anionskih specija. Sve najbolje rangirane molekulske specije orijentirane su s prstenom B u blizini hemskog željeza. U konačnici je provedena analiza kvantitativnog odnosa strukture i djelovanja (QSAR) primjenom metode slučajne šume i metodom tvorbe dendrograma. Svi odabrani deskriptori ukazuju da je za značajnu inhibiciju CYP3A4 potreban što hidrofobniji prsten B koji stupa u interakciju s hemskim željezom. Hijerarhijska tvorba klastera pokazala je kako ispitivani flavonoidi podjednako uspješno inhibiraju CYP3A4, CYP1A2, CYP2A6 i CYP2C8. U slučaju CYP2A6 dodatno je utvrđena statistički značajna povezanost ostatne aktivnosti s energijom najviše popunjene molekulske orbitale (E_{HOMO}).

Ključne riječi: flavonoidi, CYP, inhibicija, QSAR

Mentori: izv. prof. dr. sc. Željko Debeljak
izv. prof. dr. sc. Mirza Bojić

Ocjenjivači: izv. prof. dr. sc. Vesna Rastija
prof. dr. sc. Tomislav Bolanča
izv. prof. dr. sc. Sandra Radić Brkanac

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Doctoral thesis

THE EFFECT OF FLAVONOIDS ON THE METABOLIC ACTIVITY OF CYTOCHROMES P450 *IN VITRO*

DARIJA ŠARIĆ MUSTAPIĆ

Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb

The inhibitory effect of flavonoids on the metabolic activity of the cytochrome P450 enzyme was tested using the biotransformation reactions: 6β-hydroxylation of testosterone (CYP3A4), *O*-demethylation of dextromethorphan (CYP2D6), *O*-deethylation of phenacetin (CYP1A2), coumarin 7-hydroxylation (CYP2A6) and 6α-hydroxylation of paclitaxel (CYP2C8). The residual activity of cytochrome P450 enzymes was determined using HPLC-DAD analytical method. Seven flavonoids showed statistically significant potential for CYP3A4 inhibition ($P < 0.05$), five flavonoids showed CYP1A2 inhibition, while the results of the CYP2A6 enzyme inhibition assay showed significant inhibitory potential of four flavonoids. None of the flavonoids tested showed statistically significant CYP2D6 inhibition. Three flavonoids, inhibited CYP2C8 enzyme activity. For the most potent inhibitors (acacetin, chrysin, apigenin), the most likely conformation in the active site of the CYP3A4, as well as the potential binding site, was determined by molecular docking study. Docking results showed that the binding energies of the molecular spices in the CYP3A4 active site are lower than the anion spices. All the top-ranked molecular species are oriented with ring B toward heme iron. Quantitative structure activity relationship (QSAR) analysis was performed using the random forest method and the hierarchical clustering method. All selected descriptors indicate that a significant hydrophobic B ring, interacting with the heme iron, is required for significant inhibition of CYP3A4. The hierarchical cluster formation showed that tested flavonoids equally successfully inhibit CYP3A4, CYP1A2, CYP2A6 and CYP2C8. In the case of CYP2A6, a statistically significant dependence of residual activity and the highest occupied molecular orbital energy (E_{HOMO}) was further established.

Keywords: flavonoids, CYP enzyme, inhibition, QSAR

Supervisors: associate professor Željko Debeljak, PhD
associate professor Mirza Bojić, PhD

Reviewers: associate professor Vesna Rastija, PhD
full professor Tomislav Bolanča, PhD
associate professor Sandra Radić Brkanac, PhD

SADRŽAJ

1. UVOD 1

1.1. Hipoteza i ciljevi istraživanja 5

2. LITERATURNI PREGLED 7

2.1. FLAVONOIDI 8

2.2. ENZIMI CITOKROM P450 14

2.3. INHIBICIJA AKTIVNOSTI ENZIMA CITOKROM P450 18

2.4. TEORIJSKA OSNOVA MOLEKULARNOG MODELIRANJA 21

2.4.1. QSPR i QSAR modeliranje 21

2.4.1.1. Molekulski deskriptori 22

2.4.1.2. Metoda slučajne šume 24

2.4.1.3. Validacija računalnog postupka 25

2.4.1.4. Molekularno sidrenje 26

2.5. INHIBICIJSKI POTENCIJAL FLAVONOIDA NA METABOLIZAM POSREDOVAN ENZIMIMA CITOKROM P450 29

3. EKSPERIMENTALNI DIO 40

3.1. MATERIJALI 41

3.1.1. Flavonoidi, izvori enzima citokrom P450, marker supstrati i marker inhibitori 41

3.1.2. Kemikalije i radne otopine 44

3.1.3. Instrumenti 45

3.1.4. Programski paketi za obradu podataka 45

3.2. METODE 46

3.2.1. Ispitivanje metaboličke aktivnosti enzima citokrom P450 46

3.2.1.1. Inkubacije s enzimima citokrom P450 46

3.2.1.2. Praćenje metaboličke aktivnosti enzima citokrom P450 tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti 52

3.2.2. Određivanje tipa inhibicije 54

3.2.3. Statistička obrada podataka 54
3.2.4. Računalne metode 55
3.2.4.1. Molekulski deskriptori 55
3.2.4.2. Klasifikacijska analiza 57
3.2.4.3. Predikcija inhibicije 57
3.2.4.4. Molekularno sidrenje 58
4. REZULTATI 61
4.1. ISPITIVANJE INHIBICIJE ENZIMA CYP 62
4.1.1. Ispitivanje i određivanje tipa inhibicije za citokrome P450 63
4.2. MOLEKULSKI DESKRIPTORI I QSAR 67
4.2.1. Izračunavanje i odabir molekulskih deskriptora 67
4.2.2. QSAR analiza 80
4.2.3. Predikcija inhibicije citokroma P450 84
4.2.4. Molekularno sidrenje 84
5. RASPRAVA 91
6. ZAKLJUČAK 105
7. POPIS LITERATURE 110
8. ŽIVOTOPIS 131
9. PRILOZI 133
PRILOG I 134
PRILOG II 137
PRILOG III 149

1. UVOD

Flavonoidi su produkti biljnog metabolizma sveprisutni u biljnom svijetu. Identificirano ih je više od 6000 što ih čini jednom od najvećih skupina prirodnih spojeva, poznatih do danas (Ferrer, i sur., 2008., Falcone Ferreyra i sur., 2012.). Nalaze se u voću, povrću, orasima, različitim sjemenkama, čaju, vinu (Middleton i sur., 1994., Middleton i sur., 2000., Harborne 1993.), propolisu i medu (Grange i sur., 1990.) te predstavljaju zajednički sastojak ljudske prehrane (Harborne i sur., 1999.). Strukturno su derivati benzo-γ-pirona, a u prirodnim izvorima dolaze kao glikozidi (vezani s molekulama šećera), aglikoni (bez vezanih molekula šećera) i metilirani derivati.

Posljednjih desetak godina, flavonoidi su opsežno proučavani brojnim *in vitro* i *in vivo* ispitivanjima zbog različitih pozitivnih učinaka na ljudsko zdravlje, poput antialergijskog, antiinflamatornog, antioksidacijskog, antimikrobnog, kardioprotektivnog, antitumorskog i antimutagenog djelovanja te brojnih drugih (Benavente-Garcia i sur., 2008., Bojić i sur., 2012., Friščić i sur., 2018., Kale i sur., 2008., Walle i sur., 2007., Zhang i sur., 2005., Martens i sur., 2005.).

Mnogi ksenobiotici, uključujući flavonoide, metaboliziraju se *in vivo* te njihova bioaktivnost uvelike ovisi o apsorpciji, distribuciji, metabolizmu i izlučivanju (engl. *Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion*, ADME) nakon unošenja u organizam. Sve podskupine flavonoida podliježu intenzivnom metabolizmu u probavnom sustavu koji ima vrlo značajnu ulogu u metabolizmu i konjugaciji flavonoida prije nego što stignu u jetru (Spencer 2003). Kao i mnogi ksenobiotici, flavonoidi se metaboliziraju *in vivo* reakcijama 1. faze (hidroksilacija, demetilacija) i 2. faze metabolizma (glukuronidacija, sulfatacija, metilacija) (Rendić i sur., 2013.). Iako su sastavni dijelovi hrane, dokazano je da flavonoidi mogu ometati aktivnost metaboličkih enzima te tako značajno utjecati na metabolizam lijekova i njihove farmakološke učinke (Falcone Ferreyra i sur., 2012., He i sur., 2015., Henderson i sur., 2000., Obach 2000., Yuan i sur., 2014., Zhai i sur., 1998., Shimada 2017.). Međutim, podaci o njihovoj farmakokinetici i utjecaju na metaboličke enzime su rijetki.

Citokrom P450 (CYP) skupno je ime za veliki broj različitih hem-tiolatnih enzima koji su prisutni u različitim biljkama, životinjama, mikroorganizmima i virusima. Ujedno, riječ je o najvažnijim enzimima odgovornim za metabolizam lijekova, koji imaju važnu ulogu u metabolizmu ksenobiotika te biosintezi brojnih endogenih molekula (steroidi, masne kiseline, žučne kiseline i eikosanoidi) (Yuan i sur., 2014., Hasler i sur., 1999., Spaggiari i sur., 2014.).

U čovjeka je identificirano i strukturno karakterizirano 57 funkcionalnih enzima citokrom P450, koji su klasificirani u 18 porodica i 44 potporodice (Guengerich 2018.).

Određivanje strukture gena i proteina omogućilo je njihovu identifikaciju i strukturnu karakterizaciju te su geni i enzimi, temeljem njihovih strukturnih značajki, svrstani u porodice i potporodice (Rendić i sur., 2013).

Enzimi citokrom P450 kataliziraju oksidativnu biotransformaciju većine lijekova i drugih lipofilnih ksenobiotika te su stoga od posebnog značaja za kliničku farmakologiju. (Nelson 2004., Guengerich 2008., Zanger i sur., 2008.). Čak 75 % enzima koji metaboliziraju lijekove u ljudskom organizmu su enzimi citokrom P450 (Wang i sur., 2010.). Imaju važnu ulogu u metabolizmu ksenobiotika jer gotovo svaka kemijska tvar koja se pojavljuje u okolišu može biti supstrat, induktor i/ili inhibitor jednog ili više enzima iz ove skupine (Rendić i sur., 2013.). Pet je najznačajnijih enzima citokrom P450 (CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 i CYP3A4) koji kataliziraju 90–95 % metaboličkih reakcija u kojima kao supstrati sudjeluju ksenobiotici poput lijekova i flavonoida (Guengerich 2012.). Najznačajniji u biotransformaciji lijekova su enzimi CYP3A4 (30,2 %), zatim CYP2D6 (13,0 %), CYP2C9 (12,8 %) i CYP1A2 (8,9 %) (Satoh i sur., 2016., Zanger i sur., 2013.). Neke od karakterističnih reakcija biotransformacije u kojima sudjeluju citokromi su 6β-hidroksilacija testosterona (CYP3A4), oksidacija nifedipina (CYP3A4), *O*-demetilacija dekstrometorfana (CYP2D6), N3-demetilacija kofeina (CYP1A2), *O*-deetilacija fenacetina (CYP1A2), 7-hidroksilacija kumarina (CYP2A6), 6α-hidroksilacija paklitaksela (CYP2C8) i druge (Guengerich 2005.). Brojnim studijama dokazane su klinički značajne interakcije između dodataka prehrani (Nguyen i sur., 2014.) i biljnih pripravaka (Liu i sur., 2010., Tam i sur., 2011., Tam i sur., 2014.) s lijekovima (de Lima Toccafondo Vieira i sur., 2012., Hermann i sur., 2012.). Posljedica takvih interakcija najčešće su inhibicije ili indukcije metaboličkih enzima zbog čega može doći do značajne promjene terapijskog djelovanja lijeka ili čak do toksičnog učinka samog lijeka. Dokazano je da biotransformacije, posredovane enzimima citokrom P450, mogu prevesti ksenobiotike u reaktivne spojeve koji se vežu za makromolekule tkiva i pokreću određene reakcije koje dovode do kemijske karcinogeneze (Delaporte 2001., Guengerich 1994.). Inhibicijom enzimske aktivnosti često dolazi do kumulacije lijeka u organizmu, što može rezultirati produženim djelovanjem lijeka, ali i uzrokovati brojne nuspojave (Rendić i sur., 2013.).

Razvojem metoda genetskog inženjeringa danas se, pri ispitivanjima *in vitro* metabolizma ksenobiotika, interakcija ili mogućih toksičnih učinaka lijekova i drugih ksenobiotika, koriste komercijalno dostupni enzimski sustavi poput hepatocita, mikrosoma i rekombinantnih enzima CYP koji sadrže pojedinačne ili više enzima citokrom P450. U svrhu

analize pojedinačnih citokroma P450, za proučavanje metabolizma i praćenje inhibicije pod utjecajem flavonoida, u ovoj disertaciji kao izvor enzima koristili su se rekombinantni bakulosomi s hiperekspримiranim enzimom CYP i NADPH reduktazom u kombinaciji s citokromom b_5 (Sohl i sur., 2009.). Za ispitivanje inhibicije enzima CYP, važno je uzeti u obzir selektivnost supstrata te učinke otapala (Delaporte i sur., 2001., Chauret i sur., 1998., Busby i sur., 1999., Tang i sur., 2000.).

Brojna ispitivanja, pokazala su primjenu tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti pogodnom metodom za proučavanje metabolizma i praćenje inhibicije enzima CYP. Primjena ove metode omogućava relativno brzo razdvajanje analita te pokazuje visoku razlučivost i osjetljivost detekcije (Chen i sur., 2009., Atherton i sur., 2006., Li i sur., 2017.). Stoga se ovim radom želi dodatno proširiti primjena analitičkih postupaka, pogodnih za ispitivanje metabolizama flavonoida posredovanih enzimima citokrom P450. Produkti karakterističnih reakcija biotransformacija odredit će se primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti, korištenjem detektora s nizom dioda (engl. *High Performance Liquid Chromatography/High Pressure Liquid Chromatography with Diode Array Detector*, HPLC-DAD).

Budući da većina reakcija biotransformacija, koje se odvijaju u prisutnosti citokroma P450, prate jednostavnu Michaelis-Menten kinetiku, primjena ove metodologije omogućuje izračunavanje kinetičkih parametara u točnim odnosima koncentracije pojedinačnih enzima, čime će se omogućiti korištenje eksperimentalnih podataka u određivanju prediktivnih matematičkih modela u istraživanju odnosa strukture i djelovanja (Rendić i sur., 2013.). Iako postoji značajan broj radova o inhibitornom učinku pojedinih flavonoida, temeljita istraživanja odnosa molekulske strukture i učinka (engl. *Quantitative Structure Activity Relationship*, QSAR) nisu bila provedena. Osnovna postavka QSAR-a jest da je aktivnost posljedica kemijske strukture, odnosno fizička, kemijska i biološka svojstva su posljedica strukturnih karakteristika molekula. Budući da su strukturne značajke flavonoida odgovorne za biotransformaciju i njihove interakcije, tom dijelu istraživanja posvetit će se posebna pažnja. Zbog točnosti predviđanja te jednostavnosti i brzine učenja, klasifikacijski algoritam iz područja strojnog učenja, metoda slučajne šume, pokazao se prikladnim za ispitivanje inhibicijskog učinka istraživanih flavonoida na metabolizam odabranih enzima CYP (Debeljak 2006.). QSAR analizom predložit će se matematički modeli. Vjerodostojnost svakog modela provjerit će se LOO (engl. *Leave One Out*) metodom validacije koja je prikladna za odabrani broj ispitivanih molekula u ovom istraživanju.

Danas su dostupne brojne kvantno-kemijske i matematičke metode kojima se nastoje predvidjeti svojstva novih spojeva i pronaći željeni profil biološke aktivnosti. U ovom radu primijenjeni su QSPR (engl. *Quantitative Structure Property Relationship*) i QSAR pristupi, koji omogućuju predviđanje svojstava i bioaktivnosti iz strukturnih parametara opisanih molekulskim deskriptorima (Smolčić-Bubalo 2007., Trinajstić 1992., Devillers i sur., 1999.).

Računalne studije molekularnog modeliranja uvelike su doprinijele razumijevanju interakcija supstrata s enzimom te specifičnosti liganda za pojedini enzim. S obzirom na to da se metoda molekularnog sidrenja može koristiti za virtualno skeniranje velikog broja spojeva, rangiranje rezultata te predlaganje strukturnih hipoteza o tome kako ligandi inhibiraju ciljanu molekulu, ista je odabrana kako bi se procijenila potencijalna vezna mjesta te najvjerojatnija konformacija kompleksa flavonoida i odabranih enzima CYP (Bojić i sur., 2019.).

1.1. Hipoteza i ciljevi istraživanja

Cilj ove disertacije je istraživanje inhibicijskog učinka, najčešćih aglikona flavonoida, na metaboličku aktivnost odabranih enzima iz superporodice CYP (CYP3A4, CYP1A2, CYP2A6, CYP2C8 i CYP2D6).

Pojedinačni ciljevi:

- za flavonoide koji će pokazati inhibicijski učinak na ispitivani enzim CYP, odredit će se tip inhibicije (direktna inhibicija, o metabolizmu ovisna inhibicija i inhibicija ovisna o vremenu). Rezultati će se prikazati kao ostatna aktivnost enzima, dok će se statistička značajnost ispitati pomoću računalnog programa Statistica 7.0 (Statsoft, SAD);
- provest će se temeljita istraživanja odnosa molekulske strukture i biološke aktivnosti (QSAR analiza) te će se u tu svrhu izračunati:
    - topologijski indeksi (Wienerov indeks, Balabanov indeks, Randićev indeks, Informacijsko-teorijski indeks, Schultzov indeks i drugi) koristeći programski paket TAM (Vedrina i sur., 1997.),
    - deskriptori supstituenata (volumen (V_s), masa (M_s), hidrofobna konstanta po Hanschu (π_s)) koristeći programski paket ACD/ChemSketch,

- kvantno-kemijski parametri (duljina (ID) i red veze (BO), parcijalni naboji (PC), energija najviše popunjene molekulske orbitale (E_{HOMO}), energija najniže slobodne molekulske orbitale (E_{LUMO}), ukupna energija (E_T), dipolni moment (μ)) programima HyperChem 8.0 i GAMESS,
- fizikalno kemijski parametri (log$P$, (logP_{ACD}), gustoća (ρ), površinska napetost (η), entalpija isparavanja (ΔHv), temperatura vrelišta (T_B) i tlak para (p_V), preuzet će se iz ACD/Labs-a,
- topljivost (s) koristeći EPI Suit (*chemspider.com*),
- izoelektrična točka (pI) i log$P$ (logP_{chem}) putem *chemicalize.org* i *chemspider.com* mrežnih aplikacija;

- predložit će se matematički QSPR i QSAR modeli (metoda slučajne šume, engl. *Random Forest*, RF) kako bi se opisale strukturne značajke flavonoida podložnih interakcijama s enzimima citokrom P450. Validacija predloženih modela provjerit će se LOO metodom;
- kako bi se procijenila potencijalna vezna mjesta te najvjerojatnija konformacija kompleksa flavonoida i odabranih enzima CYP, primijenit će se računalni program AutoDock 4.2.6. (The Scripps Research Institute, SAD) s AutoDockTools 1.5.6.

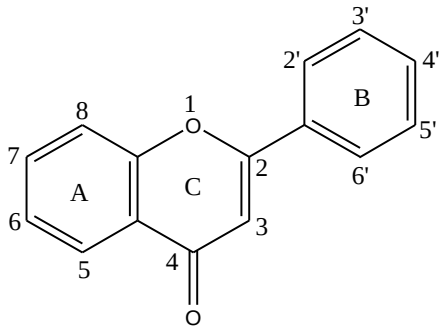
Budući da međusobne interakcije lijeka i hrane mogu značajno izmijeniti terapijski učinak lijekova, daljnja istraživanja, pa tako i rezultati ove disertacije, značajni su za istraživanje učinaka flavonoida iz svakodnevne prehrane, na aktivnost metaboličkih enzima iz superporodice CYP.

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. FLAVONOIDI

Poznato je da su flavonoidi vrlo rašireni u biljnom svijetu te predstavljaju važan sastojak ljudske prehrane. Različiti flavonoidi imaju različite fiziološke funkcije u biljkama. Odgovorni su za boju cvjetova, plodova i listova (Ferrer, i sur., 2008.), prisutni su u tilakoidnim membranama biljaka te sudjeluju u fotosintezi (Havsteen 1983.) kao katalizatori prijenosa elektrona ili regulatori ionskih kanala uključenih u fosforilaciju. Djeluju i kao UV filteri te tako sudjeluju u zaštiti biljaka od UV zračenja (Martens i sur., 2010., Stracke i sur., 2007.). Također imaju i važnu ulogu u regulaciji transporta auksina koji kontroliraju rast biljke (Franco i sur., 2015.).

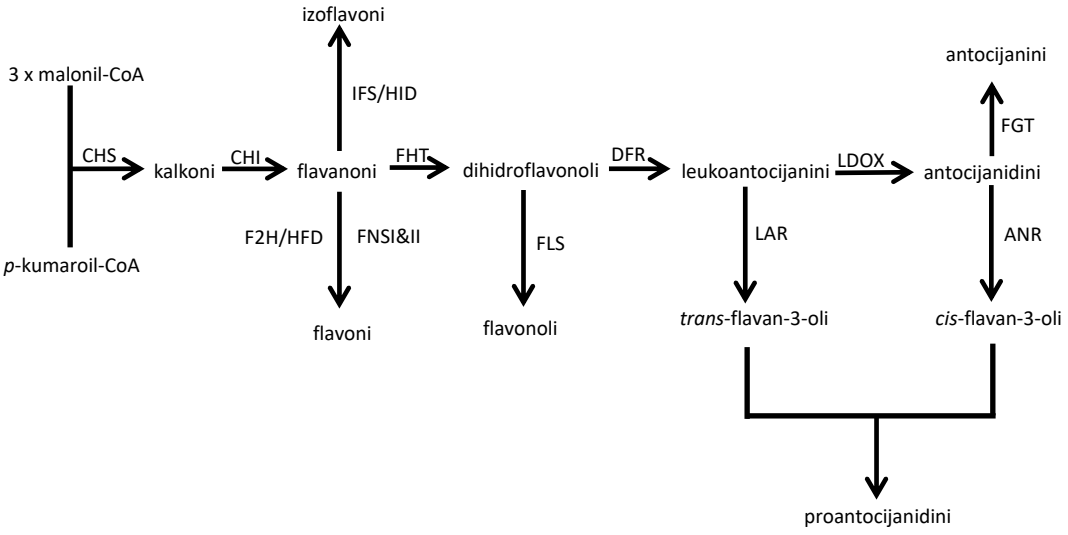
Flavonoidi se u prirodnim izvorima nalaze u obliku glikozida, aglikona i metiliranih derivata. Kada govorimo o glikozidima, povezivanje šećerne komponente s aglikonom najčešće se ostvaruje preko kisikova atoma iz hidroksilne skupine (O-glikozidi), ali moguće je i vezanje šećera preko ugljikova atoma (C-glikozidi). Najčešće vezani šećeri su *D*-glukoza, *D*-galaktoza, *L*-ramnoza, *L*-arabinoza, *D*-ksiloza i *D*-galakturonska kiselina, kao i disaharid rutinoza (glukoza + ramnoza). Aglikoni flavonoida su spojevi s 15 ugljikovih atoma tipa C6–C3–C6, a sastoje se od dva benzenska prstena (A i B) povezana heterocikličkim piranskim prstenom (C) (Terrier i sur., 2009., Monagas i sur., 2005., Medić-Šarić i sur., 2004.) (slika 1).



Slika 1. Osnovna struktura aglikona flavonoida.

Biosinteza flavonoida u biljkama prolazi kroz fenilpropanoidni put, prevodeći fenilalanin u 4-kumaril-CoA, koji ulazi u biosintezu flavonoida. Prvi enzim specifičan za biosintetski put flavonoida, kalkon sintaza (CHS), odgovoran je za nastanak kalkona iz kojih nastaju svi ostali flavonoidi. Neke skupine flavonoida nastale su kao međuprodukti biosinteze, primjerice: kalkoni, flavanoni, dihidroflavonoli i leukoantocijanini. Ostale skupine flavonoida

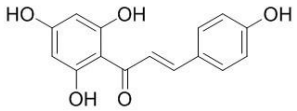
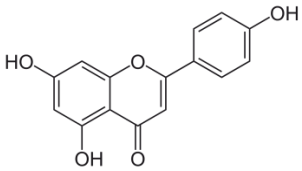
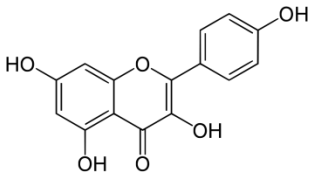
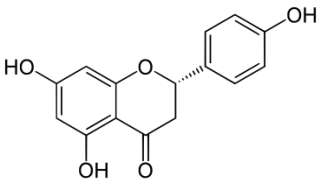
su krajnji produkti biosinteze i nakupljaju se u tkivu biljke (Falcone Ferreyra i sur., 2012.) (slika 2).



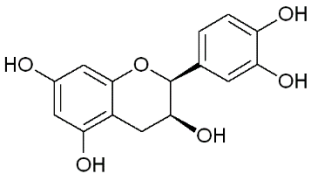
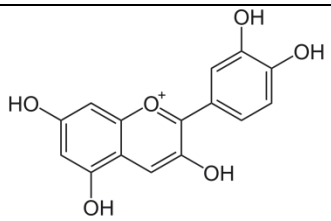
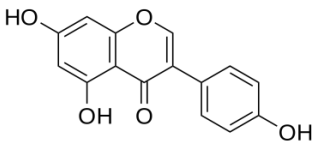
Slika 2. Biosintetska veza između različitih podskupina flavonoida (CHS, kalkon sintaza; CHI, kalkon izomeraza; FHT, flavanon 3-β-hidroksilaza; DFR, dihidroflavonol 4-reduktaza; LDOX (ANS), antocijanidin sintaza; FGT, flavonoid glikosiltransferaza; FNS, flavon sintaza; FLS, flavonol sintaza; LAR, leukoantocijanidin reduktaza; ANR, antocijanidin reduktaza; IFS, izoflavon sintaza; HID, 2-hidroksiizoflavanon dehidrataza, F2H, flavanon 2-hidroksilaza; HFD, 2-hidroksiflavanon dehidrataza) (modificirano prema Martens i sur., 2010.).

Strukturno, flavonoidi su derivati benzo-γ-pirona. S obzirom na razlike u osnovnoj strukturi, odnosno oksidacijskom stanju prstena C, flavonoidi su klasificirani u nekoliko glavnih podskupina: kalkoni, flavoni, flavonoli, flavanoni, flavanoli, antocijanini i izoflavoni (tablica 1) (Moon i sur., 2006.).

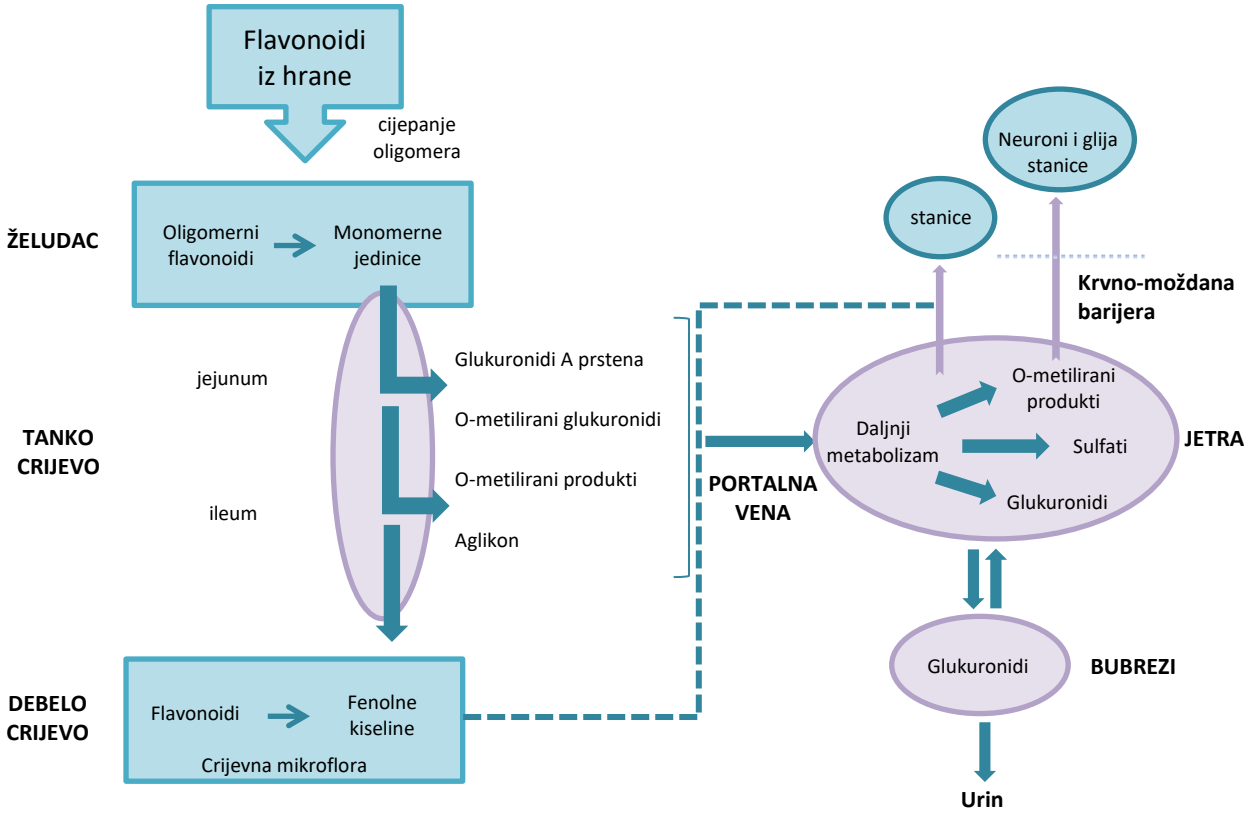
Tablica 1. Kemijske strukture i glavni izvori hrane osnovnih podskupina flavonoida (modificirano prema Moon i sur., 2006.).

	Struktura	Primjer	Glavni izvori hrane
Kalkon	 Kalkon	Kalkoni hmelja (ksantohumol i dehidrociklo-ksantohumol)	Hmelj Pivo
Flavon	 Apigenin	Akacetin Apigenin Baikalein Krizin Diosmetin Luteolin Tangeretin	Peršin Majčina dušica Celer Slatka crvena paprika Med Propolis
Flavonol	 Kempferol	Galangin Kempferol Morin Miricetin Kvercetin	Luk Kelj Brokula Jabuke Trešnje Čaj Crno vino Bobičasto voće
Flavanon	 Naringenin	Eriodiktiol Hesperetin Homoeriodiktiol Naringenin	Citrusi

Tablica 1 - nastavak. Kemijske strukture i glavni izvori hrane osnovnih podskupina flavonoida (modificirano prema Moon i sur., 2006.).

Flavanol	 Epikatehin	Katehin Epikatehin Proantocijanidini	Kakao Zeleni čaj Čokolada Crno vino Glog Borovnica
Antocijanin	 Cijanidin	Cijanidini Pigmentirani spojevi	Trešnje Grožđe Bobičasto voće Crveni kupus
Izoflavon	 Genistein	Genistein Daidzein Ekvol Biokanin A Formononetin	Crvena djetelina Lucerna Grašak Soja Ostale mahunarke

Krajnji antioksidacijski potencijal flavonoida, kao i njihova potencijalna bioaktivnost *in vivo*, uveliko ovise o apsorpciji, metabolizmu, distribuciji i izlučivanju, nakon unošenja u organizam putem hrane (slika 3). Kao i mnogi ksenobiotici, flavonoidi se metaboliziraju *in vivo* reakcijama 1. faze (hidroksilacija, demetilacija) i 2. faze metabolizma (glukuronidacija, sulfatacija, metilacija) (Falcone Ferreyra i sur., 2012.).



Slika 3. Metabolički putovi flavonoida iz hrane (modificirano prema Spencer 2003.).

Sve podvrste flavonoida podliježu intenzivnom metabolizmu u probavnom sustavu koji ima značajnu ulogu u metabolizmu i konjugaciji flavonoida prije nego što stignu u jetru. U jejunumu i ileumu tankog crijeva dolazi do glukuronidacije djelovanjem UGT enzima (glukuronil transferaza) i O-metilacije djelovanjem COMT enzima (katehol-O-metil transferaze). Neapsorbirani flavonoidi, metabolizirani u tankom crijevu i jetri te transportirani natrag u lumen crijeva, dolaze do debelog crijeva, gdje ih crijevna mikroflora dalje metabolizira u manje fenolne kiseline. One se većinom dalje konjugiraju i metaboliziraju u jetri, gdje mogu ometati aktivnost metaboličkih enzima i time uzrokovati potencijalne lijek-hrana interakcije. Preostali spojevi proizašli iz unosa flavonoida izlučuju se iz organizma fecesom i urinom (Spencer 2003.).

Dobro je poznato da polifenolni spojevi, posebice flavonoidi pokazuju brojne blagotvorne učinke na ljudsko zdravlje te se odlikuju antialergijskim, protuupalnim, antioksidacijskim, antimikrobnim, antiagregacijskim, antitumorskim i antimutagenim svojstvima, što je dokazano nizom provedenih ispitivanja (Tanaka 2014., González i sur., 2011., de Camargo i sur., 2017., Bojić i sur., 2011.).

Od farmakoloških učinaka flavonoida najbolje je istražena njihova antioksidacijska aktivnost kojom se stanica štiti od štetnih učinaka reaktivnih kisikovih spojeva. Za antioksidacijsku aktivnost flavonoida, osim flavanske jezgre, značajan je i raspored supstituenata te ukupan broj hidroksilnih skupina, prvenstveno na prstenu B, koje doniraju vodik i elektron te tako stabiliziraju slobodne radikale i povećavaju antioksidacijski učinak flavonoida (Firuzi i sur., 2005., Promeden i sur., 2014.).

$$X\text{–}OH + R^{\bullet} \longrightarrow X\text{–}O^{\bullet} + RH$$

Također, značajnu ulogu u sposobnosti uklanjanja slobodnih radikala ima i torzijski kut prstena B u odnosu na ostatak molekule. Supstitucija prstena A slabo je povezana s antioksidacijskom aktivnošću, dok heterociklički prsten C doprinosi antioksidacijskoj aktivnosti flavonoida, ako je slobodna hidroksilna skupina na položaju 3 (van Acker i sur., 1996., Bors i sur., 1990., Pietta 2000.).

Na antioksidacijsko djelovanje flavonoida dodatno utječe i glikozilacija. Ljudski organizam ne može sintetizirati flavonoide pa ih unosimo hranom. Budući da flavonoide iz hrane u organizam uglavnom unosimo u obliku glikozida, prilikom čega se u probavnom sustavu cijepaju glikozidne veze te nastaju aglikoni flavonoida, posljedično dolazi do povećanja antioksidacijske aktivnosti ishodnog spoja. O-metilacijom smanjuje se antioksidacijska aktivnost flavonoida zbog utjecaja na lipofilnost i molekulsku planarnost. Flavonoidi također imaju sposobnost keliranja metala s prooksidacijskim učinkom (Cu i Fe) te tako umanjuju njihov potencijal za stvaranje slobodnih radikala (van Acker i sur., 1996., Rice-Evans i sur., 1994., Dugas i sur., 2000., Havsteen 2002.).

Budući da molekule flavonoida pokazuju i lipofilna i hidrofilna svojstva, oni inaktiviraju reaktivne radikale unutar stanice kao i one koji dolaze izvan stanice. S obzirom na njihovu topljivost u membranama, smatra se kako zadržavaju antioksidacijsku sposobnost stanice održavajući antioksidacijske vitamine E i C u aktivnim reduciranim oblicima (Walle 2004.).

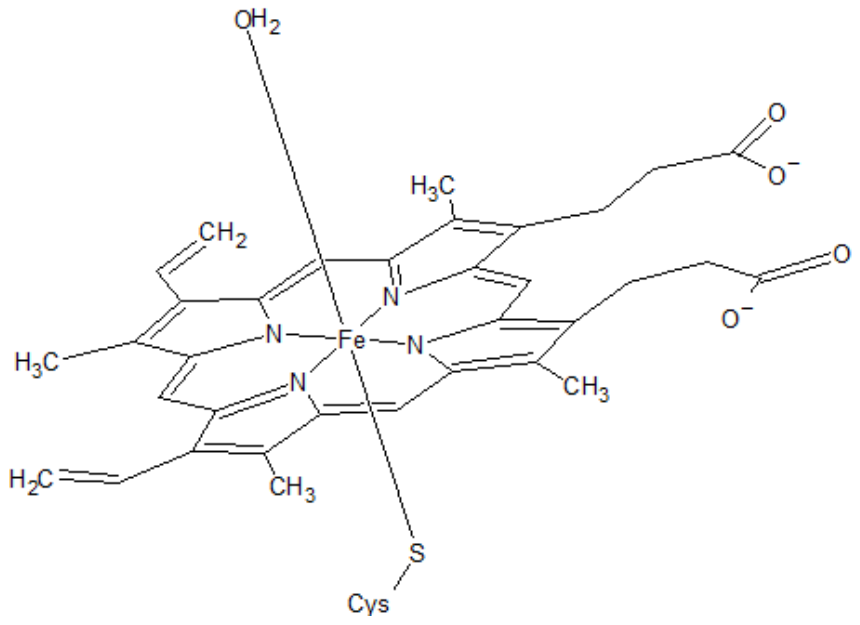
Flavonoidi mogu inhibirati brojne enzime kao što su: hidrolaze (β-glukuronidaze), hijaluronidaze, alkalne fosfataze, arilsulfataze, fosfodiesteraze, oksidoreduktaze, aldoreduktaze, RNA-polimeraze, DNA-sintetaze, protein-fosfokinaze i oksigenaze (Weng i sur., 2017., Kicel i sur., 2018., Havsteen 2002., Heim i sur., 2002., Rahimi i sur., 2005.). Zahvaljujući brojnim istraživanjima, ova lista svakim se danom povećava.

Osim najznačajnijeg i već opisanog antioksidacijskog učinka, flavonoidi pokazuju i brojne druge biološke učinke te pozitivan učinak na ljudsko zdravlje. Stoga, imaju značajan potencijal za primjenu u prevenciji i liječenju različitih oboljenja poput alergije i astme (Tanaka i sur., 2013., Castell i sur., 2014.), dijabetesa (Chen i sur., 2015), bolesti jetre (Ai i sur., 2013.), Parkinsonove (Magalingam i sur., 2015.) i Alzheimerove bolesti (Vauzour 2014.), hipertenzije (Hügel i sur., 2016.), upale (González i sur., 2011.), glaukoma (Patel i sur., 2015) i brojnih drugih.

Međutim, iako su flavonoidi sastavnice hrane, oni mogu značajno utjecati na metabolizam nekih lijekova te tako mijenjati djelovanje istih. Međusobne interakcije dva lijeka, lijeka i alkohola, lijeka i hrane predstavljaju veliki problem, jer mogu značajno izmijeniti terapijski učinak lijekova.

2.2. ENZIMI CITOKROM P450

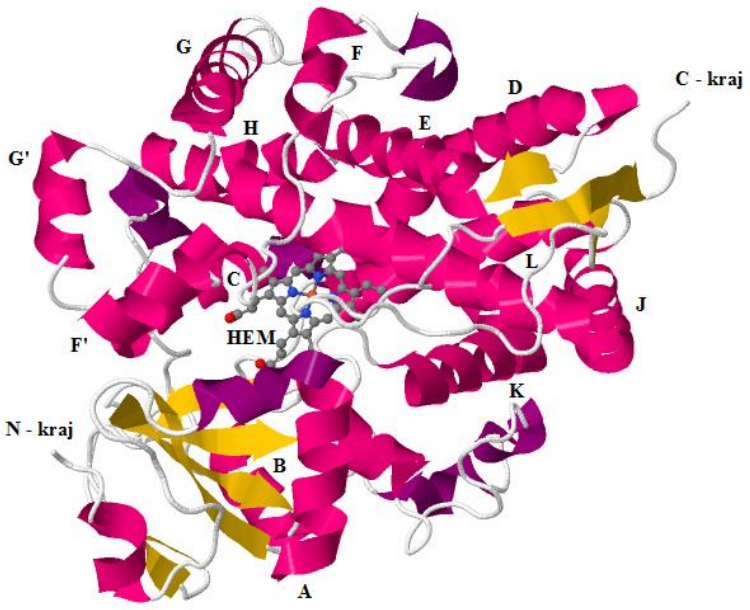
Enzimi citokrom P450 velika su skupina različitih hem-tiolatnih enzima. Prisutni su u različitim biljkama, životinjama i mikroorganizmima. Enzimi citokrom P450 imaju molekulsku masu oko 57 kDa te su građeni od oko 500 aminokiselinskih ostataka i sadrže jedan ekvivalent hemske skupine po polipeptidnom lancu. Dakle, to su hemoproteini kod kojih je apoprotein, preko sumpora iz cisteinskog ostatka, aksijalno koordiniran na atom željeza porfirinskog prstena (protoporfirin IX) što je i zajednička značajka svih enzima citokrom P450 (slika 4) (Rendić i sur., 2013.).



Slika 4. Prikaz aktivnog mjesta enzima citokrom P450 (modificirano prema Bryliakov i sur., 2014.).

Prema klasifikaciji enzima citokrom P450 (Guengerich 2018.), superporodica gena koja upravlja biosintezom ovih enzima označena je s *CYP*, a superporodica enzima sa simbolom CYP. Klasifikacija i označavanje pojedinih enzima koji pripadaju superporodici CYP, temelji se na sličnosti slijeda aminokiselina u proteinskom lancu. U istu porodicu, koja se označava brojem iza oznake CYP (CYP1, CYP2, CYP3, itd.), svrstavaju se enzimi s preklapanjem slijeda aminokiselina većim od 40 %. Enzimi s homologijom većom od 55 % svrstavaju se u istu potporodicu koja se označava slovom (CYP1A, CYP1B, itd.), dok se pojedinačni enzim označava brojem na kraju oznake (npr. CYP1A1) (Rendić i sur., 2013.).

Trodimenzijska struktura enzima citokrom P450 sastoji se od 12 α-heliksa (A-L) koje čine glavninu proteina i četiri β-ploče. Kofaktor hem smješten je unutar L-heliksa. Visoko konzerviran I-heliks okomit je na F/G segment koji se sastoji od F-heliksa, F/G petlje i G-heliksa (slika 5) (Sridhar i sur., 2017.).



Slika 5. Kristalna struktura humanog mikrosomalnog enzima CYP3A4 (CYP3A4 RCSBPDB ID: 1TQN, modificirano prema Yano i sur., 2004.) s identificiranim elementima sekundarne strukture (α-heliksi u ružičastoj boji, β-ploče u žutoj boji i petlje u bijeloj boji) (preuzeto s https://www.rcsb.org/, 14. 05. 2019.).

U stanicama bakterija, enzimi citokrom P450 nalaze se u topljivoj frakciji, dok se u stanicama sisavaca nalaze u membranskim frakcijama, kao što su endoplazmatski retikulum i unutarnja membrana mitohondrija (Guengerich 2018.). Osim u navedenim dijelovima stanice, aktivnost enzima citokrom P450 zapažena je i u membranama jezgre, plazme i Golgijeva aparata. Iako je aktivnost enzima citokrom P450 locirana najvećim dijelom u jetri, ona je također prisutna i u drugim organima i tkivima. Citokromi P450 također su odgovorni za biosintezu endogenih molekula poput steroidnih hormona, prostaglandina, masnih kiselina, žučnih kiselina i eikosanoida (Nebert i sur., 2002., Hasler i sur., 1999., Spaggiari i sur., 2014., Guengerich 2012.).

Enzimi citokrom P450, uvođenjem kisika, mogu pretvoriti lipofilnu molekulu u hidrofilni produkt koji se izravno eliminira putem bubrega, odnosno žuči ili se dalje biotransformira drugim enzimima prije eliminacije. Biotransformacije, posredovane enzimima citokrom P450, ponekad pretvaraju kemijske spojeve strane organizmu u reaktivne vrste koje vezuju makromolekule tkiva i iniciraju događaje koji dovode do kemijske karcinogeneze (Delaporte i sur., 2001., Guengerich 1994.).

Enzimi citokrom P450 su po enzimskom djelovanju tipične monooksigenaze (iz molekulskog kisika jedan se atom kisika unosi u molekulu organskog supstrata, dok se drugi atom reducira u vodu), koje mogu djelovati kao oksidaze i peroksidaze. Monooksigenaze također kataliziraju i reduktivne reakcije pri čemu moraju biti zadovoljeni određeni uvjeti kao što su anaerobni uvjeti, odgovarajući redoks potencijal lijeka-supstrata i prisutnost odgovarajućeg donora elektrona (NADPH, NADH). Mehanizam reakcije je identičan za sve enzime superporodice CYP, bez obzira kojoj porodici enzima pripadaju. Razlike među enzimima, očituju se u specifičnosti prema supstratima, kao i značajkama metaboličkih reakcija zapaženih među stereoizomerima, tj. stereoselektivnosti u odnosu na supstrat i/ili produkt (Rendić i sur., 2013.).

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

Važno je istaknuti da su enzimi citokrom P450 najvažniji enzimi odgovorni za metabolizam lijekova te imaju važnu ulogu u metabolizmu ksenobiotika. Gotovo svaka kemijska tvar koja se pojavljuje u okolišu može biti supstrat, induktor i/ili inhibitor jednog ili više enzima iz ove skupine (Rendić i sur., 2013.). 75 % enzima koji metaboliziraju lijekove u ljudskom tijelu su enzimi citokrom P450, pri čemu samo pet enzima citokrom P450 katalizira čak 90 % reakcija u kojima kao supstrati sudjeluju lijekovi (Guengerich 2012.). Najznačajniji u biotransformaciji lijekova je CYP3A4/5 (33,0 %), zatim CYP2D6 (13,0 %), CYP2C9 (12,8 %), CYP2C19 (9,0 %), CYP1A2 (8,9 %) i drugi (Satoh i sur., 2016., Zanger i sur., 2013., Rendić i sur., 2013.). Enzimi citokrom P450 kataliziraju oksidativnu biotransformaciju većine lipofilnih lijekova i drugih lipofilnih ksenobiotika i stoga su od posebnog značaja za kliničku farmakologiju (Nelson 2004., Guengerich 2008., Zanger i sur., 2008.). Dokazane su klinički značajne interakcije između dodataka prehrani, uključujući funkcionalnu hranu (Nguyen i sur., 2014.), biljnih pripravaka (Liu i sur., 2010., Tam i sur., 2011., Tam i sur., 2014.) i lijekova (de Lima Toccafondo Vieira i sur., 2012., Hermann i sur., 2012.). Posljedica takvih interakcija najčešće su inhibicije ili indukcije metaboličkih enzima.

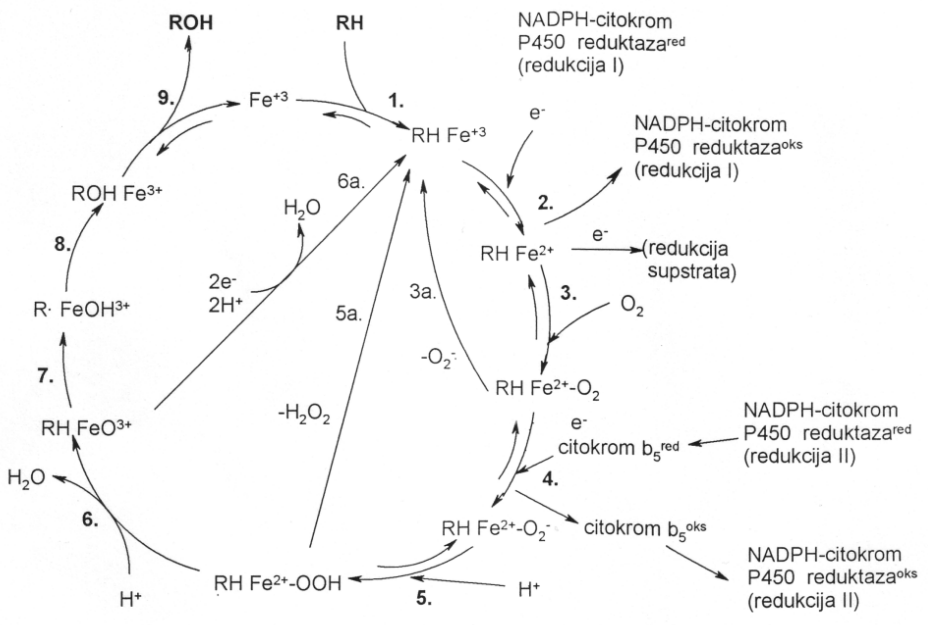
Pri ispitivanjima metabolizma ksenobiotika *in vitro,* koriste se komercijalno dostupni enzimski sustavi poput hepatocita, mikrosoma i rekombinantnih enzima CYP koji sadrže pojedinačne ili više enzima citokrom P450 (najčešće humanih enzima) od interesa za ispitivanje metabolizma, interakcija ili mogućih toksičnih učinaka lijekova i drugih ksenobiotika (Rendić i sur., 2013.). Mikrosomske frakcije stanica jetre korištene su za

ispitivanja inhibicije enzima CYP, predviđanje klirensa, probir metaboličke stabilnosti i fenotipizacije (Delaporte i sur., 2001., Lin i sur., 2000.).

2.3. INHIBICIJA AKTIVNOSTI ENZIMA CITOKROM P450

Inhibicija enzimske aktivnosti vrlo je značajna za djelovanje brojnih lijekova. Očituje se kao smanjenje metabolizma, uslijed prisustva druge tvari, s učinkom na reakcije biotransformacije. Smanjenjem metabolizma često dolazi do kumulacije lijeka u organizmu, njegovog produženog djelovanja i nuspojava.

Postoji nekoliko načina inhibicije biotransformacije supstrata, a razlog tome je priroda katalitičkog ciklusa enzima CYP. Dijelovi ciklusa koji su najpodložniji inhibiciji su vezanje supstrata, vezanje kisika i prijenos aktiviranog kisika sa željeza u hemu na supstrat (slika 6) (Hollenberg 2002.).



Slika 6. Reakcije katalitičkog ciklusa enzima citokrom P450: 1. vezanje supstrata; 2. prva redukcija; 3. vezanje kisika; 4. druga redukcija (s ili bez posredovanja citokroma b_5, ovisno o enzimu); 5. kidanje kovalentne veze molekule kisika; 6. odvajanje molekule vode; 7. nastanak radikala; 8. nastanak hidroksiliranog supstrata; 9. oslobađanje produkta / Supstrat (lijek), RH; produkt (oksigenirani lijek), ROH; atom željeza u hemskoj skupini na aktivnom centru enzima, Fe;

pretpostavljeni aktivan kompleks enzim citokrom P450-kisik, FeO^{3+} (modificirano prema Rendić i sur., 2013.).

Inhibicija aktivnosti enzima CYP može se podijeliti u tri kategorije:

1. Izravna reverzibilna inhibicija (engl. *Direct Reversible Inhibition*, DRI)

Reverzibilna inhibicija najčešći je uzrok interakcija lijekova. Može se podijeliti na kompetitivnu, nekompetitivnu i akompetitivnu inhibiciju. Kompetitivni inhibitor natječe se sa supstratom u vezanju na aktivno mjesto enzima, pri čemu povećanje koncentracije supstrata može u potpunosti spriječiti inhibiciju. Nekompetitivni inhibitor se veže na enzim, ali ne na aktivno mjesto te nema učinka na vezanje supstrata, što bi značilo da je nastali kompleks neproduktivan. S druge strane, kod akompetitivne inhibicije, inhibitor se veže na mjesto enzim-supstrat kompleks, pri čemu također nastaje neproduktivni kompleks, enzim-supstrat-inhibitor (Mudri 2006.). Do kompetitivne ili nekompetitivne inhibicije najčešće dolazi kada govorimo o citokromima P450, pri čemu je DRI najčešći oblik inhibicije, koji uključuje brzo povezivanje (asocijaciju) i rastavljanje (disocijaciju) između ksenobiotika i enzima (Lee i sur., 2013., Reinen i sur., 2018.). DRI moguće je odrediti inkubacijom s NADPH i bez predinkubacije flavonoidom.

2. Inhibicija ovisna o vremenu (engl. *Time-Dependent Inhibition*, TDI)

Ireverzibilna inhibicija ovisna je o vremenu i o koncentraciji inhibitora. Kada se radi o TDI, potrebno je određeno vrijeme kako bi se uočila inhibicija. Inhibicija ovisna o vremenu može se primijetiti kada inhibitori polako kompleksiraju s enzimom CYP koji inhibiraju ili kada se ksenobiotici s vremenom razgrađuju do produkata koji inhibiraju specifični enzim CYP (Lee i sur., 2013., Kamel i sur., 2013., Reinen i sur., 2018.). S obzirom na to da TDI nije ovisna o NADPH kofaktoru tijekom predinkubacije, metode za otkrivanje *in vitro* TDI uključuju predinkubaciju s ispitanim spojem (flavonoidom) bez NADPH, nakon čega slijedi kvantifikacija aktivnosti enzima primjenom marker supstrata (Riley i sur., 2007., Rehman i sur., 2017.).

3. Inhibicija ovisna o metabolizmu (engl. *Metabolism-Based Inhibition*, MBI)

O metabolizmu ovisna inhibicija, odnosno inhibicija metabolitima samog ksenobiotika (lijeka), najznačajniji je oblik inaktivacije enzima CYP. MBI zahtijeva barem jedan katalitički ciklus CYP enzima te ovisi o vremenu i NADPH kofaktoru, a inhibicija raste s kontinuiranom izloženošću (Lee i sur., 2013., Kamel i sur., 2013., Reinen i sur., 2018.).

MBI se može svrstati u tri kategorije: reverzibilna, kvazi-ireverzibilna i ireverzibilna MBI (Lee i sur., 1998., Reinen i sur., 2018.). U slučaju reverzibilne MBI, metabolit je jači direktni inhibitor od samog ksenobiotika. Kvazi-ireverzibilna MBI uključuje stvaranje reaktivnog intermedijera koji tvori nekovalentni kompleks s hemskim željezom (engl. *Metabolic Intermediate Complex,* MIC) te tako inaktivira enzim. U slučajevima kada se formiranje MIC-a opaža *in vitro,* enzim se može ponovno prevesti u aktivni oblik (dijalizom ili ultracentrifugiranjem u slučaju stabilnog kompleksa s trovalentnim (feri) oblikom hemskog željeza, odnosno prevođenjem dvovalentnog (fero) željeza u trovalentno (feri) uz odgovarajući oksidans, ukoliko stabilni kompleks nastane nakon redukcije željeza) što rezultira reaktivacijom CYP-a te dolazi do ponovne uspostave enzimske aktivnosti. Međutim, *in vivo* formirani MIC-ovi su toliko stabilni da CYP ostaje inaktivan, odnosno nedostupan za metabolizam lijekova (Lee i sur., 2013., Kamel i sur., 2013., Reinen i sur., 2018., Li i sur., 2002., Bojić 2015., Wienkers i sur., 2005.). Ireverzibilna MBI nastaje kada nastali reaktivni intermedijer tvori kovalentnu vezu s enzimom alkiliranjem hema ili apoproteina (Lee i sur., 2013., Kamel i sur., 2013., Reinen i sur., 2018.).

Određivanje MBI provodi se s NADPH i predinkubacijom s flavonoidom. MBI predstavlja TDI, gdje inhibitorni učinci ne ovise samo o vremenu, već također zahtijevaju metabolizam enzimom koji je na kraju inaktiviran (Riley i sur., 2007.). Enzimski proces koji vodi do MBI je nepovratan i katalitička aktivnost se ne može vratiti. Međutim, inaktivacija enzima koja se događa u fazi predinkubacije mora se razlikovati od reverzibilne inhibicije usporedbom s inkubacijom prikladne kontrole (bez NADPH), kako bi se predvidio metabolizam neovisan o NADPH, kao i razgradnja enzima (Stresser i sur., 2014., Rehman i sur., 2017.).

U usporedbi s reverzibilnom inhibicijom CYP-a, lijekom (ksenobiotikom) inducirana MBI (kvazi-ireverzibilna ili ireverzibilna inhibicija) enzima CYP od većeg je kliničkog značaja zbog povećanog rizika od farmakokinetičkih interakcija nakon višestrukog doziranja i kontinuiranog trajanja takvih interakcija čak i nakon prestanka liječenja (Orr i sur., 2012., Rehman i sur., 2017.). Karakterizacija inaktivacije CYP-a ključna je za predviđanje potencijala interakcije lijek-lijek ili biljka-lijek. Nedavno su smjernice regulatornih agencija poput *United States Food and Drug Administration* (FDA, 2019) i farmaceutskih tvrtki (Grimm i sur., 2009.) prepoznale važnost umanjivanja rizika od interakcije lijekova, s obzirom na inhibicije ovisne o vremenu, odnosno o metabolizmu (Rehman i sur., 2017.). Iz

navedenih razloga, a u svrhu klinički značajnih interakcija posredovanih enzimima CYP te njihovog rizika, važno je utvrditi o kojoj se vrsti inhibicije radi.

2.4. TEORIJSKA OSNOVA MOLEKULARNOG MODELIRANJA

U svrhu utvrđivanja veze između fizikalnih ili strukturnih svojstava i nekog biološkog svojstva određenog skupa molekula, nužno je poznavanje odgovarajućih numeričkih vrijednosti, odnosno deskriptora. S tim ciljem, a u svrhu ispitivanja inhibicijskog učinka flavonoida na odabrane enzime CYP, izračunati su odgovarajući molekulski deskriptori te su primijenjene metode predviđanja koje pripadaju metodama strojnog i statističkog učenja.

2.4.1. QSPR i QSAR modeliranje

Danas su dostupne brojne računalne i kvantno-kemijske metode kojima se nastoji pronaći željeni profil biološke aktivnosti te predvidjeti svojstva novih spojeva. QSPR je metoda kojom se strukturno svojstvo neke supstancije dovodi u kvantitativnu korelaciju s fizičko-kemijskim svojstvima, dok QSAR metoda neko strukturno svojstvo dovodi u kvantitativnu vezu s biološkom aktivnosti (Trinajstić 1992., Kier i sur., 1986., Mihalić i sur., 1992.).

U najjednostavnijem slučaju, QSPR i QSAR modeliranje svodi se na povezanost između dva skupa podatka kroz algebarski izraz, pri čemu prvi skup opisuje molekulsku strukturu opisanu molekulskim deskriptorima, a drugi biološku aktivnost. Linearne funkcije, polinomi (kvadratne funkcije) te višestruke regresije, koriste se za kvantitativno povezivanje strukture i fizičko-kemijskih svojstava, odnosno biološke aktivnosti. Kvaliteta regresijskog modela mjeri se statističkim parametrima poput koeficijenta predviđanja (q^2), koeficijenta korelacije (r), koeficijenta determinacije (r^2) te standardne devijacije (s). Kod određivanja prediktivnog matematičkog modela, za potvrdu vjerodostojnosti značajnih svojstva predviđanja, poput točnosti i preciznosti, primjenjuju se različite metode validacije. Jedna od najpouzdanijih pokazatelja kvalitete modela smatra se metoda križne validacije (engl. *Cross-validation*) (Debeljak 2006.). Kontinuirani razvoj metodologija te novih pristupa primjenom računala, pridonio je razvitku mnogih programskih paketa i pripadajućih baza podataka.

Primarni cilj QSAR-a bio je razumijevanje onih svojstava koja su važna za specifičnu biološku aktivnost niza spojeva. Međutim, u novije vrijeme, glavni cilj QSAR modeliranja je

predviđanje novih nepoznatih spojeva, na temelju prethodno sintetiziranih molekula. Drugim riječima, QSAR predstavlja koristan alat za predviđanje svojstava hipotetskih supstancija i za traženje novih supstancija definiranih svojstava (Mintas i sur., 2000.).

Shityakov i suradnici opisali su razvoj 3D-QSAR modela s CoMFA (engl. *Comparative Molecular Field Analysis*) i CoMSIA (engl. *Comparative Molecular Similarity Index Analysis*) metodama te molekularnim sidrenjem kako bi objasnili inhibicijski učinak derivata antocijanina na CYP3A4. Rezultati dobiveni ovom studijom pridonijeli su boljem razumijevanju učinaka antocijanina na inhibiciju karcinogene aktivacije i oštećenja stanične DNA (Shityakov i sur., 2014.). 3D-QSAR također su primijenili Li i suradnici kada su ispitivali inhibicijski učinak 44 flavonoida na CYP3A4. Njihovo istraživanje pokazalo je značajan rizik od interakcija između lijekova i biljaka koje u svom sastavu sadrže flavonoide te su pretpostavili strukturne karakteristike flavonoida koje su odgovorne za takav učinak (Li i sur., 2018.).

2.4.1.1. Molekulski deskriptori

Molekulski deskriptori su numeričke vrijednosti, nastale kao rezultat logičkih i matematičkih transformacija kemijske informacije, a koriste se za povezivanje strukture s različitim fizičko-kemijskim svojstvima te biološkom aktivnošću. Dijele se na teorijske i eksperimentalne. Teorijski se generiraju iz molekulske strukture spoja brojanjem njezinih fragmenata, veza, atoma itd. te se ne mogu eksperimentalno odrediti, ali opisuju kemijsku strukturu te su prikazani u obliku broja, dok su eksperimentalni mjera fizičko-kemijskih svojstava i mogu se eksperimentalno odrediti.

Najveću skupinu teorijskih molekulskih deskriptora čine topologijski indeksi (njih čak više od 3000) koji numerički opisuju strukturu molekule te služe za povezivanje strukturnih karakteristika molekule s njenom aktivnošću, odnosno djelovanjem. Topologijski indeks predstavlja broj koji sadrži informaciju o strukturi ili detalju strukture, za koji se pretpostavlja da je odgovoran za pojedino svojstvo molekule. Nedostatak većine topologijskih indeksa je nemogućnost razlikovanja izomera koji mogu imati isti topologijski indeks (Trinajstić 1992.).

Iako je do danas poznat veliki broj topologijskih indeksa, u ovome radu korišteni su samo neki (npr. Randićev indeks povezanosti, χ(G), Wienerov indeks, W(G), Balabanov indeks, J(G), informacijsko-teorijski indeks, I(G), itd.), od kojih svaki na svoj način, ali

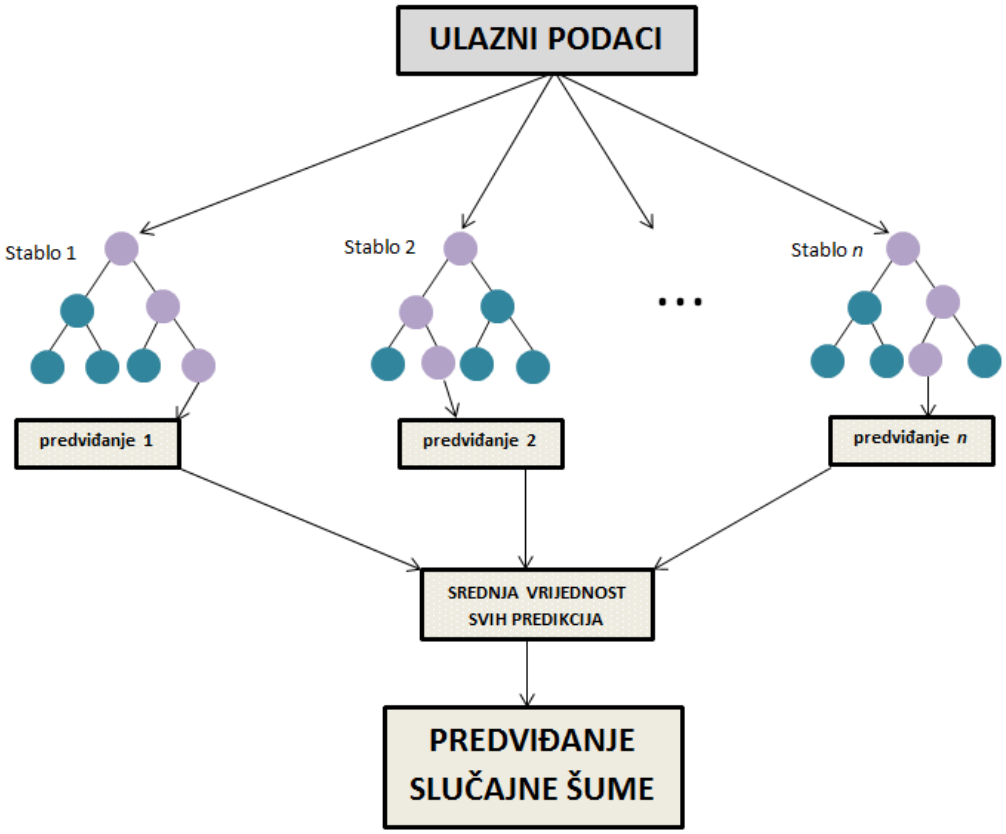
drugačije, opisuje istu molekulsku strukturu. Uporabom takvog izbora indeksa dobiva se znatno više informacija o molekuli za koju se izračunavaju.

Osim topologijskih indeksa i jednostavnih molekulskih deskriptora koji se izračunavaju prebrojavanjem na osnovi molekulske formule (npr. broj atoma u lancu (CAC), broj veza u lancu (CBC) i dr.) te se najčešće primjenjuju u molekularnom modeliranju, često se koriste i drugi teorijski deskriptori koji pak opisuju svojstva funkcionalnih skupina, supstituenata i fragmenata (npr. volumen (Vs), masa (Ms), hidrofobna konstanta po Hanschu (π_s), itd.). Također, koriste se i deskriptori koji opisuju konfiguraciju molekule, poput steričkih (npr. Van der Wallsov volumen (V_w)) i elektronskih parametara (npr. ukupna energija molekule (E_T), energija najviše popunjene molekulske orbitale (E_{HOMO}), energija najniže slobodne molekulske orbitale (E_{LUMO}), parcijalni atomski naboji (PC), orbitalna elektronegativnost (χ) itd.). Orbitalna je elektronegativnost atoma u molekuli (χ) definirana kao aritmetička sredina energije ionizacije i elektronskog afiniteta, a ovisna je o parcijalnom naboju (Bojić 2012.). Energija ionizacije ili ionizacijski potencijal je energija potrebna za oslobađanje elektrona iz atoma te je jednaka ravnoteži svih elektronskih energija koje elektron drže na atomu (Zadeh 2019.), dok je elektronski afinitet definiran kao energija koja se oslobađa kad se dodatni elektron veže na neutralni atom ili molekulu (IUPAC 2019.).

Eksperimentalni molekulski deskriptori također su od iznimne važnosti za molekularno modeliranje. Oni opisuju fizičko-kemijska svojstva molekula, poput temperature plamišta (T_F), koja se može definirati kao najniža temperatura pri kojoj se tvar može zapaliti u zraku ako joj se prinese izvor paljenja (Zhokhova i sur., 2003., Gharagheizi i sur., 2008.). Važni eksperimentalni molekulski deskriptori su i molarna refraktivnosti (MR), koja ovisi o volumenu molekule i Londonovim silama između lijeka i receptora, kao i polarna površina molekule (PSA), koja ovisi o konformaciji molekule te utječe na sposobnost molekule da stvara vodikovu vezu. Osim toga, PSA predviđa različite procese prijenosa lijeka kroz organizam, poput apsorpcije u crijevima i sposobnosti prolaska kroz krvno-moždanu barijeru. Lipofilnost (log$P$), koja se ujedno smatra i računskim deskriptorom, određuje farmakokinetička i farmakodinamička svojstva molekula (Medić-Šarić i sur., 1998., Carrasco i sur., 2004., Österberg i sur., 2000.). Iz navedenih razloga spomenuti parametri vrlo se često koriste u QSAR istraživanjima.

2.4.1.2. Metoda slučajne šume

Metoda slučajne šume (RF) je klasifikacijski i regresijski algoritam iz područja strojnog učenja (engl. *machine learning*) koji se koristi za predviđanje i razumijevanje podataka. Glavna značajka algoritma jest da ne koristi samo jedan deskriptor, već se sastoji od zbirke deskriptora udruženih u skup stabala odlučivanja (engl. *decision trees*) s kontroliranim varijacijama. Svako stablo sudjeluje u izglasavanju rezultata, a konačno predviđanje donosi se metodom združivanja rezultata, odnosno većinom glasova (slika 7). Proces grananja, odnosno izbor odgovarajućih molekulskih deskriptora i graničnih vrijednosti se ponavlja, sve dok se ne postigne maksimalna validacijska točnost, odnosno najtočnija klasifikacija ispitivanih spojeva (Breiman 2001., Bojić 2012., Breimain i sur., 2005., Debeljak 2006.). Ova metoda pokazala se vrlo uspješnom u usporedbi s mnogim drugim klasifikatorima, uključujući diskriminantnu analizu (engl. *discriminant analysis*), strojeve s potpornim vektorima (engl. *support vector machines*) i umjetne neuronske mreže (engl. *artificial neural networks*) te je manje podložna prepodešavanju (engl. *overfitting*) (Breiman 2001.).



Slika 7. Prikaz metode slučajne šume.

Metoda je veoma jednostavna, s obzirom na to da je za izgradnju slučajne šume potrebno definirati samo dva parametra, broj stabala u šumi i broj varijabli u slučajnom podskupu na svakom čvoru. Svaki čvor u stablu odluke je ustvari neka odabrana vrijednost pojedinog deskriptora (primjer: ako je log*P* veći od npr. 3, spoj od interesa se usmjerava u lijevu granu čvora, odnosno ako je log*P* manji od 3, spoj od interesa se usmjerava u desnu granu čvora). Na opisani način stabla se granaju, a tijekom razvoja matematičkog modela ispituju se pojedini deskriptori te se odabiru odgovarajuće granične vrijednosti za pojedini čvor (Debeljak 2006.).

Prednosti RF metode, u odnosu na ostale tehnike strojnog i statističkog učenja, prvenstveno su jednostavnost i brzina učenja. Točnost predviđanja, manipulacija velikim skupovima podataka, otpornost na šumove, mogućnost primjene nepotpunih skupova podataka te jasna interpretacija veze između odabranih atributa i izlazne varijable, čine ju vrlo primjenjivom u brojnim QSPR i QSAR istraživanjima. S obzirom na to da algoritam dodatno procjenjuje pogreške i korelacije, manje su potrebe za validacijom ili odvojenim t-testovima (Bojić 2012., Debeljak 2006.).

2.4.1.3. Validacija računalnog postupka

Prilikom postavljanja prediktivnih računalnih modela, potrebno je ispitati jesu li numerički rezultati kvantificiranja hipotetiziranih odnosa između varijabli reprezentativni za neovisni skup podataka, pa je u tu svrhu matematički model potrebno validirati. Ako se ne raspolaže velikim knjižnicama spojeva, odnosno one sadrže tek nekoliko desetaka spojeva, primjenjuju se metode robusne statistike, poput križne validacije (engl. *Cross-validation*). LOO (engl. *Leave-One-Out*) postupak križne validacije veoma je korisna tehnika procjene učinkovitosti modela, posebice u slučajevima kada je potrebno izbjeći prepodešavanje. Koristi se uglavnom u situacijama kojima je cilj predviđanje, a želi se procijeniti koliko će model biti primjenjiv u praksi. Model se validira na principu da se podaci podijele u dvije skupine, pri čemu se jedna analizira (engl. *training dataset*), a druga validira analizu prve (engl. *validation dataset*). Križna validacija provodi se u više krugova u svrhu smanjivanja varijabilnosti rezultata. Cilj križne validacije je testirati sposobnost modela da predvidi nove podatke koji nisu korišteni prilikom njegovog postavljanja, kako bi se izbjegli problemi poput prepodešavanja ili pristranosti odabira (engl. *selection bias*). Faktor koji mjeri disperziju ovih

predviđanja izračunava se iz validirane vrijednosti te je označen akronimom PRESS, a koristi se za definiranje koeficijenta predviđanja q^2:

$$q^2 = \frac{SD - PRESS}{SD},$$

pri čemu SD predstavlja kvadratno odstupanje promatrane vrijednosti od njihove srednje vrijednosti. Vrijednost $q^2 > 0{,}5$ uobičajeno je prihvaćena kao zadovoljavajući rezultat (Carbó-Dorca i sur., 2000.). Na navedeni način dobiva se informacija o tome kako će model funkcionirati primjenom neovisnog, odnosno nepoznatog skupa podataka (Cawley i sur., 2010., Debeljak 2006.).

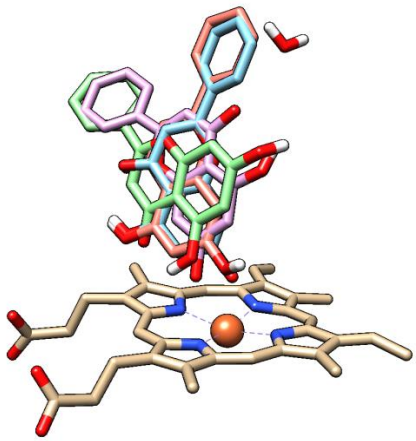
2.4.1.4. Molekularno sidrenje

Molekularno sidrenje (engl. *Molecular Docking*) je značajan alat u strukturalnoj molekularnoj biologiji i računalnom dizajnu lijekova. Cilj sidrenja ligand-protein je predviđanje dominantnog načina vezanja liganda s proteinom poznate trodimenzijske strukture. Metode sidrenja učinkovito pretražuju velik broj konformacija te rezultiraju s nekoliko potencijalnih veznih mjesta, a koriste funkciju bodovanja kako bi rangirale vjerojatnost pojave određenog kompleksa ligand-protein. Molekularno sidrenje može se koristiti za virtualno skeniranje velikog broja spojeva, rangiranje rezultata te predlaganje strukturnih hipoteza o tome kako ligandi inhibiraju ciljanu molekulu, pri čemu je postavljanje početnih struktura za sidrenje jednako važno kao i sam postupak molekularnog sidrenja (Morris i sur., 2008.).

Računalne studije molekularnog modeliranja uvelike su doprinijele razumijevanju interakcija supstrata s enzimom te specifičnosti liganda za enzime. Ova su istraživanja dovela do važnih spoznaja o strukturnim značajkama koje daju specifičnost i funkciju tim enzimima. Istraživanja proteina, uključivala su studije molekularnog sidrenja i simulacije molekularne dinamike kompleksa protein-ligand. Karakteristike supstrata i enzima koje je potrebno analizirati su slobodna energija vezanja te interakcije između supstrata i aminokiselinskih ostataka u blizini aktivnog mjesta. Rezultati takvih studija odražavaju slobodnu energiju vezanja, a opisuju različite interakcije, uključujući interakcije vodikovih veza, hidrofobne interakcije, ionske interakcije, ligaciju metala, hidrofobne i polarne/aromatske interakcije,

entropiju, desolvatacije itd. Studije molekularnog sidrenja dodatno se validiraju, ako postoji značajna korelacija između bioaktivnosti i rezultata sidrenja (Sridhar i sur., 2017.).

U našem laboratoriju, proveli smo sidrenje specija krizina u aktivnom mjestu enzima CYP1A2. Trodimenzijska koordinata ispitivanog enzima preuzeta je s RCSB stranice (kristalografska struktura enzima CYP1A2 oznake 2HI4 (Sansen i sur., 2007.)). Sidrenje je provedeno primjenom programa AutoDock 4.2.6. (The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA) koji koristi disperziju, vodikove veze i elektrostatsku i desolvatacijsku energiju kako bi odredio konformaciju najvjerojatnijeg kompleksa. Sidrenje je provedeno s i bez prisustva molekule vode (HOH 733), s obzirom na to da molekula vode može utjecati na položaj liganda u aktivnom mjestu CYP1A2 (slika 8) (Bojić i sur., 2019.).



Slika 8. Usporedba usidrenih specija krizina u prisustvu i odsustvu HOH 733 molekule vode (rezultati su identični u oba slučaja). Anionske specije su prikazane plavo (konformacije s najnižom energijom) i ružičasto (konformacije s drugom najnižom energijom), dok su molekulske specije prikazane zeleno (konformacije s najnižom energijom) i narančasto (konformacija s trećom najnižom energijom u prisustvu HOH 733 i konformacija s drugom najnižom energijom u odsustvu HOH 733). Atomi kisika su prikazani crveno, dušika plavo, vodika bijelo, a hemskog željeza narančasto. Nepolarni vodici nisu prikazani radi preglednosti (Bojić i sur., 2019.).

Shityakov i suradnici proveli su 3D-QSAR kao i studiju molekularnog sidrenja s derivatima antocijanina kao inhibitora CYP3A4 (Shityakov i sur., 2014.), dok su Kakimoto i suradnici studijom sidrenja pretpostavili kako postoje razlike u interakciji flavanona s hem željezom u središtu enzima CYP2A6 i CYP2A13 (Kakimoto i sur., 2019.). Sidrenjem te simulacijama molekularne dinamike, Watanabe i suradnici ispitali su prepoznavanje supstrata za CYP1A2 posredovano molekulama vode (Watanabe i sur., 2017.), dok su Mikstacka i suradnici molekularnim modeliranjem pretpostavili da su najvjerojatnija vezna mjesta, derivata metiltiostilbena, na onim aktivnim mjestima CYP1A2 s metiltio supstituentom usmjerenim prema hem željezu (Mikstacka i sur., 2012). Opsežno istraživanje odnosa strukture i djelovanja inhibicije humanih citokroma P450 (1A1, 1A2, 1B1, 2C9 i 3A4) s 33 derivata flavonoida proveli su Shimada i suradnici. Oni su studijama molekularnog sidrenja dokazali kako postoje različiti mehanizmi koji su uključeni u interakciju različitih flavonoida s aktivnim mjestom enzima CYP, uzrokujući tako razlike u inhibiciji katalitičkih aktivnosti ovih enzima s flavonoidima (Shimada i sur., 2010.). U svrhu ispitivanja inhibicijskog učinka krizina na CYP1A2, He i suradnici proveli su studije molekularnog sidrenja te simulacije molekularne dinamike (He i sur., 2010.). Shimada i suradnici ispitali su mehanizme inhibicije apigenina i genisteina, na metaboličku aktivnost istog enzima (Shimada i sur., 2010.). Studijama molekularnog modeliranja također je dokazano i specifično mjesto oksidacije flavanona i flavona, enzimom CYP2A6 u humanim jetrenim mikrosomima (Nagayoshi i sur., 2019.). Rezultati kinetičke analize bili su u skladu s rezultatima molekularnog sidrenja koji su pokazali da se vezno mjesto diosmetina podudaralo s veznim mjestom za supstrat CYP2C8. Činjenica da diosmetin inhibira CYP2C8, u koncentracijama sličnim onima koje su primijećene nakon primjene *in vivo* (u niskom mikromolarnom rasponu), od iznimne je kliničke važnosti, jer istodobna primjena diosmetina s lijekovima metaboliziranim ovim enzimom može uzrokovati farmakokinetičke interakcije (Quintieri i sur., 2011.). Shao i suradnici, metodom molekularnog sidrenja, pokazali su da se puerarin veže na enzime CYP1A2 i CYP2D6, uglavnom hidrofobnom interakcijom i vodikovom vezom (Shao i sur., 2014.). Prema dostupnim podacima, studije molekularnog sidrenja drugih flavonoida koji su obuhvaćeni ovom disertacijom, a u svrhu inhibicije ispitanih enzima, do sada nisu provedene.

2.5. INHIBICIJSKI POTENCIJAL FLAVONOIDA NA METABOLIZAM POSREDOVAN ENZIMIMA CITOKROM P450

Jedan od načina na koji flavonoidi ostvaruju svoje biološke učinke u ljudskom organizmu je djelovanjem na različite enzimske sustave. Biološki učinci variraju s brojem i supstitucijskim položajima hidroksilnih i metoksi skupina u molekulama flavonoida. U nastavku, prikazan je dostupan literaturni pregled odabranih flavonoida i njihov do sada istražen inhibicijski utjecaj na 5 enzima superporodice CYP koji su obuhvaćeni ovom disertacijom.

Flavanoni

Flavanoni su bezbojne supstancije koje karakterizira izostanak dvostruke veze između C-2 i C-3 atoma. Široko su rasprostranjeni, najčešće dolaze u obliku hidroksiliranih, glikoziliranih i O-metiliranih derivata, a nalazimo ih kod plodova i sokova iz porodice citrusa (D'Archivio i sur., 2007., Manach i sur., 2004.). Neki od primjera flavanona koji su korišteni u ovoj disertaciji su flavanon, hesperetin, pinocembrin, pinocembrin-7-metileter, sakuranetin i naringenin.

Pokazalo se da su hesperetin i naringenin uglavnom odgovorni za antioksidacijsku aktivnost citrusa (Kroyer 1986.). Hesperetin također sprječava resorpciju kosti inhibirajući osteoklastogenezu (Zhang i sur., 2018.) te pokazuje hipolipidemijsko (Jayaraman i sur., 2018.), antitumorsko (Shirzad i sur., 2017.), neuroprotektivno (Kheradmand i sur., 2018.), protuupalno (Ding i sur., 2017) i antioksidacijsko djelovanje (Esmaeili i sur., 2014.). Hesperetin je pokazao selektivni inhibicijski učinak na CYP1A1 i CYP1B1 (Doostdar i sur., 2000.) te na CYP3A4.

Pang i suradnici istraživali su inhibicijski učinak pet flavonoida različitih podskupina (flavon luteolin, flavonole kvercetin i kvercitrin te flavanone hesperetin (aglikon) i hesperidin (glikozid)) na cDNA-eksprimiranom CYP2C8. Enzim CYP2C8 je koeksprimiran s NADPH-citokrom P450 reduktazom u *Escherichia coli* i korišten za karakteriziranje inhibicijskog potencijala i mehanizama kojima ispitivani flavonoidi djeluju na enzim. Korištena je karakteristična reakcija 4-metilhidroksilacije tolbutamida, uz HPLC analizu, kao metoda za praćenje aktivnosti CYP2C8. Rezultati su pokazali da odabrani flavonoidi inhibiraju CYP2C8 s različitim potencijalima. Redoslijed inhibicijskog potencijala bio je kvercetin > luteolin >

hesperetin > hesperidin > kvercitrin. Svi flavonoidi pokazali su o metabolizmu ovisnu inhibiciju. Također je utvrđeno, da su brojni strukturni čimbenici odgovorni za inhibiciju istog enzima, poput molekulskog oblika, broja hidroksilnih skupina, kao i glikozilacije hidroksilne skupine. Kvercetin se pokazao kao najpotentniji inhibitor u ovoj studiji (Pang i sur., 2012.).

Naringenin i eriodiktiol su flavanoni najzastupljeniji u citrusima te pokazuju, fitoestrogenu, antioksidacijsku i antihipertenzivnu aktivnost (Ubeaud i sur., 1999., Lee i sur., 1999., Kanno i sur., 2005., Zierau i sur., 2002., Kim i sur., 2013.). Otkad je dokazano da sok od grejpa smanjuje aktivnost enzima CYP3A (Bailey i sur., 1993.), postalo je jasno da uzimanje mnogih voćnih sokova može usporiti metabolizam lijeka te su interakcije između naringenina i sustava citokrom P450 bile od sve većeg interesa. Učinkovitim razdvajanjem kiralnih oblika naringenina, kiralnom tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti, ustanovljen je različit i stereoselektivni inhibicijski potencijal (*R*) -, (*S*) - i rac-naringenina prema različitim enzimima CYP (Lu i sur., 2011.). Naringenin je identificiran kao CYP3A4 inhibitor metabolizma simvastatina (supstrat CYP3A4) (Ubeaud i sur., 1999.). S druge strane, pokazao se kao slabi inhibitor CYP1A1 (Doostdar i sur., 2000.), CYP1A2 (Fuhr i sur., 1993.) i CYP2A6 (Draper i sur., 1997.). Nije primijećena značajna inhibicija CYP2D6 u koncentracijama do 10 μM (Lu i sur., 2011.) te naringenin nije inhibirao 6α-hidroksilaciju paklitaksela (CYP2C8) (Václavíková i sur., 2003.).

Pinocembrin je opsežno proučavan, zbog svojih pozitivnih učinaka na kardiovaskularni sustav. Ovaj flavanon štiti endotelne stanice od oksidiranih LDL-om induciranih promjena te ima neuroprotektivne učinke (Tao i sur., 2018., Su i sur., 2018.). Iako je farmakokinetika pinocembrina ranije ispitivana (Cao i sur., 2015.), prema dostupnim literaturnim podacima nije ranije zabilježena inhibicija enzima CYP3A4 (Šarić Mustapić i sur., 2018.).

Sakuranetin je član obitelji flavanona za kojega je dokazano da posjeduje antimikrobnu, protuupalnu i antimutagenu aktivnost (Zhang i sur., 2008., Taguchi i sur., 2015., Kim i sur., 2016., Miyazawa i sur., 2003.). Proizvodi se biosintezom u raznim biljkama, kroz niz različitih mehanizama, a kao odgovor na stres ili infekciju. Jeong i suradnici istraživali su metaboličke putove sakuranetina u humanim mikrosomima jetre te su dokazali da sakuranetin inducira metabolizam CYP3A4 (Jeong i sur., 2018). Međutim, inhibicija istog ili drugih enzima CYP, prema dostupnim podacima, nije dokazana.

Flavoni

Flavoni su žuto obojene supstancije. Smatraju se biljnim pigmentima jer sudjeluju u stvaranju boje i okusa u mnogih biljnih vrsta, uglavnom u različitim porodicama zeljastog bilja (*Labiatae, Umbelliferae, Compositae,* itd.) i kamilici (Beecher 2003., Srivastava i sur., 2009.). Strukturno su slični flavonolima, uz iznimku hidroksilne skupine na položaju 3. Neki od predstavnika flavona korištenih u ovoj disertaciji su 6-hidroksiflavon, 7-hidroksiflavon, apigenin, krizin, krizin-dimetileter, diosmetin, flavon, luteolin, akacetin, tangeretin i tektokrizin.

Ho i suradnici, ustanovili su da broj hidroksilnih skupina, kao i položaj hidroksilacije, ima važnu ulogu u inhibicijskim učincima flavona. Flavoni koji imaju više hidroksilnih skupina pokazali su snažniju inhibiciju aktivnosti CYP3A4, od onih s manje hidroksilnih skupina (Ho i sur., 2001).

Doostdar i suradnici (Doostdar i sur., 2000.), dokazali su da šest flavonoida, uobičajeno prisutnih u sokovima citrusa, pri koncentraciji od 70–200 mg/L snažno inhibiraju aktivnosti CYP1A1, CYP1A2 i CYP1B1 etoksirezorufin-*O*-deetilaze (EROD) *in vitro*. Flavoni, akacetin i diosmetin, bili su snažniji inhibitori od flavanona eriodiktiola, hesperetina, homoeriodiktiola i naringenina. Pretpostavlja se da je razlog tome prisutnost reducirane 2,3-veze u C prstenu strukture flavona. Inhibicijska aktivnost flavona prema metabolizmu enzima CYP1A1 i 1A2 također je opisana u drugim studijama (Lee i sur., 1994., Zhai i sur., 1998.). U kasnijim istraživanjima ispitivan je utjecaj akacetina na porodicu enzima CYP1, gdje se pokazalo da su supstituenti na položajima 3 i 4 kod akacetina, značajno utjecali na inhibicijski učinak CYP1 (Doostdar i sur., 2000.). Akacetin je također pokazao inhibicijski potencijal za CYP1A1, gdje važnu ulogu u inhibiciji ovog enzima imaju hidroksilne skupine na prstenima A i B i to na položajima 3, 5 i 7 (Shimada i sur., 2010.). Akacetin je pokazao pozitivne učinke u zaštiti kardiomiocita, kao i antibakterijsku aktivnost te antikancerogena svojstva (Wu i sur., 2018., Zhang i sur., 2018., Gomez-Chang i sur., 2018).

U eksperimentalnim uvjetima opaženo je kako flavanon, flavon, 3-hidroksiflavon i 6-hidroksiflavon, u koncentraciji od 10 μM, inhibiraju hidroksilaciju testosterona, odnosno aktivnost enzima CYP3A4 (Schrag i sur., 2001.), dok se 7-hidroksiflavon pokazao kao snažan inhibitor CYP1A2 (IC_{50} < 0,3 μM) (Zhai i sur., 1998.).

Xu i suradnici ispitali su učinak flavonoida (apigenin, luteolin, kempferol i genistein) na vaskularnu relaksaciju u koronarnim arterijama. SAR analiza pokazala je da su za povećanje relaksacije bile neophodne 5-OH, 7-OH, 4'-OH, C2=C3 i C4=O. Ispitivanje je pokazalo da prisutnost glikozilacijske skupine smanjuje učinak relaksacije. Ukupna energija i molekulski volumen također su se pokazali kao dobri deskriptori za predviđanje aktivnosti opuštanja (Xu i sur., 2007.).

Apigenin je pokazao najveći inhibicijski potencijal za enzim CYP3A4, među monomernim flavonoidima, uz biflavon amentoflavon (dimer apigenina) (Cermak 2008.). Li i suradnici su inhibiciju CYP3A4 pomoću apigenina opisali kao reverzibilnu s konstantom inhibicije (K_i) od 6,2 μM (Li i sur., 2017.). Flavon krizin, pokazao je veliki inhibicijski potencijal za CYP1A1 i CYP1B1 prvenstveno zbog hidroksilne skupine na prstenima A i B i to na položajima 3, 5 i 7, a posebno važnu ulogu u inhibiciji CYP1B1 ima hidroksilna skupina na položaju 3 (Shimada i sur., 2010.).

Doostdar i suradnici proučavali su utjecaj diosmetina na porodicu CYP1. Pokazalo se da supstituenti na položajima 3 i 4 imaju značajan utjecaj na inhibicijski učinak diosmetina na CYP1 (Doostdar i sur., 2000.). Inhibicijski potencijal za CYP1A2 pokazali su flavoni tangeretin, diosmetin i akacetin (Cermak 2008.).

U ispitivanju inhibicijskog učinka diosmetina i hesperetina na metaboličku aktivnost CYP2C8, Quintieri i suradnici su koristeći humane jetrene mikrosome te primjenom karakteristične reakcije 6α-hidroksilacije paklitaksela, utvrdili da oba ispitivana flavonoida inhibiraju nastajanje 6α-hidroksipaklitaksela ovisno o koncentraciji primijenjenog flavonoida, pri čemu se pokazalo da je diosmetin oko 16 puta jači inhibitor od hesperetina (srednja vrijednost IC_{50} = 4,25 ± 0,02 μM za diosmetin i IC_{50} = 68,5 ± 3,3 μM za hesperetin). Zbog niskog inhibicijskog potencijala hesperetina, okarakteriziran je tip inhibicije izazvan diosmetinom, pri čemu se ovaj flavonoid pokazao kao reverzibilan i potpuni inhibitor CYP2C8 s K_i = 3,13 ± 0,11 μM. Kinetička je analiza pokazala da je diosmetin izazvao inhibiciju miješanog tipa, jer je značajno smanjio maksimalnu brzinu enzimatske reakcije (V_{max}) i povećao vrijednost Mihaelis-Mentenove konstante (K_m). Rezultati kinetičkih analiza bili su konzistentni sa simulacijom molekularnog sidrenja, koja je pokazala da se mjesto vezanja diosmetina podudara s veznim mjestom supstrata za CYP2C8. Ova studija ukazuje na potencijalnu kliničku važnost, jer je dokazano da diosmetin inhibira CYP2C8 u koncentracijama koje su uobičajene kod *in vivo* primjene, što može uzrokovati

farmakokinetičke interakcije uz istodobnu primjenu s lijekovima koji se metaboliziraju ovim enzimom CYP (Quintieri i sur., 2011.).

Uloga humanog enzima CYP2A6 u oksidaciji flavanona ((2*R*) - i (2*S*) –enantiomera) i flavona proučavana je u humanim mikrosomima jetre i rekombinantnim ljudskim enzimima citokrom P450. CYP2A6 pokazao se vrlo učinkovit prilikom oksidiranja flavanona, pri čemu nastaje flavon, 2'-hidroksi, 4'- i 6-hidroksiflavanon i prilikom oksidiranja flavona, kako bi nastali mono- i di-hidroksilirani produkti, poput monohidroksi flavona i dihidroksi flavona. Ovi rezultati upućuju na to da CYP2A6 katalizira specifičnu oksidaciju flavanona i flavona u humanim mikrosomima jetre (Nagayoshi i sur., 2019.). Osim utjecaja CYP2A6 na flavonoide, dokazan je i inhibicijski učinak flavona i flavanona na karakterističnu reakciju 7-hidroksilacije kumarina kataliziranu od strane CYP2A6 (Shimada i sur., 2013.). Flavanonom izazvana inhibicija ostalih enzima CYP koji su predmet ove disertacije, prema dostupnim podacima, nije ranije zabilježena.

Quintieri i suradnici, ispitivali su učinke povećanja koncentracije flavonoida salvigenina, diosmetina i luteolina na metabolizam midazolama, supstrata za ispitivanje aktivnosti enzima CYP3A4. Diosmetin i luteolin inhibirali su, ovisno o koncentraciji, nastanak metabolita 1' i 4' -hidroksimidazolama. Kako bi se procijenilo postoji li kakav odnos između fizičko-kemijskih svojstava flavona i njihovih učinaka na metabolizam midazolama, testirali su učinke još tri dodatna flavona (flavon, tangeretin, krizin). Pokazalo se da flavoni koji posjeduju više od dvije hidroksilne skupine (luteolin, diosmetin) inhibiraju biotransformaciju midazolama, dok flavoni bez hidroksilnih skupina na prstenima A i B (flavon, tangeretin) stimuliraju metabolizam midazolama. Rezultati ovog ispitivanja su od kliničke važnosti jer upućuju na to da luteolin i diosmetin mogu uzrokovati farmakokinetičke interakcije istodobnom primjenom s lijekovima metaboliziranim putem CYP3A (Quentieri i sur., 2008.). Također je dokazno da luteolin i kvercetin inhibiraju humane jetrene enzime CYP1A2, CYP3A, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 i CYP2E1 *in vitro* s IC_{50} vrijednostima < 10 μM (Cao i sur., 2017.).

Izolacijom flavona, apigenina i luteolina te flavonola kvercetina iz *Vernonia cinerea*, dokazano je snažno inhibicijsko djelovanje navedenih flavonoida na metaboličke učinke CYP2A6. Određene su IC_{50} vrijednosti kao i kinetički parametri, kojima je utvrđen reverzibilni tip inhibicije, pri čemu je apigenin pokazao inhibiciju miješanog tipa dok su

luteolin i kvercetin pokazali kompetitivnu inhibiciju (Boonruang i sur., 2017., Prasopthum i sur., 2015.).

Tangeretin, polimetoksilirani flavon, prisutan u velikim količinama u agrumima, snažan je inhibitor EROD aktivnosti CYP1A2, s IC_{50} od 0,8 μM ispitane u jetrenim mikrosomima štakora i 16 μM u humanim mikrosomima. Inhibicija je bila kompetitivna s K_i od 68 nM (Obermeier i sur., 1995.).

Pregledom dostupne literature nije vidljivo da je do sada ispitan inhibicijski utjecaj tektokrizina na metaboličku aktivnost enzima CYP.

Flavonoli

Flavonoli posjeduju hidroksilnu skupinu na C3 atomu. Široko su rasprostranjeni u prirodi, a nalaze se u jabukama, bobičastom voću, luku, crnom vinu, zelenom i crnom čaju, kelju, poriluku, brokuli itd. (Ratnasooriya i sur., 2010., Lotito i sur., 2006., D'Archivio i sur., 2007.). Neki od najznačajnijih predstavnika flavonola su izoramnetin, kempferol, miricetin i kvercetin, a u ovoj disertaciji dodatno su ispitani i 3,6-dihidroksiflavon, 3,7-dihidroksiflavon, galangin, morin, ramnetin i tamariksetin.

Inhibicijski potencijal flavonola, na metaboličku aktivnost enzima CYP3A4 i CYP2C9, smanjuje se porastom broja supstituiranih hidroksilnih skupina te se IC_{50} vrijednost povećava kako slijedi: galangin < kempferol < kvercetin < miricetin (Korobkova 2015.).

Istraživanja na jednom od najvažnijih enzima u metabolizmu lijekova, CYP3A4, pokazala su kako flavonoli kempferol i kvercetin inhibiraju metabolizam felodipina i nifedipina. Osim navedenih, inhibicijski potencijal za CYP3A4 pokazali su i flavonol miricetin te flavon apigenin (Cermak 2008.).

Tiong i suradnici ispitali su ukupno 23 hidroksilirana i ne-hidroksilirana flavonoida iz nekoliko strukturnih podskupina, uključujući flavonole, flavone, flavanone i flavane. Od ukupnog broja ispitivanih spojeva, najaktivniji inhibitori 7-hidroksilacije kumarina (CYP2A6) pokazali su se hidroksilirani flavonoidi iz skupine flavonola. Najpotentniji je bio miricetin (IC_{50} = 41,4 μM) praćen kvercetinom (IC_{50} = 61,3 μM), galanginom (IC_{50} = 68,0 μM) i kempferolom (IC_{50} = 69,8 μM). Zanimljivo je da je akacetin pokazao sličan inhibicijski potencijal kao galangin i kempferol s IC_{50} od 67,6 μM. Flavoni, apigenin i luteolin pokazali

su nešto slabiji inhibicijski potencijal s IC_{50} od 86,3 odnosno 91,4 μM, dok su se svi drugi flavonoidi poput morina, krizina, hesperetina, naringenina, flavana i tangeretina pokazali kao relativno manje potentni inhibitori s IC_{50} vrijednosti većom od 100 μM. Samo za najpotentnije inhibitore određen je tip inhibicije, pri čemu su miricetin, galangin i kempferol djelovali inhibicijom miješanog tipa (s K_i vrijednosti od 33,75 ± 3,89, 37,50 ± 0,24 i 37,59 ± 1,53 μM), dok je kvercetin pokazao kompetitivni tip inhibicije. Sukladno navedenom, Tiong i suradnici ustanovili su da je prisutnost hidroksilne skupine na C3 strukturi flavona važan kriterij koji je pridonio većem inhibicijskom učinku te je utvrđeno da prisutnost većeg broja hidroksilnih skupina dodatno pojačava inhibicijski učinak flavonola na aktivnost 7-hidroksilacije kumarina. Takav strukturni učinak opažen je u skladu s redoslijedom inhibicijskog potencijala između ispitivanih flavonola: miricetin > kvercetin > galangin > kempferol > rutin > morin > fisetin. Morin se pokazao kao iznimka, unatoč velikom broju slobodnih hidroksilnih skupina. Inhibicijski potencijal je nizak, međutim takav rezultat pripisao se C2-slobodnoj hidroksilnoj skupini na prstenu B osnovne strukture (Tiong i sur., 2010.). Akacetin se pokazao kao najpotentniji inhibitor CYP2A6 iz podskupine flavona. Iako je strukturno gotovo ekvivalentan apigeninu, uz iznimku metoksi skupine na C4', pokazao je približno 20 % veći inhibicijski potencijal u usporedbi s apigeninom. Također, pokazalo se da akacetin inhibira aktivnost CYP2A6 kompetitivnim tipom inhibicije. Dodatno je utvrđeno da velik broj ne-hidroksilnih skupina u strukturi flavona, poput onih kod tangeretina, značajno smanjuje inhibicijski učinak u katalitičkoj aktivnosti CYP2A6 (Tiong i sur., 2010.).

Dakle, osim morina i krizina, svi flavonoli i flavoni koji pokazuju inhibicijske učinke posjeduju slobodne hidroksilne skupine na C5 i C7. Pretpostavlja se da upravo te slobodne hidroksilne skupine, stupaju u interakciju s Fe(III) enzima CYP zbog njegove steričke dostupnosti i odgovarajuće kiselosti. To objašnjava snažnu interakciju nekoliko flavonola (miricetina, kvercetina, galangina i kempferola) i flavona (akacetina, apigenina i luteolina) s CYP2A6. Dodatno se pretpostavlja da planarnost molekula flavonoida iz ove dvije skupine, zbog prisutnosti C2-C3 dvostruke veze u prstenu C njihove osnovne strukture, dodatno doprinosi inhibicijskom potencijalu flavonola i flavona (Tiong i sur., 2010.).

U dostupnoj literaturi nema podataka o inhibicijskom utjecaju 3,6-dihidroksiflavona i 3,7-dihidroksiflavona na metaboličku aktivnost enzima CYP te su isti ispitani u sklopu ove disertacije (Šarić Mustapić i sur., 2018.), međutim 7-dihidroksiflavon pokazao se kao snažan inhibitor CYP1A2 (IC_{50} < 0,3 μM) (Zhai i sur., 1998.). Galangin je pokazao značajnu

inhibiciju miješanog tipa na enzim CYP1A2 s K_i vrijednosti od 0,0008 μM (Zhai i sur., 1998.).

Glavni flavonolni aglikoni prisutni u biljci *Ginkgo biloba*, izoramnetin, kempferol i kvercetin inhibirali su humani rekombinantni CYP1A2, mješovitom ili kompetitivnom inhibicijom (Chang i sur., 2006.), dok se kempferol dodatno pokazao kao slabi inhibitor CYP3A4 u humanim jetrenim mikrosomima (Miniscalco i sur., 1994.).

Za morin je ustanovljeno da inhibira *O*-deetilaciju fenacetina kataliziranu enzimom CYP1A2 (Tsyrlov i sur., 1994.) te su Václavíková i suradnici dokazali inhibicijski učinak na aktivnost CYP2C8, za inhibitore s niskom K_i vrijednosti u mikromolarnom rasponu (Václavíková i sur., 2003.).

Miricetin se pokazao kao djelotvorni inhibitor CYP2D6 i CYP3A4 (hidroksilacijom triazolama) u humanim jetrenim mikrosomima, pri niskim mikromolarnim koncentracijama (Von Moltke i sur., 2004.).

Kvercetin dokazano inhibira *O*-deetilaciju fenacetina, kataliziranu enzimom CYP1A2 i 4-metilhidroksilaciju tolbutamida (CYP2C9) s IC_{50} vrijednostima od 1,25 i 19,2 μg/mL (Liu i sur., 2006.). Važnost *orto*-orijentacije hidroksilne skupine na prstenu B, ispitana je uspoređivanjem učinaka kvercetina i morina, gdje se inhibicija CYP1A2 kvercetinom pokazala učinkovitijom nego s morinom. Orijentacija metilne skupine također može utjecati na inhibiciju (Tsyrlov i sur., 1994.).

Obach i suradnici ispitali su djelovanje ekstrakta kvercetina iz gospine trave (*Hypericum perforatum*), koja je komercijalno dostupna u pripravcima koji se koriste u liječenju depresije. Ispitali su utjecaj na *O*-deetilaciju fenacetina, posredovanu enzimom CYP1A2, u rekombinantnom CYP1A2 enzimskom pripravku te su ustanovili da kvercetin inhibira CYP1A2 s IC_{50} vrijednosti od 7,5 μM (Obach i sur., 2000.).

U studiji u kojoj su se koristili humani jetreni mikrosomi i cDNA eksprimirani enzimi, flavonol kvercetin je kompetitivno inhibirao CYP2C8 ovisnu 6α-hidroksilaciju paklitaksela s K_i vrijednosti od ~ 1 μM (Rahman i sur., 1994.). Pokazalo se da flavonoli, kvercetin i kempferol, inhibiraju metabolizam nifedipina i felodipina posredstvom CYP3A4, u humanim mikrosomima jetre, pri koncentracijama većim od 10 μM (Miniscalco i sur., 1994.).

U dostupnoj literaturi nisu pronađeni podaci koji potvrđuju inhibicijski utjecaj ramnetina na metaboličku aktivnost enzima citokrom P450, stoga je ramnetin također ispitan u sklopu ove disertacije (Šarić Mustapić i sur., 2018.).

Izoflavoni

Izoflavoni, imaju prsten B supstituiran na položaju 3 te se tako strukturno razlikuju od ostalih skupina flavonoida koji prsten B imaju supstituiran na položaju 2. U prirodi su prisutni u mahunarkama. U ovoj disertaciji ispitani su genistein i prunetin.

Izoflavon genistein inhibira CYP1A2 u mikrosomima jetre iz miševa, induciranih β-naftoflavonom, s IC_{50} vrijednostima od 5,6 mM (Helsby et al., 1998.). Koristeći humani CYP1A2 iz specifičnog ekspresijskog sustava, dokazan je nekompetitivni tip inhibicije (Helsby i sur., 1998.). Foster i suradnici ispitali su inhibicijski potencijal genisteina i daidzeina prisutnih u soji te su otkrili da inhibiraju metabolizam posredovan enzimom CYP3A4, iako su se njihovi glikozidi pokazali inaktivnim u preparatima humanih mikrosoma (Foster i sur., 2003.).

U dostupnoj literaturi do sada nema podataka o inhibicijskom utjecaju prunetina na aktivnost enzima CYP.

Katehini

Katehini su sekundarni metaboliti biljaka. U hrani se većinom nalaze u čajevima i koštuničavom voću. Strukturno, na položajima 2 i 3 postoje dva kiralna centra, stoga govorimo o četiri dijastereoizomera. Dva izomera su u *trans* konfiguraciji i nazivaju se katehini, a druga dva su u *cis* konfiguraciji i nazivaju se epikatehini. Antioksidacijska aktivnost ovisi o kemijskoj strukturi katehina, uz prisutnost kateholne skupine na prstenu B i hidroksilne skupine koja aktivira dvostruku vezu na prstenu C (Tournaire i sur., 1993.).

Muto i suradnici, dokazali su kako katehini iz zelenog čaja inhibiraju oksidacije tipičnih supstrata, kataliziranih enzimima CYP, prvenstveno *O*-deetilaciju etoksikumarina pomoću CYP1A1, *O*-deetilaciju etoksiresorufina pomoću CYP1A2 i 1'-hidroksilaciju midazolama pomoću CYP3A4 (Muto i sur., 2001.).

Sažetak učinaka pojedinih flavonoida na različite enzime CYP, dostupnih u literaturi, prikazan je u tablici 2.

Tablica 2. Sažetak literaturnog pregleda koji se odnosi na učinak flavonoida, ispitanih u ovoj disertaciji, na metaboličku aktivnost odabranih enzima CYP (↑indukcija, ↓inhibicija).

Enzim CYP	Flavonoid	Učinak	Literaturni izvor
CYP3A4	naringenin	↓	Ubeaud i sur., 1999., Doostdar i sur., 2000.
	sakuranetin	↑	Jeong i sur., 2018.
	miricetin	↓	Ho i sur., 2001., Korobkova 2015., Cermak 2008., Von Moltke i sur., 2004.
	kvercetin	↓	Ho i sur., 2001., Korobkova 2015., Miniscalco i sur., 1994.
	morin	↓	Ho i sur., 2001.
	kempferol	↓	Ho i sur., 2001., Korobkova 2015., Miniscalco i sur., 1994.
	apigenin	↓	Ho i sur., 2001.
	flavon	↓	Ho i sur., 2001., Lee i sur., 1994., Zhai i sur., 1998., Schrag i sur., 2001.
		↑	Quentieri i sur., 2008.
	tangeretin	↑	Quentieri i sur., 2008.
	akacetin	↓	Doostdar i sur., 2000.
	diosmetin	↓	Doostdar i sur., 2000., Quentieri i sur., 2008.
	hesperetin	↓	Doostdar i sur., 2000.
	flavanon	↓	Schrag i sur., 2001.
	6-hidroksiflavon	↓	Schrag i sur., 2001.
	apigenin	↓	Cermak 2008.
	galangin	↓	Korobkova 2015.
	katehin	↓	Muto i sur., 2001.
CYP1A2	hesperetin	↓	
	naringenin	↓	Fuhr i sur., 1993.
	7-hidroksiflavon	↓	Zhai i sur., 1998.
	tangeretin	↓	Cermak 2008.
	diosmetin	↓	Cermak 2008., Doostdar i sur., 2000.
	akacetin	↓	Cermak 2008., Doostdar i sur., 2000.
	luteolin	↓	Cao i sur., 2017.
	kvercetin	↓	Cao i sur., 2017., Liu i sur., 2006., Obach i sur., 2000.
	tangeretin	↓	Obermeier i sur., 1995.
	galangin	↓	Zhai i sur., 1998., Tsyrlov i sur., 1994.
	izoramnetin	↓	Chang i sur., 2006.
	kempferol	↓	Chang i sur., 2006.

Tablica 2 - nastavak. Sažetak literaturnog pregleda koji se odnosi na učinak flavonoida, ispitanih u ovoj disertaciji, na metaboličku aktivnost odabranih enzima CYP (↑indukcija, ↓inhibicija).

CYP1A2	kvercetin	↓	Chang i sur., 2006.
	morin	↓	Tsyrlov i sur., 1994.
	genistein	↓	Helsby i sur., 1998.
	katehin	↓	Muto i sur., 2001.
	flavon	↓	Zhai i sur., 1998.
CYP2A6	naringenin	↓	Draper i sur., 1997.
	flavon	↓	Shimada i sur., 2013.
	flavanon	↓	Shimada i sur., 2013.
	apigenin	↓	Boonruang i sur., 2017., Prasopthum i sur., 2015. Tiong i sur., 2010.
	luteolin	↓	Boonruang i sur., 2017., Prasopthum i sur., 2015. Tiong i sur., 2010.
	kvercetin	↓	Boonruang i sur., 2017., Prasopthum i sur., 2015.
	miricetin	↓	Tiong i sur., 2010.
	kvercetin	↓	Tiong i sur., 2010.
	galangin	↓	Tiong i sur., 2010.
	kempferol	↓	Tiong i sur., 2010.
	akacetin	↓	Tiong i sur., 2010.
	morin	↓	Tiong i sur., 2010.
	krizin	↓	Tiong i sur., 2010.
	hesperetin	↓	Tiong i sur., 2010.
	naringenin	↓	Tiong i sur., 2010.
	tangeretin	↓	Tiong i sur., 2010.
CYP2D6	luteolin	↓	Cao i sur., 2017.
	kvercetin	↓	Cao i sur., 2017.
	miricetin	↓	Von Moltke i sur., 2004.
CYP2C8	kvercetin	↓	Pang i sur., 2012., Cao i sur., 2017., Rahman i sur., 1994.
	luteolin	↓	Pang i sur., 2012. Cao i sur., 2017.
	hesperetin	↓	Pang i sur., 2012., Quintieri i sur., 2011.
	diosmetin	↓	Quintieri i sur., 2011.
	morin	↓	Václavíková i sur., 2003.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

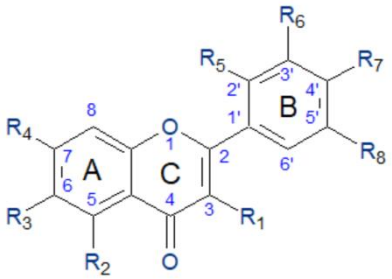
3.1.1. Flavonoidi, izvori enzima citokrom P450, marker supstrati i marker inhibitori

U ovom doktorskom radu, za ispitivanje inhibicijskog učinka flavonoida na metabolizam odabranih enzima CYP, korišteno je trideset flavonoida. Svi standardi flavonoida su deklarirane čistoće ≥ 98 % te su korišteni bez dodatnog pročišćavanja:

- galangin, hesperetin, apigenin, krizin, flavon, kvercetin (Sigma-Aldrich, SAD)
- akacetin, sakuranetin, ramnetin, tangeretin (BioChemica, Švicarska)
- miricetin, krizin-dimetileter, diosmetin, genistein, luteolin, pinocembrin, pinocembrin-7-metileter, prunetin, tektokrizin, flavanon, naringenin, morin, tamariksetin, katehin (Extrasynthèse, Francuska)
- kempferol, izoramnetin (Fluka, Njemačka)
- 6-hidroksiflavon, 7-hidroksiflavon, 3,6-dihidroksiflavon i 3,7-dihidroksiflavon (Chromadex, SAD)

Strukturne značajke flavonoida korištenih u ovom radu prikazane su u tablici 3.

Tablica 3. Strukturne značajke flavonoida ispitanih u ovom radu.



Flavonoid	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5	R_6	R_7	R_8
Flavanoni								
Naringenin	H	OH	H	OH	H	H	OH	H
Flavanon	H	H	H	H	H	H	H	H
Hesperetin	H	OH	H	OH	H	H	OCH_3	OH
Pinocembrin-7-metileter	H	OH	H	OCH_3	H	H	H	H

Tablica 3 - nastavak. Strukturne značajke flavonoida ispitanih u ovom radu.

Pinocembrin	H	OH	H	OH	H	H	H	H
Sakuranetin	H	OH	H	OCH_3	H	H	OH	H
Flavoni								
6-Hidroksiflavon	H	H	OH	H	H	H	H	H
7-Hidroksiflavon	H	H	H	OH	H	H	H	H
Apigenin	H	OH	H	OH	H	H	OH	H
Krizin	H	OH	H	OH	H	H	H	H
Krizin-dimetileter	H	OCH_3	H	OCH_3	H	H	H	H
Diosmetin	H	OH	H	OH	H	OH	OCH_3	H
Flavon	H	H	H	H	H	H	H	H
Luteolin	H	OH	H	OH	H	OH	OH	H
Akacetin	H	OH	H	OH	H	H	OCH_3	H
Tangeretin	H	OCH_3	OCH_3	OCH_3	H	H	OCH_3	H
Tektokrizin	H	OH	H	OCH_3	H	H	H	H
Flavonoli								
3,6-Dihidroksiflavon	OH	H	OH	H	H	H	H	H
3,7-Dihidroksiflavon	OH	H	H	OH	H	H	H	H
Galangin	OH	OH	H	OH	H	H	H	H
Izoramnetin	OH	OH	H	OH	H	OCH_3	OH	H
Kempferol	OH	OH	H	OH	H	H	OH	H
Morin	OH	OH	H	OH	OH	H	OH	H
Miricetin	OH	OH	H	OH	H	OH	OH	OH
Kvercetin	OH	OH	H	OH	H	OH	OH	H
Ramnetin	OH	OH	H	OCH_3	H	OH	OH	H
Tamariksetin	OH	OH	H	OH	H	OH	OCH_3	H
Izoflavoni								
Genistein	H	OH	H	OH	H	H	OH	H
Prunetin	H	OH	H	OCH_3	H	H	OH	H
Katehini								
Katehin	OH	OH	H	OH	H	H	OH	OH

Kao izvor enzima (CYP3A4, CYP1A2, CYP2A6, CYP2C8, CYP2D6) primijenjeni su rekombinantni bakulosomi s hipereksprimiranim enzimima CYP i koeksprimiranom NADPH citokrom P450 reduktazom i citokromom b_5. Bakulosomi su proizvod tvrtke Thermo Fisher Scientific (Waltham, SAD).

Za ispitivanje aktivnosti, odabranih enzima CYP, primijenili su se odgovarajući marker supstrati pojedinog enzima citokrom P450 (Sigma-Aldrich, SAD):

- fenacetin (čistoće ≥ 98 % za HPLC)
- kumarin (čistoće ≥ 99 % za HPLC)
- paklitaksel (čistoće ≥ 95 % za HPLC)
- dekstrometorfan (čistoće ≥ 99 %)
- testosteron (čistoće ≥ 99 % za HPLC)

Kao pozitivne kontrole reakcija, posredovanih enzimima CYP, koristili su se odgovarajući metaboliti:

- acetaminofen (čistoće ≥ 99 %, Sigma-Aldrich, SAD)
- paraksantin (čistoće ≥ 98 %, Sigma-Aldrich, SAD)
- 7-hidroksikumarin (čistoće ≥ 95 %, Extrasynthèse, Francuska)
- 6α-hidroksipaklitaksel (čistoće ≥ 97 %, Sigma-Aldrich, SAD)
- dekstrorfan (Sigma-Aldrich, SAD)
- 6β-hidroksitestosteron (čistoće ≥ 97 %, Cayman Europe, Estonija)

Kao pozitivne kontrole inhibicije koristili su se marker inhibitori pojedinih enzima citokrom P450 (Sigma-Aldrich, SAD):

- 4-alfanaftoflavon (čistoće ≥ 98 %)
- metoksalen (USP standard)
- kvercetin (čistoće ≥ 98 %, Sigma-Aldrich, SAD)
- kinidin (čistoće ≥ 98 %, Sigma-Aldrich, SAD)
- ketokonazol (čistoće ≥ 98 %, Sigma-Aldrich, SAD)

3.1.2. Kemikalije i radne otopine

Kemikalije korištene prilikom izrade ovog doktorskog rada:

- metanol (čistoće za HPLC) (Merck, Njemačka)
- mravlja kiselina (Merck, Njemačka)
- ultra čista voda (Arium Comfort I) (Sartorius AG, Njemačka)
- glukoza-6-fosfat (G-6-P) (Sigma-Aldrich, SAD)
- $NADP^+$ (Sigma-Aldrich, SAD)
- glukoza-6-fosfat dehidrogenaza (G-6-PD) (Sigma-Aldrich, SAD)
- kalijev fosfat (Kemika d.d., Hrvatska)
- kloridna kiselina (Kemika d.d., Hrvatska)
- acetonitril (Merck, Njemačka)
- diklormetan (Sigma-Aldrich, SAD)

Sve ostale kemikalije kupljene su od tvrtke Sigma-Aldrich, SAD, osim ako nije drugačije naznačeno.

Za potrebe analize pripremljene su radne otopine:

- 20 mM poredbene otopine flavonoida u metanolu
- 1,0 M otopina kalijevog fosfatnog pufera pH 7,4
- 1 % mravlja kiselina u acetonitrilu
- NADPH generirajući sustav (0,1 M glukoza-6-fosfata, 10 mg mL^{-1} $NADP^+$ i 1000 IU mL^{-1} glukoza-6-fosfat dehidrogenaze u omjeru 100:50:2 (v/v/v))
- Poredbene otopine marker supstrata:
    - 20 mM otopina testosterona
    - 20 mM otopina fenacetina
    - 20 mM otopina kumarina
    - 20 mM otopina paklitaksela
    - 20 mM otopina dekstrometorfana
- Poredbene otopine marker inhibitora:
    - 2 μM otopina ketokonazola
    - 1 μM otopina 4-alfanaftoflavona
    - 2 μM otopina metoksalena
    - 50 μM otopina kvercetina
    - 2 μM otopina kinidina

3.1.3. Instrumenti

- laboratorijska vaga „Mettler-Toledo AB135-S/FACT“ (Mettler-Toledo, Inc., SAD)
- pH metar „Seven Easy“ (Mettler Toledo, Švicarska)
- HPLC „Agilent 1100“ (Agilent Technologies, SAD)
    - kolona Agilent Zorbax StableBond C18 dimenzije 250x4,6 mm, 3 µL
    - kolona Luna C18 (2) dimenzije 150x4,6 mm, 3 µm
    - detektor s nizom dioda, DAD
- centrifuga „Rotofix 32“ (Hettlich, Švicarska)
- vakuumski uparivač Visiprep™ SPE Vacuum Manifold (Sigma-Aldrich, SAD)
- mješalica „Vortex“ (Fisher Scientific, SAD)
- vodena kupelj „WBU45“ (Memmert, Schwabach, Švicarska)

3.1.4. Programski paketi za obradu podataka

- Programski paket verzija Chem Station LC 3D za HPLC (Agilent 1100)
- Program Statistica 7.0 (Statsoft, SAD) za statističku obradu podataka
- Program ACD/ChemSketch (Freeware) 11.0 (Advanced Chemistry Development, Kanada) za generiranje deskriptora supstituenata
- Programski paket TAM za topologijske indekse (Vedrina i sur., 1997.)
- Programski paket HyperChem 8.0 (Hypercube, Inc., Gainesville, FL, USA) za kvantno-kemijske parametre
- Programski paket GAMESS (*The General Atomic and Molecular Electronic Structure System*) (Gordon research group, Iowa State University, SAD) za kvantno-kemijske parametre
- Program ACD/Labs (Advanced Chemistry Development, Kanada) za fizikalno-kemijske parametre
- Program EPI (Estimation Program Interface) Suit (EPA, United States Environmental Protection Agency i SRC, Syracuse, New York, SAD) (*chemspider.com*) za parametar topljivosti
- Mrežne aplikacije *chemicalize.org* (ChemAxon, SAD) i *chemspider.com* (Royal Society of Chemistry, UK) za izračunavanje parametara izoelektrična točka (pI) i log$P$ (logP_{chem})

- CypRules Server (Hong i sur., 2008.) za predviđanje inhibicije enzima citokrom P450
- Programski jezik R verzija 3.1.2. (R Foundation, Austrija) za statističku obradu podataka, predviđanje metodom slučajne šume (R verzija 3.1.2. RandomForest paket verzija 4.6_12) i eksternu validaciju
- Program AutoDock 4.2.6. (The Scripps Research Institute, SAD) s AutoDockTools 1.5.6., za procjenu najvjerojatnije konformacije kompleksa flavonoida i odabranih enzima CYP te potencijalnih veznih mjesta

3.2. METODE

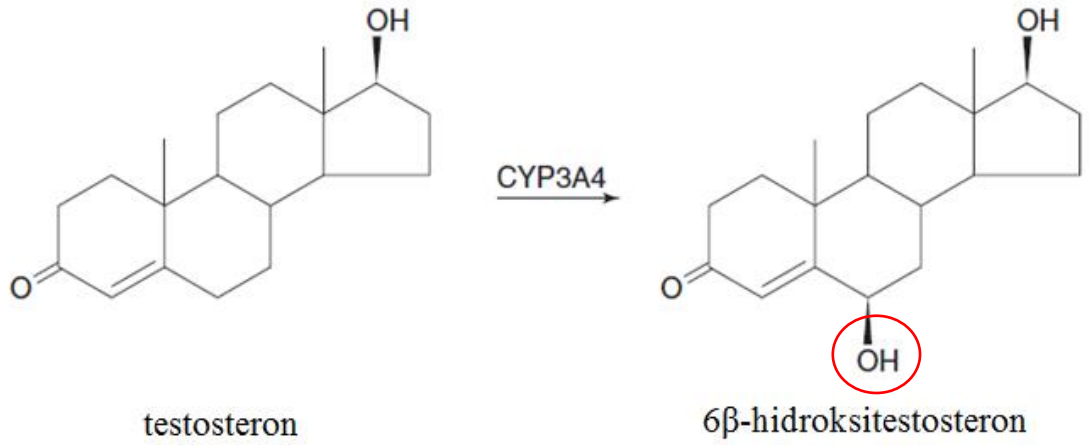
3.2.1. Ispitivanje metaboličke aktivnosti enzima citokrom P450

U tekstu koji slijedi, navedeni su prilagođeni postupci inhibicije enzima citokrom P450 opisani u literaturi (Delaporte i sur., 2001., Šarić Mustapić i sur., 2018., Hellum i sur., 2007., Bojić i sur., 2019.), a korišteni u ovom istraživanju. Primjenom karakterističnih reakcija, u prisutnosti specifičnih marker supstrata pojedinog enzima CYP, detaljno su opisani parametri primijenjenih kromatografskih HPLC-DAD analiza.

3.2.1.1. Inkubacije s enzimima citokrom P450

U svrhu ispitivanja inhibicijskog potencijala flavonoida na metaboličku aktivnost odabranih enzima CYP, uz prisutnost specifičnih marker supstrata, primijenjene su karakteristične reakcije biotransformacije: 6β-hidroksilacija testosterona (CYP3A4), *O*-deetilacija fenacetina (CYP1A2), 7-hidroksilacija kumarina (CYP2A6), *O*-demetilacija dekstrometorfana (CYP2D6) i 6α-hidroksilacija paklitaksela (CYP2C8).

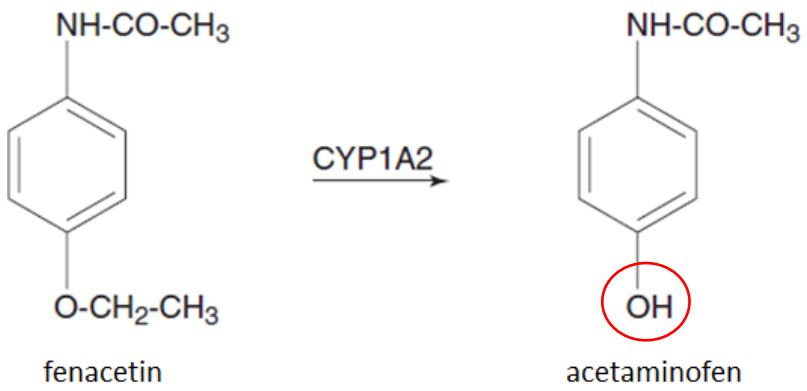
Ispitivanje inhibicije enzima CYP3A4 (6β-hidroksilacija testosterona)



Slika 9. Reakcija 6β-hidroksilacije testosterona.

6β-hidroksilacija testosterona korištena je kao marker reakcija za praćenje aktivnosti enzima CYP3A4. Inkubacije su provedene na 37 °C u ukupnom volumenu od 100 µL. Inkubacijska smjesa sadržavala je 5 pmola enzima CYP3A4 i 200 µM testosterona u metanolu. pH smjese postavljen je na 7,4 koristeći kalijev fosfatni pufer (konačna koncentracija 50 mM). Ostatna aktivnost određena je koinkubacijskim flavonoidom (1 µM) s marker supstratom (testosteron) kroz 30 minuta, s ili bez predinkubacije, ovisno o ispitivanom tipu inhibicije. Reakcije su započete dodavanjem 15 µL NADPH generirajućeg sustava. U slijepu probu (negativnu kontrolu) umjesto NADPH generirajućeg sustava dodano je 15 µL ultra-čiste vode. Nakon inkubacija uz mehaničko miješanje u vodenoj kupelji (37 °C, 30 min), svaka reakcijska smjesa zaustavljena je dodatkom diklormetana (400 µL), promiješana mješačem i centrifugirana 10 minuta na 3000 rpm (1900 *g*), kako bi se odvojila dva sloja. Donji, organski sloj prenesen je pipetom, a otapalo upareno vakuumskim uparivačem. Osušeni uzorci rekonstituirani su u 30 µL metanola za HPLC-DAD analizu.

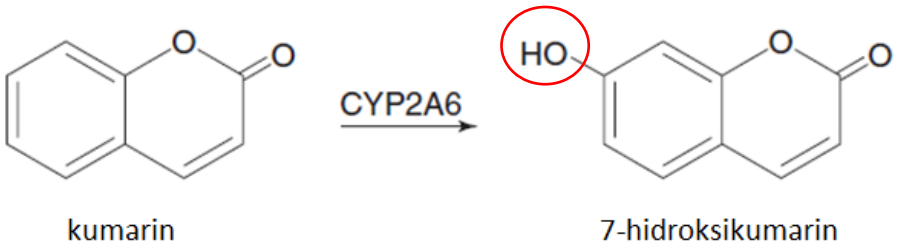
Ispitivanje inhibicije enzima CYP1A2 (O-deetilacija fenacetina)



Slika 10. *O*-deetilacija fenacetina.

O-deetilacija fenacetina, korištena je kao marker reakcija za praćenje aktivnosti enzima CYP1A2. Inkubacije su provedene na 37 °C u ukupnom volumenu od 100 µL. Inkubacijska smjesa sadržavala je 5 pmola enzima CYP1A2 i 2 mM fenacetina u metanolu. pH smjese postavljen je na 7,4 koristeći kalijev fosfatni pufer (konačna koncentracija 50 mM). Ostatna aktivnost određena je koinkubacijskim flavonoidom (1 µM) s marker supstratom (fenacetin) kroz 15 min, s ili bez predinkubacije, ovisno o ispitivanom tipu inhibicije. Reakcije su započete dodavanjem 15 µL NADPH generirajućeg sustava te inkubirane uz miješanje, u vodenoj kupelji. Svaka reakcijska smjesa zaustavljena je dodatkom 1 mL 1 % mravlje kiseline u diklormetanu, promiješana mješačem i centrifugirana 10 min na 1900 *g*, kako bi se odvojila dva sloja. Donji, organski sloj prenesen je pipetom, a otapalo upareno koristeći vodenu kupelj (50 °C, 30 min). Osušeni uzorci rekonstituirani su u 20 µL metanola za HPLC-DAD analizu.

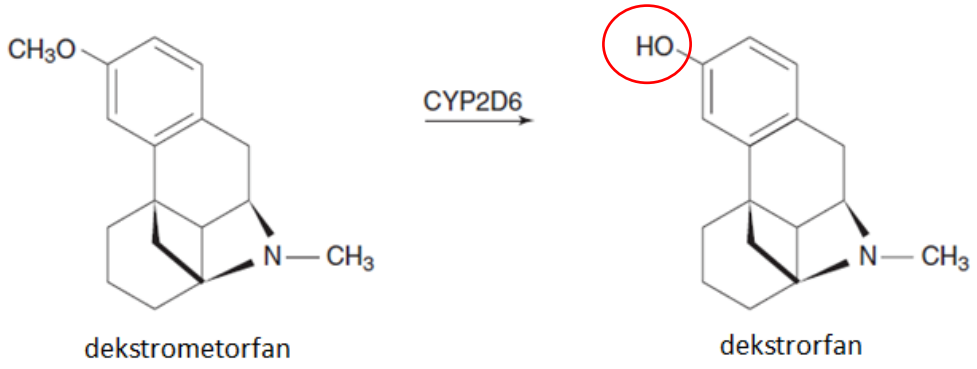
Ispitivanje inhibicije enzima CYP2A6 (7-hidroksilacija kumarina)



Slika 11. 7-hidroksilacija kumarina.

7-hidroksilacija kumarina korištena je kao marker reakcija za praćenje aktivnosti enzima CYP2A6. Inkubacije su provedene na 37 °C u ukupnom volumenu od 100 µL. Inkubacijska smjesa sadržavala je 5 pmola enzima CYP2A6 i 10 µM kumarina u metanolu. pH smjese postavljen je na 7,4 koristeći kalijev fosfatni pufer (konačna koncentracija 50 mM). Ostatna aktivnost određena je koinkubacijskim flavonoidom (1 µM) s marker supstratom (kumarin) kroz 30 min, s ili bez predinkubacije, ovisno o ispitivanom tipu inhibicije. Reakcije su započete dodavanjem 15 µL NADPH generirajućeg sustava te inkubirane uz miješanje u vodenoj kupelji. Svaka reakcijska smjesa zaustavljena je dodatkom 1 % mravlje kiseline u diklormetanu i centrifugirana 10 min na 1900 *g*, kako bi se odvojila dva sloja. Donji, organski sloj prenesen je pipetom, a otapalo upareno na vodenoj kupelji. Osušeni uzorci rekonstituirani su u 20 µL metanola za HPLC-DAD analizu.

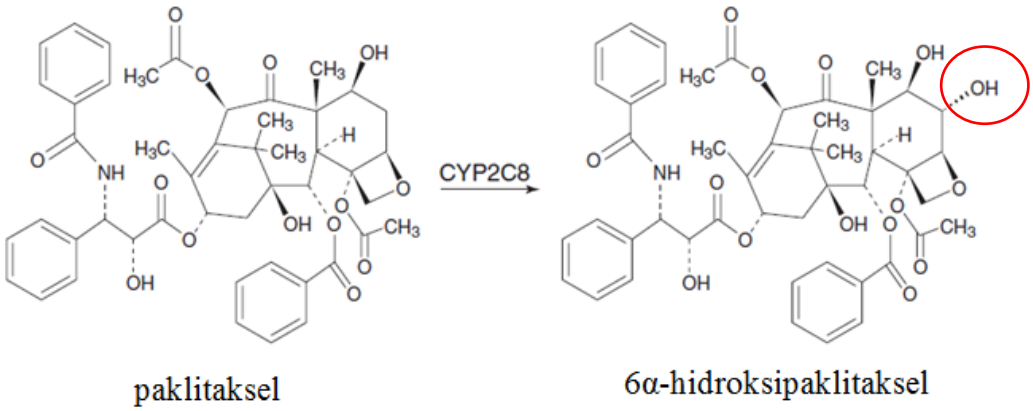
Ispitivanje inhibicije enzima CYP2D6 (O-demetilacija dekstrometorfana)



Slika 12. Reakcija *O*-demetilacije dekstrometorfana.

O-demetilacija dekstrometorfana, korištena je kao marker reakcija za praćenje aktivnosti enzima CYP2D6. Inkubacije su provedene na 37 °C u ukupnom volumenu od 100 µL. Inkubacijska smjesa sadržavala je 5 pmola enzima CYP2D6 i 100 µM dekstrometorfana u metanolu. pH smjese postavljen je na 7,4 koristeći kalijev fosfatni pufer (konačna koncentracija 50 mM). Ostatna aktivnost određena je koinkubacijskim flavonoidom (1 µM) s marker supstratom (dekstrometorfan) kroz 30 min, s ili bez predinkubacije, ovisno o ispitivanom tipu inhibicije. Reakcije su započete dodavanjem 15 µL NADPH generirajućeg sustava te inkubirane uz miješanje u vodenoj kupelji. Svaka reakcijska smjesa zaustavljena je dodatkom 1 % mravlje kiseline u diklormetanu i centrifugirana 10 min na 1900 *g*, kako bi se odvojila dva sloja. Donji, organski sloj prenesen je pipetom, a otapalo upareno pod strujom dušika. Osušeni uzorci dekstrorfana rekonstituirani su u 10 µL metanola za HPLC-DAD analizu.

Ispitivanje inhibicije enzima CYP2C8 (6α-hidroksilacija paklitaksela)



Slika 13. 6α-hidroksilacija paklitaksela.

6α-hidroksilacija paklitaksela, korištena je kao marker reakcija za praćenje aktivnosti enzima CYP2C8. Inkubacije su provedene na 37 °C u ukupnom volumenu od 100 µL. Inkubacijska smjesa sadržavala je 5 pmola enzima CYP2C8 i 40 µM paklitaksela u metanolu. pH smjese postavljen je na 7,4 koristeći kalijev fosfatni pufer (konačna koncentracija 50 mM). Ostatna aktivnost određena je koinkubacijskim flavonoidom (1 µM) s marker supstratom (paklitaksel) kroz 30 min, s ili bez predinkubacije, ovisno o ispitivanom tipu inhibicije. Reakcije su započete dodavanjem 15 µL NADPH generirajućeg sustava te inkubirane uz miješanje u vodenoj kupelji. Svaka reakcijska smjesa zaustavljena je dodatkom 1 % mravlje kiseline u diklormetanu, promiješana mješačem i centrifugirana 10 min na 1900 *g*, kako bi se odvojila dva sloja. Donji, organski sloj prenesen je pipetom, a otapalo upareno na vodenoj kupelji. Osušeni uzorci rekonstituirani su u 20 µL metanola za HPLC-DAD analizu.

3.2.1.2. Praćenje metaboličke aktivnosti enzima citokrom P450 tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti

HPLC analiza provedena je primjenom kromatografa Agilent 1100 opremljenim detektorom s poljem dioda (DAD). U nastavku su detaljno opisani primijenjeni parametri kromatografskih HPLC-DAD analiza.

HPLC-DAD analiza 6β-hidroksitestosterona

HPLC analiza provedena je primjenom kolone Agilent Zorbax SB C18 (250x4,6 mm, 3 μL). Korištena pokretna faza sastojala se od 64 % metanola i 36 % vode; analiza je bila izokratna s brzinom protoka od 1,0 mL min^{-1}. Volumen injektiranog uzorka bio je 20 μL. Kromatogrami su zabilježeni na maksimumu apsorpcije λ = 240 nm. Vrijeme zadržavanja (t_R) marker supstrata (testosterona) iznosilo je 20,7 min, dok je t_R generiranog produkta (6β-hidroksitestosterona) iznosilo 5,4 min, zbog čega je ukupno vrijeme kromatografiranja postavljeno na 30 min. Količina generiranog produkta (6β-hidroksitestosterona), određena je kao površina ispod krivulje, temeljena na kalibracijskoj krivulji standarda.

HPLC-DAD analiza acetaminofena

HPLC analiza provedena je primjenom kolone Luna C18 (2) dimenzije 150x4,6 mm, 3 μm. Temperatura kolone postavljena je na 25 °C. Korištena je gradijentna metoda (t [min]: 0, 2, 13, 14, 20; B [%]: 0, 0, 55, 0, 0) primjenom pokretne faze koja se sastojala od otapala A (voda/acetonitril/ledena octena kiselina = 90/10/0,1(v/v/v)) i B (voda/acetonitril/ledena octena kiselina = 10/90/0,1(v/v/v)) s brzinom protoka od 1,0 mL min^{-1}. Volumen injektiranja bio je 15 μL. Kromatogrami su zabilježeni na maksimumu apsorpcije λ = 254 nm. Vrijeme zadržavanja (t_R) marker supstrata (fenacetina) bilo je 12,1–12,2 min, dok je t_R generiranog produkta (acetaminofena) iznosio 5,6–5,8 min zbog čega je ukupno vrijeme kromatografiranja postavljeno na 20 min. Površine ispod krivulje korištene su za kvantifikaciju produkta.

HPLC-DAD analiza 7-hidroksikumarina

HPLC analiza provedena je primjenom kolone Luna C18 (2) dimenzije 150x4,6 mm, 3 µm. Temperatura kolone postavljena je na 25 °C. Korištena je gradijentna metoda (t [min]: 0, 1,5, 10, 11, 17; B [%]: 20, 20, 70, 20, 20) primjenom pokretne faze koja se sastojala od otapala A (voda/acetonitril/ledena octena kiselina = 90/10/0,1(v/v/v)) i B (voda/acetonitril/ledena octena kiselina = 10/90/0,1(v/v/v)) s brzinom protoka od 1,0 mL min^{-1}. Volumen injektiranja bio je 15 µL. Kromatogrami su zabilježeni na maksimumu apsorpcije λ = 330 nm. Vrijeme zadržavanja (t_R) marker supstrata (kumarina) bilo je 7,5–7,6 min, dok je t_R generiranog produkta (7-hidroksikumarina) iznosio 4,8–4,9 min te je ukupno vrijeme kromatografiranja postavljeno na 17 min. Površine ispod krivulje korištene su za kvantifikaciju produkta.

HPLC-DAD analiza dekstrorfana

HPLC analiza provedena je primjenom kolone Luna C18 (2) dimenzije 150x4,6 mm, 3 µm. Temperatura kolone postavljena je na 25 °C. Korištena je gradijentna metoda (t [min]: 0, 5, 10, 15; B [%]: 18, 18, 40, 18). Pokretna faza sastojala se od otapala A (0,01 M kalijev fosfatni pufer (pH = 3,4)) i B (acetonitril) s brzinom protoka od 1,0 mL min^{-1}. Volumen injektiranja bio je 15 µL. Kromatogrami su zabilježeni na λ = 224 nm i λ = 280 nm. Vrijeme zadržavanja (t_R) marker supstrata (dekstrometorfan) bilo je 6,0-6,1 min, dok je t_R generiranog produkta (dekstrorfan) iznosio 3,3-3,4 min. Ukupno vrijeme kromatografiranja postavljeno je na 15 min. Količina generiranog produkta određena je kao površina ispod krivulje, temeljena na kalibracijskoj krivulji standarda.

HPLC-DAD analiza 6α-hidroksipaklitaksela

HPLC analiza provedena je primjenom kolone Luna C18 (2) dimenzije 150x4,6 mm, 3 µm. Temperatura kolone postavljena je na 25 °C. Korištena je gradijentna metoda (t [min]: 0, 2, 10, 11, 17; B [%]: 50, 50, 90, 50, 50) primjenom pokretne faze koja se sastojala od otapala A (voda/acetonitril/ledena octena kiselina = 90/10/0,1(v/v/v)) i B (voda/acetonitril/ledena octena kiselina = 10/90/0,1(v/v/v)) s brzinom protoka od 1,0 mL min^{-1}. Volumen injektiranja bio je 15 µL. Kromatogrami su zabilježeni na λ = 227 nm. Vrijeme zadržavanja (t_R) marker

supstrata (paklitaksel) bilo je 5,4–6,2 min, dok je t_R generiranog produkta (6α-hidroksipaklitaksela) iznosio 3,3–3,5 min. Ukupno vrijeme kromatografiranja postavljeno je na 17 min. Površine ispod krivulje korištene su za kvantifikaciju produkta.

3.2.2. Određivanje tipa inhibicije

Inhibicija aktivnosti enzima citokrom P450 može se podijeliti u tri kategorije (inhibicija ovisna o metabolizmu (MBI), izravna reverzibilna inhibicija (DRI) te inhibicija ovisna o vremenu (TDI)). U svrhu određivanja tipa inhibicije, provedene su tri vrste eksperimenata:

1. MBI je određena predinkubacijom flavonoida s enzimom, uz dodatak NADPH generirajućeg sustava, nakon čega je dodan marker supstrat kako bi se odredila preostala aktivnost enzima.

2. DRI je određena bez prethodne inkubacije flavonoidom. U inkubacijsku smjesu, koja sadrži marker supstrat pojedinog enzima i ispitivani flavonoid, odmah je dodan sustav za generiranje.

3. TDI je određena prethodnom inkubacijom flavonoida i enzima, odnosno predinkubacije su provedene bez prisutnosti NADPH koenzima, kako bi razlikovali da li je inhibicija ovisna o metabolizmu bila rezultat vremenski ovisne inhibicije. S obzirom na to da TDI nije ovisna o NADPH kofaktoru, ostatna aktivnost određena je naknadnim dodavanjem istog uz supstrat. Na taj način nije došlo do redukcije hem željeza iz CYP3A4 (iz Fe^{3+} u Fe^{2+}), čime je dano dovoljno vremena da potencijalni inhibitor stupi u interakciju s enzimom.

3.2.3. Statistička obrada podataka

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija vrijednosti koje su dobivene s tri nezavisna eksperimenta (inkubacije su provedene u triplikatu). Rezultati se izražavaju kao ostatna aktivnost enzima, tj. postotak produkta dobivenog inkubacijom uz dodatak flavonoida, u odnosu na kontrolu bez flavonoida.

$$ostatna\ aktivnost\ (\%) = \frac{količina\ produkta}{količina\ produkta\ u\ kontroli\ bez\ flavonoida}$$

Svi statistički proračuni provedeni su pomoću računalnog programa Statistica 7.0. Statistička značajnost ispitana je Studentovim t-testom. *P* je mjera statističke značajnosti: vrijednosti *P* niže od 0,05 smatraju se značajnima, osim ako nije drugačije istaknuto.

3.2.4. Računalne metode

U svrhu utvrđivanja veze između fizikalnih ili strukturnih svojstava i nekog biološkog svojstva određenog skupa molekula, nužno je poznavanje odgovarajućih numeričkih, ordinalnih ili kategoričkih vrijednosti, odnosno deskriptora. U svrhu ispitivanja inhibicijskog učinka flavonoida na odabrane enzime CYP, koristili su se molekulski deskriptori izračunati u ovome radu te metoda klasifikacije koja pripada metodama strojnog i statističkog učenja (slučajna šuma). Iz cjelokupnog skupa molekulskih deskriptora, primjenom algoritma slučajne šume, izabrani su oni deskriptori koji određuju inhibicijski učinak flavonoida na pojedini enzim. Također je primijenjena i metoda molekularnog sidrenja (engl. *Molecular Docking*), kako bi se procijenila potencijalna vezna mjesta te najvjerojatnija konformacija kompleksa flavonoida i odabranih enzima CYP.

3.2.4.1. Molekulski deskriptori

Deskriptori se uglavnom generiraju primjenom cijelog niza računalnih metoda, pri čemu se generiraju molekulska svojstva koja se mogu primijeniti za određeni QSAR problem (Todeschini i sur., 2000., Debeljak 2006.).

Temeljem strukture flavonoida, nacrtane u programu ACD/ChemSketch, generirani su deskriptori supstituenata:

- volumen (V_s)
- masa (M_s)
- hidrofobna konstanta po Hanschu (π_s)

Pri izračunavanju topologijskih indeksa koristio se programski paket TAM (Vedrina i sur., 1997.) te su izračunati topologijski indeksi:

- Wienerov indeks, W(G)
- Balabanov indeks, J(G)
- Randićev indeks povezanosti, χ^{v}(G)
- Informacijsko-teorijski indeks, I(G)
- Schultzov indeks, *MTI*

U potrazi za energetski najpovoljnijim stanjem ispitivanog flavonoida, pretraživanje konformacijskog prostora provedeno je programima HyperChem 8.0 (Hypercube, Inc.) i GAMESS. Geometrijska minimizacija provedena je molekularno-mehanički (MM+) s Polak-Ribier-ovim algoritmom, u *in-vacuo* uvjetima s RMS gradijentom od 0,1 kcal/(A mol). Izračunati su kvantno-kemijski deskriptori:

- duljina veze (ID)
- red veze (BO)
- parcijalni naboji (PC) atoma i supstituenata
- energija najviše popunjene molekulske orbitale (E_{HOMO})
- energija najniže slobodne molekulske orbitale (E_{LUMO})
- ukupna energija (E_{T})
- dipolni moment (μ)

Koristili su se i:

- fizikalno-kemijski parametri: log$P$, (logP_{ACD}), gustoća (ρ), površinska napetost (η), entalpija isparavanja (ΔHv), temperatura vrelišta (TB) i tlak para (pV), preuzeti iz ACD/Labs-a
- topljivost (s) - EPI Suit (*chemspider.com*)
- izoelektrična točka (pI) i log$P$ (logP_{chem}) - mrežne aplikacije *chemicalize.org* i *chemspider.com*

Od ukupno 127 definiranih molekulskih deskriptora, njih 56 je korišteno za QSAR analizu s obzirom na relevantnost određenu korelacijom dviju varijabli, odnosno vrijednosti deskriptora (slika 17). Deskriptori su se odabrali temeljem korelacije vrijednosti deskriptora, pri čemu su, među parovima visokokoreliranih deskriptora, odabrani oni deskriptori čije je značenje lakše nedvosmisleno interpretirati (tablica 17). Na opisani način je odabran skup od 56 deskriptora.

3.2.4.2. Klasifikacijska analiza

Za razvoj QSAR modela koristio se algoritam slučajne šume (Breiman 2001., Liaw i sur., 2002.). Provedena je regresijska QSAR analiza temeljena na primjeni RF. Nakon toga provedena je klasifikacijska QSAR analiza („Inhibitori“ *vs* „Ne-inhibitori“) temeljena na primjeni RF u *R* programskom jeziku te su se primijenile sljedeće postavke:

- broj stabala koja tvore šumu (n_{tree} = 100)
- broj nasumično odabranih molekulskih deskriptora primijenjenih za rast pojedinačnog stabla u RF, postavljen na cjelobrojnu vrijednost drugog korijena broja molekulskih deskriptora ($mtry = \sqrt{56} = 7$)
- minimalna veličina terminalnih čvorova postavljena na 1 (*nodsize* = 1)
- uključeno je vaganje klasa (težina klase „Inhibitori“ je 100 000, a klase „Ne-inhibitori“ je 1)

Rezultat se bazira na odluci glasanja većine stabala.

Matematički model je razvijen na skupu od 56 deskriptora i 30 ispitivanih flavonoida, s obzirom na eksperimentalne rezultate inhibicije te izračunatu statističku značajnost. Za validaciju modela primijenjen je LOO (engl. *Leave-One-Out*) postupak križne validacije (*q*) (Molinaro i sur., 2005., Debeljak 2006., Hawkins i sur., 2003.).

Koeficijent korelacije (*r*) prikazan je uz statističku značajnost (*P*).

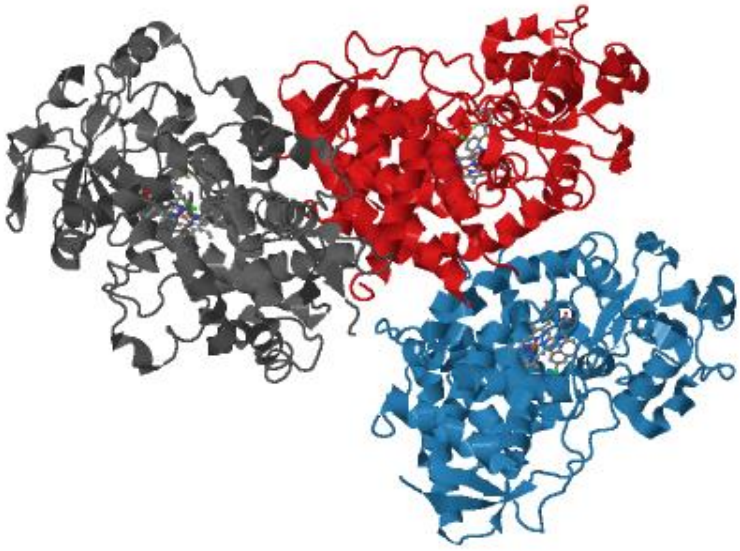
Kako bi se utvrdila povezanost učinka ispitanih flavonoida na sve ispitivane enzime CYP provedena je hijerarhijska tvorba klastera (Statistica 7.0). U istu svrhu je proveden Fisherov egzaktni test.

3.2.4.3. Predikcija inhibicije

CypRules Server predviđa inhibiciju enzima citokrom P450 (CYP) s obzirom na 2D, odnosno 3D strukture odabranih flavonoida (https://cyprules.cmdm.tw/). CypRules predviđa svoje rezultate primjenom C5.0 algoritma na temelju Mold2 2D deskriptora (Hong i sur., 2008.).

3.2.4.4. Molekularno sidrenje

Kako bi se ispitalo vezanje flavonoida u aktivnom mjestu enzima CYP3A4, koristili su se flavonoidi koji su pokazali statistički značajnu o metabolizmu ovisnu inhibiciju, kao posljedicu izravne reverzibilne inhibicije. Studije sidrenja provedene su koristeći program AutoDock 4.2.6. (Morris i sur., 2009.). Trodimenzijska koordinata ispitivanog enzima preuzeta je s RCSB stranice (kristalografska struktura enzima CYP3A4 oznake 5TE8 (Sevrioukova i sur., 2017.)), pri čemu je uzet B lanac zbog najkvalitetnije snimljene kristalografske strukture (slika 14). Ova kristalografska struktura je izabrana zbog sličnosti vezanog liganada (midazolam) s ispitivanim flavonoidima i zadovoljavajuće rezolucije (2,7 Å). Prije sidrenja flavonoida, kako bi se potvrdila pogodnost sustava i niže navedenih primijenjenih postavki, prvo se provelo sidrenje s ligandom iz kristalografske strukture.



Slika 14. Kristalografska struktura enzima CYP3A4 s vezanim midazolamom (CYP3A4 RCSB PDB ID: 5TE8, Sevrioukova i sur., 2017.) korištena prilikom studije molekularnog sidrenja flavonoida i enzima CYP3A4. A lanac prikazan je crvenom, B lanac plavom, a C lanac crnom bojom (preuzeto s https://www.rcsb.org/, 02.09.2019.).

Molekula enzima CYP3A4 pripremljena je za sidrenje protoniranjem cisteinskih, histidinskih, argininskih i lizinskih postraničnih lanca, dodavanjem vodikovih atoma koji su nedostajali, nabijanjem karboksi krajeva proteina te deprotoniranjem aspartatnih i glutamatnih postraničnih lanca. S obzirom na to da je u kristalografskoj strukturi, u blizini molekule midazolama, u aktivnom mjestu prisutna molekula vode (HOH 735), studija sidrenja provedena je s uklonjenim svim molekulama vode, uz iznimku HOH 735, kao i s uklonjenim svim molekulama vode (uključujući HOH 735).

Primjenom programskog paketa HyperChem 8.0 nacrtane su 3D strukture liganada (flavonoida) te minimizirane njihove početne geometrije, a njihov je naboj postavljen na specije koje su najzastupljenije pri pH 7,4, što je izračunato pomoću mrežne aplikacije *chemicalize.org*. Parcijalni naboji liganada su izračunati prema Ionescu i suradnicima (Ionescu i sur., 2015.). Pomoću AutoDock programa napravljena je mreža veličine 70 × 70 × 70 Å s razmakom između pojedinih točaka od 0,375 Å i središtem na atomu željeza hemske skupine koja je generirana pomoću AutoGrid programa (Morris i sur., 2009.). U postupku sidrenja primijenjen je lamarkijanski genetski algoritam (engl. *Lamarckian Genetic Algorithm*, LGA) (Huey i sur., 2007.). Molekula enzima tretirala se kao rigidna, dok je svim jednostrukim vezama liganada bila dozvoljena rotacija tijekom postupka simuliranog traženja globalnog minimuma koji je uključivao Monte Carlo postupak i simulirano aneliranje (engl. *Simulated Annealing*, SA). Sidrenje svih liganada provelo se 100 puta, s populacijom veličine 150, maksimalnim brojem procjena energije od 2,5 × 107, 27000 generacija, učestalošću mutacije od 0,02 te učestalošću krosovera od 0,080. Korijen srednje kvadratne devijacije (engl. *Root-Mean-Square-Deviation*, RMSD) od 2,0 Å uzet je kao kriterij za analizu grozdova rezultata sidrenja (s ciljem utvrđivanja jesu li dvije usidrene konformacije dovoljno slične da bi bile smatrane jednakima) i nekoliko takvih grozdova s najnižim energijama vezanja svakog liganda korišteno je za daljnje usporedbe (Bojić i sur., 2019.).

Kvaliteta sidrenja procjenjuje se na temelju sidrenja liganda iz kristalografske strukture. Stoga je potrebno za studiju molekularnog sidrenja odabrati onu kristalografsku strukturu s ligandom koji je najsličniji ligandima koji će se ispitivati (flavonoidi). Usporedbom konformacija liganada dobivenih sidrenjem te iz kristalografskih podataka, izračunava se RMSD, odnosno razlika u položaju.

Program AutoDock 4.2.6. koristi molekularno-mehanička polja sila, odnosno disperzijske, elektrostatske i desolvatacijske energije te vodikove veze za procjenu jačine

vezanja, a samim time i konstante inhibicije. Međutim, kao i u molekulskoj dinamici, takve su vrijednosti relativno neprecizne te se kao apsolutne vrijednosti ne bi trebale uzimati u obzir. Smatra se, ukoliko se radi o sličnim molekulama, da se molekule međusobno mogu uspoređivati. S obzirom na to da je cilj ovog dijela disertacije usporedba različitih konformacija, izbjegava se problem sličnosti, ali ipak je istaknute K_i vrijednosti potrebno koristiti samo za relativnu usporedbu.

4. REZULTATI

4.1. ISPITIVANJE INHIBICIJE ENZIMA CYP

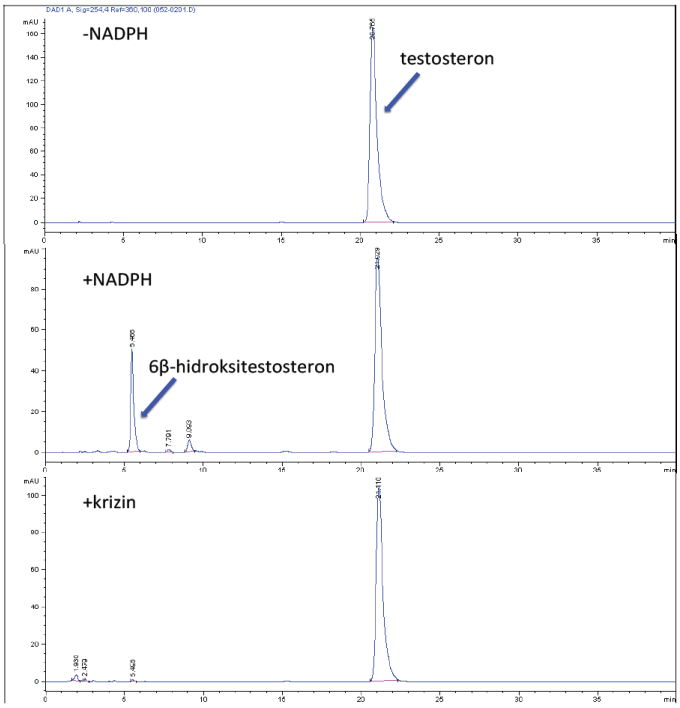
Za ispitivanje inhibicijskog potencijala flavonoida, na aktivnost odabranih enzima citokrom P450, primijenjene su ranije spomenute reakcije sa specifičnim marker supstratima za ispitivanje pojedinog enzima CYP.

Primjer tipičnog inhibitora enzima CYP3A4, krizina, prikazan je na slici 15. Pozitivna kontrola (inkubacija sa supstratom i NADPH generirajućim sustavom) pokazuje nastajanje 6β-hidroksitestosterona kao glavnog metabolita hidroksilacije testosterona. Negativna kontrola (inkubacija bez NADPH generirajućeg sustava) ne pokazuje nastanak istog produkta te se time potvrđuje da je 6β-hidroksitestosteron produkt karakteristične reakcije koji nastaje u prisutnosti CYP3A4. Kada se inkubacijskoj smjesi (koja sadrži supstrat i NADPH generirajući sustav) dodaje krizin kao karakteristični inhibitor, nastanak 6β-hidroksitestosterona je smanjen.

A)

B)

C)



Slika 15. Određivanje o metabolizmu ovisne inhibicije (s NADPH i predinkubacijom flavonoidom): A) negativna kontrola bez NADPH generirajućeg sustava; B) inkubacija s NADPH generirajućim sustavom, bez dodatka flavonoida; C) inkubacija s NADPH generirajućim sustavom uz dodatak 3 μM krizina.

Rezultati ispitivanja inhibicije izraženi su kao ostatna enzimska aktivnost ispitivanih enzima CYP. Za ispitivanje inhibicije enzima, ostatna aktivnost procijenjena je na temelju produkta marker reakcije, generirane praćenjem inkubacija uz dodatak flavonoida kao potencijalnog inhibitora, naspram inkubacija bez inhibitora. Sve inkubacije provedene su u triplikatu.

4.1.1. Ispitivanje i određivanje tipa inhibicije za citokrome P450

Određivanje o metabolizmu ovisne inhibicije uključuje predinkubaciju koja je potrebna za vremenski ovisnu inhibiciju, kao i inkubaciju flavonoida i marker supstrata istovremeno te se time određuje direktna i o vremenu ovisna inhibicija. U tablici 4 prikazani su rezultati za svih 30 ispitivanih flavonoida.

Tablica 4. Rezultati ispitivanja sva 3 tipa inhibicije enzima CYP3A4 (o metabolizmu ovisna inhibicija (MBI), izravna reverzibilna inhibicija (DRI), o vremenu ovisna inhibicija (TDI)) izraženi su kao ostatna enzimska aktivnost (%) u usporedbi s kontrolom bez dodatka flavonoida. *P* označava statističku značajnost.

CYP3A4													
Flavonoid	**MBI**	***P***	**DRI**	***P***	**TDI**	***P***	**Flavonoid**	**MBI**	***P***	**DRI**	***P***	**TDI**	***P***
Naringenin	65 ± 24	0,155	/	/	/	/	Tangeretin	42 ± 3	0,027	105 ± 6	0,25	119 ± 3	0,081
Flavanon	86 ± 46	0,361	/	/	/	/	Tektokrizin	102 ± 15	0,449	/	/	/	/
Hesperetin	49 ± 19	0,065	/	/	/	/	3,6-Dihidroksiflavon	100 ± 14	0,220	/	/	/	/
Pinocembrin-7-metileter	83 ± 2	0,147	/	/	/	/	3,7-Dihidroksiflavon	91 ± 27	0,375	/	/	/	/
Pinocembrin	50 ± 15	0,003	76 ± 33	0,276	102 ± 5	0,439	Galangin	48 ± 24	0,093	/	/	/	/
Sakuranetin	94 ± 45	0,439	/	/	/	/	Izoramnetin	73 ± 6	0,048	107 ± 14	0,277	122 ± 7	0,167
6-Hidroksiflavon	83 ± 14	0,220	/	/	/	/	Kempferol	101 ± 14	0,449	/	/	/	/
7-Hidroksiflavon	78 ± 14	0,172	/	/	/	/	Morin	122 ± 8	0,061	/	/	/	/
Apigenin	24 ± 3	0,013	35 ± 18	0,051	34 ± 27	0,005	Miricetin	133 ± 35	0,195	/	/	/	/
Krizin	17 ± 3	0,010	54 ± 23	0,044	45 ± 7	0,019	Kvercetin	126 ± 10	0,152	/	/	/	/
Krizin-dimetileter	61 ± 21	0,049	91 ± 18	0,108	108 ± 9	0,322	Ramnetin	117 ± 31	0,386	/	/	/	/
Diosmetin	172 ± 34	0,169	/	/	/	/	Tamariksetin	195 ± 29	0,023	/	/	/	/
Flavon	81 ± 16	0,087	/	/	/	/	Genistein	72 ± 24	0,179	/	/	/	/
Luteolin	112 ± 31	0,356	/	/	/	/	Prunetin	74 ± 14	0,149	/	/	/	/
Akacetin	5 ± 4	0,007	46 ± 6	0,005	57 ± 17	0,067	Katehin	98 ± 10	0,441	/	/	/	/

Daljnja ispitivanja inhibicije odabranih enzima provedena su s onim flavonoidima iz skupina flavanona, flavona i flavonola koji su se pokazali kao potencijalno potentni inhibitori, s obzirom na statističku značajnost u eksperimentu s CYP3A4 (P < 0,1). Rezultati su prikazani u tablici 5 i tablici 6.

Tablica 5. Rezultati ispitivanja sva 3 tipa inhibicije enzima CYP1A2 i CYP2A6 (o metabolizmu ovisna inhibicija (MBI), izravna reverzibilna inhibicija (DRI), o vremenu ovisna inhibicija (TDI)) izraženi su kao ostatna enzimska aktivnost (%) u usporedbi s kontrolom bez dodatka flavonoida. *P* označava statističku značajnost.

Flavonoid	**CYP1A2**						**CYP2A6**					
	MBI	***P***	**DRI**	***P***	**TDI**	***P***	**MBI**	***P***	**DRI**	***P***	**TDI**	***P***
Akacetin	44±46	0,337	/	/	/	/	65±54	0,521	/	/	/	/
Hesperetin	45±6	0,029	77±58	0,568	68±7	0,077	73±10	0,156	/	/	/	/
Pinocembrin	55±1	0,022	73±31	0,269	18±3	0,014	68±17	0,175	/	/	/	/
Apigenin	72±9	0,125	/	/	/	/	47±7	0,037	48±0	0,182	105±45	0,911
Krizin	18±4	0,004	23±6	0,001	1±1	0,011	104±13	0,805	/	/	/	/
Krizin-dimetileter	102±24	0,967	/	/	/	/	78±11	0,222	/	/	/	/
Flavon	66±12	0,148	/	/	/	/	81±4	0,255	/	/	/	/
Tangeretin	65±14	0,171	/	/	/	/	28±13	0,018	49±36	0,258	70±3	0,173
Galangin	61±20	0,225	/	/	/	/	47±6	0,039	48±22	0,138	125±3	0,205
Izoramnetin	79±1	0,049	60±33	0,161	8±1	0,012	29±3	0,025	59±3	0,223	116±48	0,223
Morin	39±6	0,025	58±42	0,216	12±3	0,012	54±20	0,115	/	/	/	/

Tablica 6. Rezultati ispitivanja sva 3 tipa inhibicije enzima CYP2D6 i CYP2C8 (o metabolizmu ovisna inhibicija (MBI), izravna reverzibilna inhibicija (DRI), o vremenu ovisna inhibicija (TDI)) izraženi su kao ostatna enzimska aktivnost (%) u usporedbi s kontrolom bez dodatka flavonoida. *P* označava statističku značajnost.

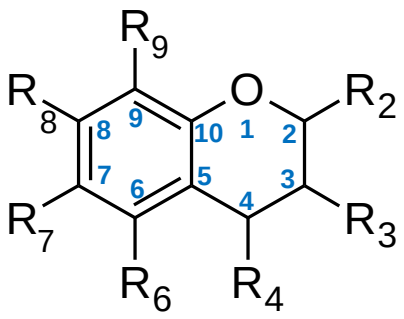
Flavonoid	**CYP2D6**						**CYP2C8**					
	MBI	***P***	**DRI**	***P***	**TDI**	***P***	**MBI**	***P***	**DRI**	***P***	**TDI**	***P***
Akacetin	143±23	0,208	/	/	/	/	112±5	0,545	/	/	/	/
Hesperetin	177±69	0,345	/	/	/	/	64±32	0,329	/	/	/	/
Pinocembrin	184±182	0,631	/	/	/	/	55±7	0,099	/	/	/	/
Apigenin	235±92	0,270	/	/	/	/	36±25	0,093	/	/	/	/
Krizin	40±12	0,130	/	/	/	/	26±7	0,037	53±4	0,153	132±18	0,112
Krizin-dimetileter	62±6	0,248	/	/	/	/	31±8	0,04	88±24	0,638	115±12	0,339
Flavon	43±19	0,110	/	/	/	/	49±33	0,219	/	/	/	/
Tangeretin	32±5	0,141	/	/	/	/	58±4	0,12	/	/	/	/
Galangin	65±43	0,325	/	/	/	/	30±13	0,033	107±35	0,832	88±29	0,585
Izoramnetin	225±57	0,160	/	/	/	/	43±17	0,067	/	/	/	/
Morin	104±51	0,927	/	/	/	/	119±26	0,503	/	/	/	/

4.2. MOLEKULSKI DESKRIPTORI I QSAR

U svrhu ispitivanja inhibicijskog učinka flavonoida na odabrane enzime CYP, koristili su se izračunati molekulski deskriptori te metode predviđanja koje pripadaju metodama strojnog i statističkog učenja.

4.2.1. Izračunavanje i odabir molekulskih deskriptora

Za postavljanje QSAR modela generirano je ukupno 127 molekulskih deskriptora te je korišten skup od 30 flavonoida. Pregled vrijednosti svih deskriptora koji opisuju flavonoide iz ove studije, nalazi se u tablicama 7-16.



Slika 16. Osnovni kostur flavonoida korišten za QSAR analizu s naznačenim supstituentima.

Tablica 7. Vrijednosti fizikalno-kemijskih deskriptora za 30 ispitivanih flavonoida.

Deskriptor / Flavonoid	$\log P_{ACD}$	ρ	η	T_F	ΔHv	T_B	s	$\log P_{chem}$
3,6–diOH–flavon	3,64	1,5	72,7	186,2	78,05	477,1	107,320	2,42
3,7–diOH–flavon	3,27	1,5	72,7	186,2	78,05	477,1	107,320	2,42
6–OH–flavon	3,72	1,3	58,2	176,3	73,62	450,1	100,560	2,66
7–OH–flavon	3,32	1,3	58,2	176,3	73,62	450,1	100,560	2,66
akacetin	3,15	1,4	63,4	198,2	82,10	518,6	326,280	2,85
apigenin	2,10	1,5	79,5	217,0	86,81	555,5	412,010	2,71
diosmetin	3,10	1,5	72,8	220,3	89,55	576,7	215,420	2,55
flavanon	3,62	1,2	46,1	181,9	63,50	386,2	19,785	3,10
flavon	3,56	1,2	49,5	171,1	61,35	367,0	3,300	2,97
galangin	2,83	1,6	84,9	202,0	82,11	518,6	659,180	2,76
genistein	2,96	1,5	79,5	217,1	86,81	555,5	412,010	3,08
hesperetin	2,90	1,4	67,4	223,0	90,79	586,2	1288,400	2,68
izoramnetin	1,76	1,6	88,3	227,8	92,53	599,4	226,890	2,30
kempferol	2,05	1,7	98,9	226,1	90,30	582,1	436,410	2,46
krizin	2,88	1,4	68,2	192,5	78,76	491,9	620,150	3,01
krizin-dimetileter	3,27	1,2	46,3	213,4	74,03	476,6	0,928	2,65
kvercetin	2,08	1,8	114,8	248,1	98,26	642,4	288,020	2,16
luteolin	2,40	1,7	92,5	239,5	94,73	616,1	272,770	2,40
miricetin	2,11	1,9	133,0	285,9	114,40	747,6	189,550	1,85
morin	1,61	1,8	114,9	249,3	98,70	645,5	288,020	2,16
naringenin	3,19	1,5	72,9	224,7	89,70	557,5	2466,000	2,84
pinocembrin	3,93	1,4	62,7	199,3	81,16	511,1	3713,500	3,14
pinocembrin–7–metileter	4,11	1,3	51,4	188,8	79,13	494,9	318,940	3,28
prunetin	3,53	1,4	63,4	209,7	85,64	546,5	326,280	3,22
ramnetin	2,58	1,6	88,3	238,9	97,68	627,9	226,890	2,30
sakuranetin	3,37	1,4	59,0	212,4	86,90	555,9	1952,200	2,98
tamariksetin	2,42	1,6	88,3	228,8	92,80	601,8	226,890	2,30
tangeretin	2,66	1,2	43,5	248,4	84,92	565,3	0,128	2,18
tektokrizin	3,13	1,3	55,1	186,8	78,20	487,4	53,285	3,16
katehin	0,49	1,6	88,1	335,0	98,00	630,4	4671,100	1,80

$\log P_{ACD}$ – $\log P$ preuzet iz ACD/Labs
ρ – gustoća
η – površinska napetost
T_F – temperatura plamišta
ΔH_v – entalpija isparavanja
T_B – temperatura vrelišta
s – topljivost
$\log P_{chem}$ – $\log P$ preuzet s *chemicalize.org*

Tablica 8. Vrijednosti steričkih i geometrijskih deskriptora za 30 ispitivanih flavonoida.

Deskriptor / Flavonoid	COSMO-A	COSMO-V	PSA	SASA	M_r	A_{max}	A_{min}	E_D	V_W	z_{max}	z_{min}
3,6–diOH–flavon	261	280	67	316	254,2	75,6	32,6	48,9	213,54	6,49	14,15
3,7–diOH–flavon	261	279	67	316	254,2	76,0	33,8	48,9	213,55	7,00	13,50
6–OH–flavon	256	271	47	305	238,2	73,3	32,9	46,3	205,13	6,47	14,15
7–OH–flavon	255	270	47	305	238,2	73,8	33,6	46,2	204,99	6,97	13,50
akacetin	292	314	76	364	284,3	84,2	37,2	54,2	239,68	5,83	15,48
apigenin	273	293	87	327	270,2	78,1	37,7	51,2	222,01	6,11	13,90
diosmetin	302	324	96	374	300,3	86,4	36,3	56,7	248,00	6,42	15,62
flavanon	250	266	26	318	224,3	72,0	34,9	43,6	203,54	5,52	13,53
flavon	245	258	26	294	222,2	71,3	32,6	44,1	196,54	6,46	13,37
galangin	269	289	87	326	270,2	77,6	34,7	51,8	222,11	7,00	13,51
genistein	269	290	87	325	270,2	78,5	34,9	53,5	222,17	5,64	14,89
hesperetin	302	329	96	398	302,3	86,2	40,8	56,4	255,02	8,08	15,44
izoramnetin	305	331	116	384	316,3	90,6	37,7	58,4	256,42	6,03	14,29
kempferol	279	302	107	337	286,2	79,5	38,5	53,9	230,54	6,10	13,89
krizin	262	279	67	315	254,2	75,0	34,8	49,1	213,53	7,55	13,51
krizin-dimetileter	301	324	45	389	289,3	84,4	41,6	56,7	248,73	6,82	13,83
kvercetin	287	310	127	348	302,2	81,9	38,4	56,1	238,98	6,48	14,27
luteolin	282	303	107	337	286,2	80,0	38,5	53,4	230,45	6,77	14,27
miricetin	297	322	148	359	318,2	84,3	41,2	58,1	247,57	6,38	14,27
morin	285	312	127	348	302,2	82,2	37,8	56,2	239,02	6,72	14,30
naringenin	271	300	87	351	272,3	78,3	36,7	50,6	229,07	5,71	13,85
pinocembrin	266	287	67	339	256,3	75,8	36,9	48,6	220,51	5,97	13,19
pinocembrin–7–metileter	285	309	377	377	270,3	72,4	45,1	55,5	238,41	7,92	13,43
prunetin	288	311	76	362	284,3	83,6	35,5	57,2	239,71	6,60	16,06
ramnetin	305	332	116	385	316,3	84,2	42,7	59,7	256,49	7,49	14,48
sakuranetin	296	322	76	388	286,3	84,4	40,8	54,2	246,60	5,66	14,21
tamariksetin	307	333	116	385	316,3	87,8	36,3	59,5	256,56	6,43	15,62
tangeretin	370	424	72	532	372,4	104	54,5	72,4	327,02	6,59	17,20
tektokrizin	282	302	56	352	268,3	78,9	39,6	52,6	231,16	7,27	13,83
katehin	289	317	110	373	290,3	82,8	40,9	55,3	243,90	6,18	13,10

COSMO-A – površina dostupna otapalu prema COSMO modelu*
COSMO-V – volumen dostupan otapalu prema COSMO modelu*
PSA – polarna površina
SASA – površina molekule dostupna otapalu
M_r – relativna molekulska masa
A_{max} – maksimalna projekcijska površina
A_{min} – minimalna projekcijska površina
E_D – Dreidingova energija
V_W – van der Walsov volumen
z_{max} – z-vrijednost maksimalne projekcijske površine
z_{min}– z-vrijednost minimalne projekcijske površine

*COSMO model (engl. *COnductor-like Screening MOdel*)

Tablica 9. Vrijednosti 0D-deskriptora, deskriptora vodikove veze i indeksa fleksibilnosti za 30 ispitivanih flavonoida.

Flavonoid \ Deskriptor	AC	BC	CAC	CBC	ArRC	AlAC	AlBC	HBA	HBD	B_{FR}
3,6–diOH–flavon	29	31	3	4	3	3	4	4	2	1
3,7–diOH–flavon	29	31	3	4	3	3	4	4	2	1
6–OH–flavon	28	30	2	3	3	2	3	3	1	1
7–OH–flavon	28	30	2	3	3	2	3	3	1	1
akacetin	33	35	5	6	3	5	6	5	2	2
apigenin	30	32	4	5	3	4	5	5	3	1
diosmetin	34	36	6	7	3	6	7	6	3	2
flavanon	29	31	1	2	2	5	7	2	0	1
flavon	27	29	1	2	3	1	2	2	0	1
galangin	30	32	4	5	3	4	5	5	3	1
genistein	30	32	4	5	3	4	5	5	3	1
hesperetin	36	38	6	7	2	10	12	6	3	2
izoramnetin	35	37	7	8	3	7	8	7	4	2
kempferol	31	33	5	6	3	5	6	6	4	1
krizin	29	31	3	4	3	3	4	4	2	1
krizin-dimetileter	35	37	5	6	3	5	6	4	0	3
kvercetin	32	34	6	7	3	3	6	7	5	1
luteolin	31	33	5	6	3	5	6	6	4	1
miricetin	33	35	7	8	3	7	8	8	6	1
morin	32	34	6	7	3	6	7	7	5	1
naringenin	32	34	4	5	2	8	10	5	3	1
pinocembrin	31	33	3	4	2	7	9	4	2	1
pinocembrin–7–metileter	34	36	4	5	2	8	10	4	1	2
prunetin	33	35	5	6	3	5	6	5	2	2
ramnetin	35	37	7	8	3	7	8	7	4	2
sakuranetin	35	37	5	6	2	9	11	5	2	2
tamariksetin	35	37	7	8	3	7	8	7	4	2
tangeretin	47	49	11	12	3	11	12	7	0	6
tektokrizin	32	34	4	5	3	4	5	4	1	2
katehin	35	37	5	6	2	9	11	6	5	1

AC – broja atoma
BC – broj veza
CAC – broj atoma u lancu
CBC – broj veza u lancu
ArRC – broj aromatskih prstenova
AlAC – broj atoma u alifatskim vezama
AlBC – broj alifatskih veza
HBA – broj akceptora vodikove veze
HBD – broj donora vodikove veze
B_{FR} – broj slobodnih rotirajućih veza

Tablica 10. Vrijednosti elektronskih i kvantno-kemijskih molekulskih deskriptora za 30 ispitivanih flavonoida.

Deskriptor / Flavonoid	MR_{ACD}	MR_{chem}	n	V_M	P_M	E_T	E_π	E_{HOMO}	E_{LUMO}	μ
3,6–diOH–flavon	67,7	70,9	1,713	172,6	26,49	-3338	35,83	-8,82	-0,97	1,64
3,7–diOH–flavon	67,7	70,9	1,713	172,6	26,49	-3338	35,84	-8,86	-0,87	2,14
6–OH–flavon	66,1	68,9	1,666	177,7	25,87	-3018	31,52	-9,06	-0,84	3,00
7–OH–flavon	66,1	68,9	1,666	177,7	25,87	-3018	31,54	-9,37	-0,78	2,40
akacetin	74,6	77,4	1,669	200,1	29,01	-3813	40,18	-9,03	-0,66	3,80
apigenin	69,9	72,9	1,732	174,6	27,11	-3659	40,18	-9,07	-0,68	1,81
diosmetin	76,5	79,3	1,697	198,6	29,65	-4134	44,48	-8,89	-0,74	3,06
flavanon	64,6	65,3	1,603	187,9	25,45	-2725	24,08	-9,36	-0,45	2,09
flavon	64,2	66,9	1,635	179,2	25,28	-2697	27,22	-9,30	-0,77	3,56
galangin	69,6	72,9	1,748	171,1	27,12	-3659	40,16	-8,81	-0,77	3,39
genistein	69,9	71,7	1,732	174,5	27,11	-3659	40,11	-8,80	-0,70	1,26
hesperetin	76,9	77,8	1,665	207,2	29,84	-4163	41,34	-8,89	-0,44	3,46
izoramnetin	78,1	81,3	1,741	193,5	30,13	-4455	48,78	-8,62	-0,78	1,86
kempferol	71,4	74,9	1,785	169,5	27,76	-3979	44,48	-8,64	-0,77	2,43
krizin	68,0	70,9	1,699	176,1	26,48	-3338	35,86	-9,28	-0,91	5,15
krizin-dimetileter	77,6	79,9	1,598	227,2	30,30	-3649	35,86	-9,13	-0,62	4,18
kvercetin	73,3	78,9	1,823	167,9	28,42	-4300	48,78	-8,76	-1,08	1,49
luteolin	71,7	74,9	1,768	172,9	27,75	-3979	44,48	-9,06	-0,78	3,45
miricetin	75,2	78,8	1,864	166,4	29,09	-4620	53,09	-8,70	-0,88	1,66
morin	73,3	76,8	1,823	168	28,42	-4300	48,80	-8,72	-0,86	3,68
naringenin	70,3	71,3	1,693	183,3	27,29	-3687	37,04	-9,24	-0,35	1,75
pinocembrin	68,4	69,3	1,662	184,8	26,66	-3367	32,73	-9,31	-0,58	3,91
pinocembrin–7–metileter	73,2	73,8	1,612	210,4	28,57	-3522	32,73	-9,21	-0,52	4,11
prunetin	74,6	76,2	1,669	200,1	29,01	-3814	40,11	-8,76	-0,64	1,85
ramnetin	78,1	81,3	1,741	193,5	30,31	-4455	48,78	-8,67	-1,01	1,90
sakuranetin	75,0	75,8	1,638	208,8	29,19	-3842	37,04	-9,21	-0,33	3,22
tamariksetin	78,1	81,3	1,741	193,5	30,31	-4455	48,78	-8,52	-0,81	4,37
tangeretin	97,6	99,3	1,566	299,2	37,90	-5076	48,77	-8,85	-0,64	3,70
tektokrizin	72,8	75,4	1,641	201,7	28,39	-3493	35,86	-9,21	-0,66	4,80
katehin	73,6	74,0	1,742	182,2	28,42	-4036	71,73	-8,78	0,201	2,57

MR_{ACD} – molarna refraktivnost preuzeta iz ACD/Labs
MR_{chem} – molarna refraktivnost preuzeta iz *chemicalize.org*
n – indeks loma
V_M – molarni volumen
P_M – molarna polarizabilnost
E_T – ukupna energija molekule
E_π – Hückelova energija molekulskih orbitala
E_{HOMO} – energija najviše popunjene molekulske orbitale
E_{LUMO} – energija najniže slobodne molekulske orbitale
μ – dipolni moment

Tablica 11. Vrijednosti orbitalnih elektronegativnosti (χ) za 30 ispitivanih flavonoida.

Deskriptor / Flavonoid	χ (O1)	χ (C2)	χ (C3)	χ (C4)	χ (C5)	χ (C6)	χ (C7)	χ (C8)	χ (C9)	χ (C10)	χ (R2)	χ (R3)	χ (R4)	χ (R6)	χ (R8)
3,6–diOH–flavon	11,78	9,10	9,42	9,85	9,07	9,00	8,84	8,79	8,79	9,09	8,56	10,92	13,26	0,00	0,00
3,7–diOH–flavon	11,82	9,10	9,42	9,80	8,85	8,84	8,56	9,07	8,95	9,31	8,56	10,92	13,25	0,00	10,65
6–OH–flavon	11,66	8,87	9,45	9,64	9,04	8,96	8,82	8,75	8,77	9,05	8,53	0,00	13,06	0,00	0,00
7–OH–flavon	11,70	8,87	9,45	9,59	8,82	8,79	8,54	9,02	8,93	9,26	8,53	0,00	13,05	0,00	10,64
akacetin	11,72	8,85	9,47	9,68	9,03	9,29	8,78	9,09	8,80	9,32	8,43	0,00	13,08	10,73	10,66
apigenin	11,72	8,85	9,47	9,68	9,03	9,29	8,78	9,09	8,80	9,32	8,42	0,00	13,08	10,73	10,66
diosmetin	11,72	8,87	9,47	9,68	9,03	9,29	8,78	9,09	8,80	9,32	8,50	0,00	13,08	10,73	10,66
flavanon	10,89	8,88	8,37	9,80	8,87	8,68	8,23	8,48	8,62	9,14	8,40	0,00	13,06	0,00	0,00
flavon	11,68	8,87	9,45	9,62	8,94	8,69	8,28	8,48	8,68	9,17	8,53	0,00	13,05	0,00	0,00
galangin	11,84	9,11	9,44	9,89	9,06	9,34	8,79	9,13	8,82	9,37	8,56	10,92	13,29	10,74	10,67
genistein	11,65	8,96	9,24	9,70	9,03	9,30	8,77	9,09	8,80	9,33	0,00	8,35	13,13	10,73	10,66
hesperetin	10,93	8,88	8,37	9,88	8,96	9,28	8,73	9,09	8,74	9,29	8,37	0,00	13,10	10,72	10,66
izoramnetin	11,84	9,10	9,44	9,89	9,06	9,34	8,79	9,13	8,82	9,37	8,52	10,92	13,29	10,74	10,67
kempferol	11,84	9,08	9,44	9,89	9,06	9,34	8,79	9,13	8,82	9,37	8,44	10,92	13,29	10,74	10,67
krizin	11,72	8,87	9,47	9,68	9,03	9,29	8,78	9,09	8,80	9,32	8,53	0,00	13,08	10,73	10,66
krizin-dimetileter	11,72	8,87	9,47	9,69	9,06	9,31	8,81	9,10	8,82	9,33	8,53	0,00	13,06	10,84	10,77
kvercetin	11,84	9,10	9,44	9,89	9,06	9,34	8,79	9,13	8,82	9,37	8,52	10,92	13,29	10,74	10,67
luteolin	11,72	8,86	9,47	9,68	9,03	9,29	8,78	9,09	8,80	9,32	8,50	0,00	13,08	10,73	10,66
miricetin	11,84	9,12	9,44	9,89	9,06	9,34	8,79	9,13	8,82	9,37	8,59	10,92	13,29	10,74	10,67
morin	11,84	9,18	9,46	9,89	9,06	9,34	8,79	9,13	8,82	9,37	8,67	10,92	13,29	10,74	10,67
naringenin	10,93	8,88	8,37	9,88	8,96	9,28	8,73	9,09	8,74	9,29	2,29	0,00	13,10	10,72	10,66
pinocembrin	10,93	8,88	8,37	9,88	8,96	9,28	8,73	9,09	8,74	9,29	8,40	0,00	13,10	10,72	10,66
pinocembrin–7–metileter	10,93	8,88	8,37	9,88	8,97	9,28	8,75	9,10	8,76	9,30	8,40	0,00	13,10	10,72	10,76
prunetin	11,65	8,96	9,24	9,70	9,04	9,30	8,79	9,11	8,81	9,33	0,00	8,35	13,13	10,73	10,77
ramnetin	11,84	9,10	9,44	9,89	9,07	9,34	8,81	9,14	8,83	9,37	8,52	10,92	13,29	10,74	10,77
sakuranetin	10,93	8,88	8,37	9,88	8,97	9,28	8,75	9,10	8,76	9,30	8,29	0,00	13,10	10,72	10,76
tamariksetin	11,84	9,10	9,44	9,89	9,06	9,34	8,79	9,13	8,82	9,37	8,53	10,92	13,29	10,74	10,67
tangeretin	11,79	8,86	9,48	9,73	9,21	9,40	9,36	9,55	9,37	9,42	8,43	0,00	13,06	10,93	11,01
tektokrizin	11,72	8,87	9,47	9,68	9,04	9,29	8,79	9,10	8,82	9,33	8,53	0,00	13,08	10,73	10,77
katehin	10,87	9,07	8,81	8,38	8,69	8,91	8,63	8,87	8,64	8,92	8,38	9,36	0,00	10,64	10,62

Tablica 12. Vrijednosti topoloških indeksa za 30 ispitivanih flavonoida.

Deskriptor / Flavonoid	*F*(G)	*X*(G)	*J*(G)	*H*(G)	*W*(G)	*WW*(G)	*Wp*(G)	*Sz*(G)
3,6–diOH–flavon	60	9,16	1,62	63,66	662	1976	32	1280
3,7–diOH–flavon	60	9,16	1,63	63,70	658	1938	32	1268
6–OH–flavon	56	8,74	1,63	58,03	591	1782	28	1153
7–OH–flavon	56	8,74	1,64	58,09	586	1737	28	1138
akacetin	66	10,08	1,41	72,73	926	3169	35	1728
apigenin	64	9,54	1,50	67,99	788	2526	33	155
diosmetin	70	10,49	1,64	77,86	1038	3587	38	1919
flavanon	52	8,34	1,37	53,38	500	1432	26	984
flavon	52	8,34	1,37	53,38	500	1432	26	985
galangin	64	9,58	1,59	69,17	747	2237	35	1430
genistein	64	9,56	1,52	68,32	781	2492	34	1479
hesperetin	70	10,49	1,64	77,86	1038	3587	38	1919
izoramnetin	74	10,92	1,66	84,33	1122	3764	42	2064
kempferol	68	9,97	1,50	73,94	872	2770	37	1650
krizin	60	9,15	1,60	63,36	670	2021	31	1292
krizin-dimetileter	64	10,22	1,47	72,92	888	2853	35	1654
kvercetin	72	10,38	1,74	79,35	986	3199	40	1846
luteolin	68	9,95	1,45	73,24	896	2934	36	1686
miricetin	76	10,79	1,69	85,02	1104	3638	43	2048
morin	72	10,38	7,76	79,70	973	3107	40	1820
naringenin	64	9,54	1,50	67,99	788	2526	33	1500
pinocembrin	60	9,15	1,60	63,36	670	2021	31	1292
pinocembrin–7–metileter	62	9,69	1,52	67,96	779	2445	33	1472
prunetin	66	10,10	1,44	72,92	908	3051	36	1698
ramnetin	74	10,92	1,66	84,27	1124	3780	42	2074
sakuranetin	66	10,08	1,43	72,68	908	3016	35	1698
tamariksetin	74	10,92	1,64	84,10	1136	3888	42	2092
tangeretin	82	13,09	1,73	106,36	1738	6462	51	3088
tektokrizin	62	9,69	1,52	67,96	779	2445	33	1472
katehin	68	9,95	1,45	73,26	894	2918	36	1682

F(G) – Plattov indeks
X(G) – Randićev indeks
J(G) – Balabanov indeks
H(G) – Hararyjev indeks
W(G) – Wienerov indeks
WW(G) – hiper-Wienerov indeks
Wp(G) – Wienerov indeks polarnosti
Sz(G) – Szeged indeks

Tablica 13. Vrijednosti volumena (V_s), hidrofobnih konstanti (π_s) i relativnih masa (M_s) supstituenata za 30 ispitivanih flavonoida.

Flavonoid \ Deskriptor	V_s(R2)	π_s(R2)	M_s(R2)	V_s(R3)	π_s(R3)	M_s(R3)	V_s(R6)	π_s(R6)	M_s(R6)	V_s(R8)	π_s(R8)	M_s(R8)
3,6–diOH–flavon	80,88	1,76	25,73	11,79	-0,74	2,56	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
3,7–diOH–flavon	80,88	1,76	25,73	11,79	-0,74	2,56	0,00	0,00	0,00	11,79	-0,74	2,56
6–OH–flavon	80,88	1,76	25,73	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
7–OH–flavon	80,88	1,76	25,73	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	11,79	-0,74	2,56
akacetin	103,61	1,57	32,09	0,00	0,00	0,00	11,79	-0,74	2,56	11,79	-0,74	2,56
apigenin	78,26	0,98	27,25	0,00	0,00	0,00	11,79	-0,74	2,56	11,79	-0,74	2,56
diosmetin	100,86	0,61	33,62	0,00	0,00	0,00	11,79	-0,74	2,56	11,79	-0,74	2,56
flavanon	80,88	1,76	25,73	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
flavon	80,88	1,76	25,73	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
galangin	80,88	1,76	25,73	11,79	-0,74	2,56	11,79	-0,74	2,56	11,79	-0,74	2,56
genistein	0,00	0,00	0,00	78,26	0,98	27,25	11,79	-0,74	2,56	11,79	-0,74	2,56
hesperetin	100,86	0,61	33,62	0,00	0,00	0,00	11,79	-0,74	2,56	11,79	-0,74	2,56
izoramnetin	100,86	0,53	33,62	11,79	-0,74	2,56	11,79	-0,74	2,56	11,79	-0,74	2,56
kempferol	75,57	0,37	28,78	11,79	-0,74	2,56	11,79	-0,74	2,56	11,79	-0,74	2,56
krizin	80,88	1,76	25,73	0,00	0,00	0,00	11,79	-0,74	2,56	11,79	-0,74	2,56
krizin-dimetileter	80,88	1,76	25,73	0,00	0,00	0,00	37,15	-0,09	7,40	37,15	-0,09	7,40
kvercetin	75,57	0,37	28,78	11,79	-0,74	2,56	11,79	-0,74	2,56	11,79	-0,74	2,56
luteolin	75,57	0,37	28,78	0,00	0,00	0,00	11,79	-0,74	2,56	11,79	-0,74	2,56
miricetin	70,26	-1,02	31,83	11,79	-0,74	2,56	11,79	-0,74	2,56	11,79	-0,74	2,56
morin	75,57	0,37	28,78	11,79	-0,74	2,56	11,79	-0,74	2,56	11,79	-0,74	2,56
naringenin	75,57	0,37	28,78	0,00	0,00	0,00	11,79	-0,74	2,56	11,79	-0,74	2,56
pinocembrin	80,88	1,76	25,73	0,00	0,00	0,00	11,79	-0,74	2,56	11,79	-0,74	2,56
pinocembrin–7–metileter	80,88	1,76	25,73	0,00	0,00	0,00	11,79	-0,74	2,56	37,15	-0,09	7,40
prunetin	0,00	0,00	0,00	78,26	0,98	27,25	11,79	-0,74	2,56	37,15	-0,09	7,40
ramnetin	75,57	0,37	28,78	11,79	-0,74	2,56	11,79	-0,74	2,56	11,79	-0,74	2,56
sakuranetin	75,57	0,37	28,78	0,00	0,00	0,00	11,79	-0,74	2,56	37,15	-0,09	7,40
tamariksetin	100,86	0,61	33,62	11,79	-0,74	2,56	11,79	-0,74	2,56	11,79	-0,74	2,56
tangeretin	103,61	1,57	32,09	0,00	0,00	0,00	37,15	-0,09	7,40	37,15	-0,09	7,40
tektokrizin	80,88	1,76	25,73	0,00	0,00	0,00	11,79	-0,74	2,56	37,15	-0,09	7,40
katehin	75,57	0,37	28,78	11,79	-0,74	2,56	11,79	-0,74	2,56	11,79	-0,74	2,56

Tablica 14. Vrijednosti redova veza (BO) za 30 ispitivanih flavonoida.

Deskriptor / Flavonoid	BO(O1-C2)	BO(C2-C3)	BO(C3-C4)	BO(C4-C5)	BO(C5-C6)	BO(C6-C7)	BO(C7-C8)	BO(C8-C9)	BO(C9-C10)	BO(C10-O1)	BO(C2-R2)	BO(C3-R3)	BO(C4-R4)	BO(C6-R6)	BO(C7-R7)	BO(C8-R8)	BO(C9-R9)	BO(C5-C10)
3,6–diOH–flavon	1,029	1,649	0,959	0,977	1,321	1,428	1,288	1,498	1,297	1,041	1,002	1,051	1,816	0,939	1,057	0,941	0,941	1,357
3,7–diOH–flavon	1,019	1,659	0,953	0,989	1,319	1,490	1,286	1,392	1,337	1,056	1,003	1,053	1,811	0,940	0,945	1,080	0,938	1,317
6–OH–flavon	1,048	1,723	0,992	0,953	1,343	1,411	1,303	1,483	1,314	1,024	0,996	0,938	1,837	0,938	1,057	0,942	0,942	1,360
7–OH–flavon	1,035	1,736	0,986	0,963	1,338	1,473	1,302	1,383	1,349	1,038	0,996	0,938	1,833	0,940	0,945	1,075	0,938	1,327
akacetin	1,024	1,746	0,974	0,964	1,269	1,371	1,331	1,355	1,345	1,046	1,000	0,938	1,854	1,109	0,941	1,082	0,941	1,330
apigenin	1,025	1,745	0,975	0,963	1,281	1,363	1,323	1,362	1,354	1,045	1,000	0,938	1,853	1,109	0,944	1,082	0,938	1,318
diosmetin	1,023	1,750	0,972	0,964	1,269	1,371	1,332	1,354	1,346	1,045	0,998	0,938	1,855	1,110	0,941	1,082	0,941	1,330
flavanon	0,941	0,959	0,933	0,959	1,358	1,445	1,383	1,442	1,344	1,050	0,967	0,956	1,886	0,942	0,948	0,948	0,944	1,327
flavon	1,039	1,731	0,987	0,957	1,344	1,461	1,369	1,458	1,330	1,030	0,996	0,938	1,838	0,941	0,948	0,947	0,944	1,347
galangin	1,009	1,671	0,938	0,992	1,255	1,382	1,320	1,358	1,339	1,065	1,002	1,058	1,833	1,111	0,940	1,087	0,940	1,312
genistein	1,069	1,727	0,972	0,991	1,266	1,356	1,346	1,330	1,388	1,034	0,916	1,006	1,791	1,122	0,940	1,086	0,937	1,290
hesperetin	0,936	0,960	0,926	0,965	1,298	1,347	1,334	1,346	1,371	1,064	0,967	0,956	1,897	1,107	0,944	1,083	0,938	1,291
izoramnetin	1,011	1,669	0,939	0,992	1,255	1,382	1,319	1,358	1,340	1,065	1,003	1,056	1,832	1,110	0,940	1,087	0,940	1,311
kempferol	1,009	1,668	0,940	0,991	1,256	1,382	1,320	1,358	1,339	1,064	1,006	1,055	1,832	1,111	0,940	1,087	0,940	1,313
krizin	1,036	1,729	0,996	0,989	1,256	1,363	1,352	1,326	1,374	1,041	0,997	0,937	1,785	1,121	0,937	1,084	0,941	1,304
krizin-dimetileter	1,026	1,750	0,972	0,967	1,252	1,390	1,313	1,371	1,332	1,042	0,996	0,938	1,852	1,085	0,9401	1,058	0,940	1,344
kvercetin	1,022	1,652	0,964	1,019	1,239	1,376	1,339	1,329	1,368	1,058	1,007	1,052	1,760	1,122	0,937	1,090	0,940	1,288
luteolin	1,025	1,750	0,972	0,965	1,269	1,372	1,331	1,354	1,347	1,045	0,997	0,938	1,855	1,109	0,941	1,083	0,941	1,328
miricetin	1,012	1,671	0,936	0,994	1,254	1,383	1,319	1,357	1,342	1,064	1,003	1,057	1,834	1,111	0,940	1,088	0,940	1,311
morin	0,999	1,676	0,937	0,990	1,256	1,379	1,323	1,353	1,345	1,055	1,002	1,059	0,064	1,112	0,940	1,089	0,940	1,314
naringenin	0,934	0,969	0,926	0,971	1,287	1,357	1,342	1,340	1,362	1,064	0,963	0,957	0,057	1,010	0,941	1,083	0,942	1,298
pinocembrin	0,938	0,960	0,938	0,994	1,271	1,348	1,366	1,307	1,396	1,062	0,967	0,955	1,832	1,119	0,938	1,085	0,941	1,271
pinocembrin–7–metileter	0,938	0,960	0,938	0,995	1,265	1,358	1,354	1,317	1,389	1,060	0,967	0,955	1,831	1,115	0,938	1,063	0,940	1,278
prunetin	1,070	1,727	0,972	0,992	1,273	1,349	1,356	1,318	1,399	1,031	0,916	1,006	1,790	1,120	0,939	1,064	0,938	1,282
ramnetin	1,024	1,650	0,966	1,019	1,256	1,363	1,341	1,325	1,388	1,054	1,007	1,050	1,757	1,120	0,939	1,068	0,937	1,270
sakuranetin	0,934	0,961	0,927	0,967	1,306	1,340	1,345	1,334	1,382	1,063	0,968	0,957	1,894	1,104	0,943	1,061	0,939	1,282
tamariksetin	1,010	1,669	0,939	0,992	1,255	1,382	1,320	1,358	1,339	1,064	1,004	1,056	1,833	1,111	0,940	1,087	0,940	1,313
tangeretin	1,025	1,744	0,975	0,960	1,253	1,343	1,263	1,332	1,278	1,046	1,000	0,938	1,856	1,089	1,017	1,071	1,017	1,352
tektokrizin	1,025	1,752	0,972	0,964	1,263	1,381	1,320	1,364	1,339	1,044	0,995	0,938	1,855	1,107	0,941	1,060	0,940	1,335
katehin	0,945	0,936	0,960	0,988	1,321	1,369	1,340	1,364	1,343	1,049	0,967	0,996	0,957	1,069	0,942	1,069	0,942	1,347

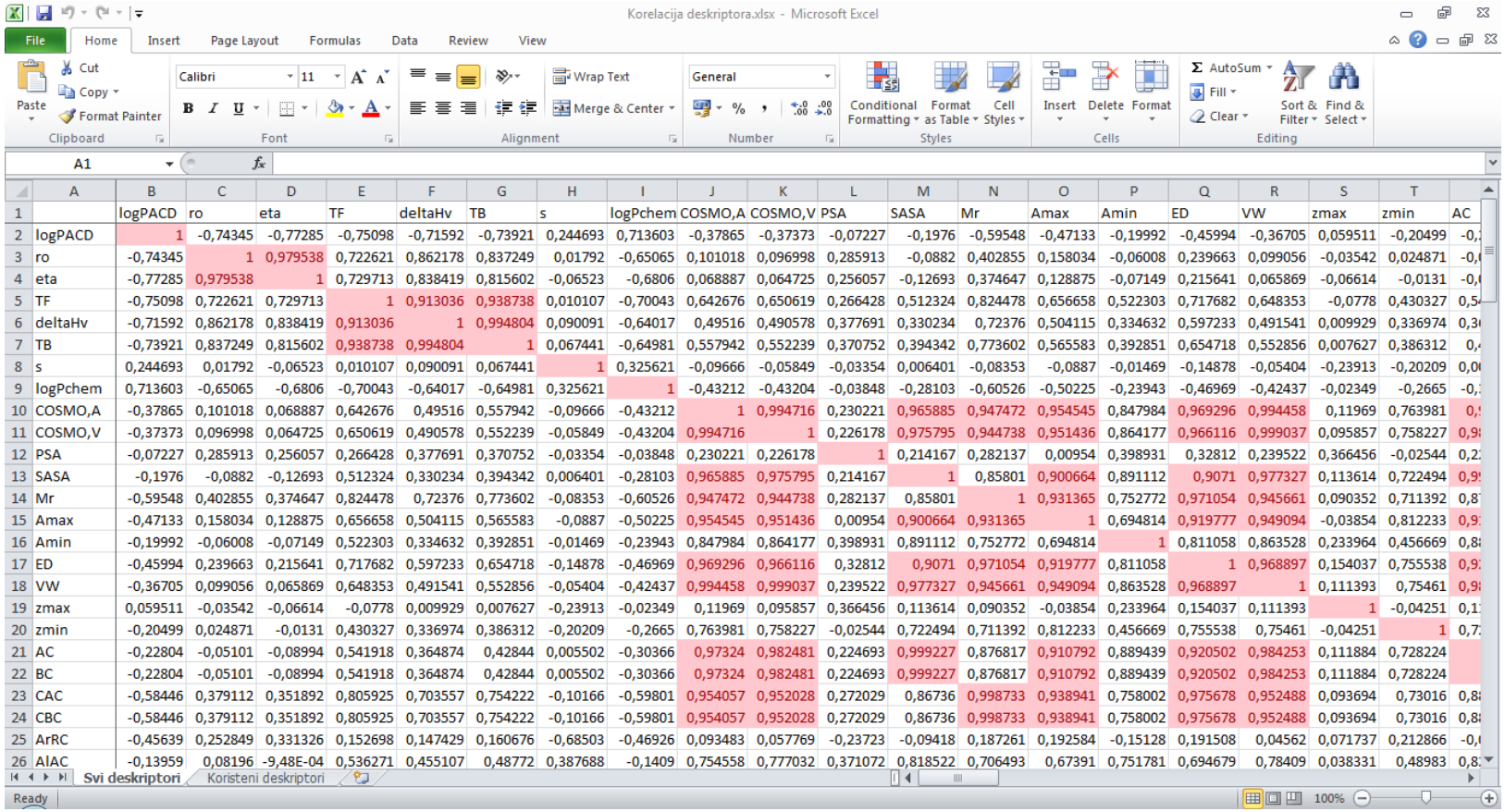
Tablica 15. Vrijednosti parcijalnih naboja (PC) za 30 ispitivanih flavonoida.

Flavonoid \ Deskriptor	PC(O1)	PC(C2)	PC(C3)	PC(C4)	PC(C5)	PC(C6)	PC(C7)	PC(C8)	PC(C9)	PC(C10)	PC(R2)	PC(R3)	PC(R4)	PC(R6)	PC(R7)	PC(R8)	PC(R9)
3,6–diOH–flavon	-0,122	0,096	-0,102	0,294	-0,160	-0,135	0,046	-0,094	-0,129	0,076	0,090	-0,003	-0,318	0,163	-0,024	0,161	0,160
3,7–diOH–flavon	-0,122	0,088	-0,094	0,299	-0,236	-0,001	-0,250	0,139	-0,200	0,145	0,089	-0,002	-0,323	0,163	0,144	-0,013	0,174
6–OH–flavon	-0,133	0,146	-0,305	0,311	-0,155	-0,138	0,049	-0,104	-0,125	0,062	0,074	0,169	-0,307	0,163	-0,026	0,159	0,157
7–OH–flavon	-0,134	0,140	-0,297	0,315	-0,231	-0,008	-0,247	0,131	-0,195	0,133	0,074	0,169	-0,311	0,163	0,143	-0,017	0,171
akacetin	-0,138	0,137	-0,294	0,319	-0,256	0,196	-0,2944	0,172	-0,292	0,172	0,075	0,167	-0,286	0,019	0,160	-0,014	0,158
apigenin	-0,136	0,137	-0,295	0,319	-0,256	0,202	-0,349	0,171	-0,232	0,165	0,074	0,167	-0,287	0,018	0,143	-0,014	0,173
diosmetin	-0,139	0,132	-0,288	0,318	-0,256	0,197	-0,294	0,173	-0,293	0,172	0,070	0,169	-0,283	0,020	0,160	-0,013	0,157
flavanon	-0,205	0,079	-0,239	0,278	-0,225	-0,041	-0,178	-0,071	-0,171	0,121	-0,007	0,129	-0,290	0,156	0,140	0,137	0,154
flavon	-0,136	0,142	-0,300	0,311	-0,194	-0,047	-0,166	-0,078	-0,159	0,097	0,073	0,168	-0,307	0,160	0,141	0,140	0,154
galangin	-0,124	0,072	-0,085	0,305	-0,261	0,203	-0,298	0,182	-0,297	0,182	0,085	0,0001	-0,297	0,020	0,162	-0,010	0,160
genistein	-0,125	0,037	-0,186	0,336	-0,314	0,223	-0,298	0,171	-0,231	0,159	0,187	0,042	-0,3475	0,017	0,161	-0,009	0,175
hesperetin	-0,205	0,083	-0,240	0,284	-0,285	0,206	-0,357	0,176	-0,240	0,185	-0,012	0,129	-0,271	0,013	0,142	-0,014	0,172
izoramnetin	-0,123	0,077	-0,088	0,305	-0,261	0,203	-0,298	0,182	-0,295	0,182	0,081	-0,001	-0,298	0,020	0,161	-0,009	0,162
kempferol	-0,126	0,082	-0,091	0,305	-0,260	0,203	-0,298	0,181	-0,296	0,182	0,087	-0,002	-0,298	0,020	0,162	-0,010	0,160
krizin	-0,135	0,145	-0,295	0,328	-0,313	0,215	-0,239	0,170	-0,294	0,175	0,078	0,172	-0,348	0,019	0,176	-0,011	0,158
krizin-dimetileter	-0,138	0,126	-0,288	0,318	-0,254	0,191	-0,283	0,168	-0,281	0,166	0,068	0,167	-0,288	0,021	0,161	-0,015	0,159
kvercetin	-0,123	0,099	-0,094	0,310	-0,314	0,219	-0,242	0,179	-0,298	0,184	0,091	-0,003	-0,362	0,021	0,178	-0,006	0,161
luteolin	-0,135	0,130	-0,288	0,318	-0,257	0,197	-0,294	0,173	-0,291	0,172	0,065	0,168	-0,284	0,019	0,160	-0,013	0,159
miricetin	-0,121	0,073	-0,082	0,305	-0,261	0,203	-0,297	0,183	-0,295	0,182	0,073	-0,003	-0,297	0,020	0,162	-0,008	0,163
morin	-0,143	0,071	-0,084	0,304	-0,259	0,203	-0,296	0,183	-0,296	0,179	0,087	0,003	-0,293	0,022	0,163	-0,007	0,162
naringenin	-0,206	0,088	-0,241	0,289	-0,284	0,201	-0,303	0,178	-0,299	0,200	-0,030	0,124	-0,279	0,011	0,158	-0,016	0,156
pinocembrin	-0,204	0,080	-0,236	0,295	-0,345	0,221	-0,249	0,175	-0,301	0,196	-0,003	0,132	-0,333	0,014	0,175	-0,012	0,158
pinocembrin–7–metileter	-0,205	0,080	-0,235	0,295	-0,343	0,217	-0,250	0,175	-0,290	0,192	-0,004	0,132	-0,334	0,011	0,173	-0,010	0,161
prunetin	-0,126	0,038	-0,187	0,337	-0,314	0,220	-0,287	0,170	-0,231	0,155	0,186	0,041	-0,349	0,015	0,164	-0,006	0,173
ramnetin	-0,122	0,102	-0,097	0,310	-0,314	0,224	-0,291	0,178	-0,237	0,173	0,090	-0,005	-0,365	0,017	0,165	-0,002	0,175
sakuranetin	-0,203	0,085	-0,240	0,284	-0,285	0,202	-0,346	0,175	-0,240	0,181	-0,008	0,128	-0,274	0,010	0,144	-0,014	0,172
tamariksetin	-0,125	0,078	-0,088	0,305	-0,260	0,203	-0,298	0,182	-0,296	0,182	0,084	-0,003	-0,297	0,020	0,162	-0,009	0,160
tangeretin	-0,130	0,135	-0,296	0,319	-0,241	0,181	-0,089	0,144	-0,087	0,136	0,075	0,167	-0,284	0,036	-0,039	0,011	-0,04
tektokrizin	-0,138	0,127	-0,287	0,318	-0,255	0,193	-0,294	0,172	-0,281	0,168	0,070	0,168	-0,285	0,018	0,158	-0,012	0,160
katehin	-0,206	0,082	0,006	-0,139	-0,196	0,144	-0,273	0,144	-0,274	0,151	-0,012	-0,112	0,105	-0,024	0,154	-0,024	0,154

Tablica 16. Vrijednosti duljina veza (ID) za 30 ispitivanih flavonoida.

Flavonoid \ Deskriptor	ID(O1-C2)	ID(C2-C3)	ID(C3-C4)	ID(C4-C5)	ID(C5-C6)	ID(C6-C7)	ID(C7-C8)	ID(C8-C9)	ID(C9-C10)	ID(C10-O1)	ID(C5-C10)	ID(C2-R2)	ID(C3-R3)	ID(C4-R4)	ID(C6-R6)	ID(C7-R7)	ID(C8-R8)	ID(C9-R9)
3,6–diOH–flavon	1,391	1,365	1,472	1,462	1,404	1,393	1,413	1,382	1,412	1,382	1,401	1,461	1,379	1,241	1,101	1,377	1,100	1,100
3,7–diOH–flavon	1,394	1,363	1,474	1,457	1,406	1,384	1,412	1,398	1,405	1,379	1,406	1,461	1,378	1,249	1,103	1,099	1,372	1,098
6–OH–flavon	1,387	1,354	1,460	1,473	1,402	1,395	1,411	1,384	1,409	1,388	1,401	1,464	1,100	1,239	1,102	1,377	1,100	1,100
7–OH–flavon	1,390	1,352	1,462	1,468	1,404	1,386	1,409	1,400	1,403	1,385	1,405	1,464	1,100	1,240	1,103	1,099	1,373	1,098
akacetin	1,392	1,350	1,466	1,467	1,417	1,400	1,404	1,399	1,403	1,383	1,406	1,462	1,100	1,238	1,366	1,098	1,371	1,097
apigenin	1,391	1,351	1,466	1,467	1,415	1,401	1,403	1,400	1,402	1,384	1,407	1,462	1,100	1,238	1,366	1,098	1,371	1,098
diosmetin	1,392	1,350	1,466	1,467	1,417	1,400	1,404	1,400	1,403	1,384	1,406	1,463	1,100	1,237	1,366	1,098	1,371	1,097
flavanon	1,446	1,523	1,504	1,469	1,402	1,391	1,398	1,390	1,406	1,379	1,407	1,498	1,121	1,236	1,103	1,100	1,101	1,099
flavon	1,388	1,353	1,462	1,471	1,404	1,389	1,400	1,389	1,407	1,386	1,403	1,464	1,100	1,240	1,103	1,100	1,101	1,099
galangin	1,396	1,361	1,479	1,455	1,418	1,398	1,405	1,399	1,404	1,377	1,407	1,460	1,377	1,239	1,366	1,098	1,370	1,097
genistein	1,371	1,355	1,473	1,465	1,418	1,405	1,399	1,403	1,397	1,386	1,411	1,105	1,460	1,245	1,362	1,099	1,370	1,098
hesperetin	1,447	1,521	1,506	1,466	1,413	1,402	1,401	1,402	1,401	1,376	1,411	1,498	1,121	1,234	1,367	1,098	1,371	1,098
izoramnetin	1,395	1,361	1,479	1,455	1,418	1,398	1,405	1,399	1,404	1,378	1,407	1,460	1,377	1,240	1,366	1,098	1,370	1,098
kempferol	1,396	1,362	1,478	1,456	1,418	1,398	1,405	1,399	1,404	1,378	1,407	1,459	1,378	1,240	1,366	1,098	1,370	1,097
krizin	1,388	1,352	1,460	1,462	1,418	1,404	1,400	1,403	1,399	1,385	1,410	1,464	1,100	1,245	1,362	1,099	1,371	1,097
krizin-dimetileter	1,391	1,350	1,467	1,466	1,421	1,396	1,408	1,396	1,405	1,385	1,403	1,464	1,100	1,238	1,371	1,098	1,377	1,097
kvercetin	1,392	1,363	1,472	1,451	1,420	1,402	1,402	1,402	1,400	1,379	1,411	1,459	1,378	1,248	1,362	1,099	1,370	1,097
luteolin	1,391	1,350	1,467	1,467	1,417	1,399	1,404	1,399	1,403	1,384	1,406	1,464	1,100	1,237	1,366	1,098	1,371	1,097
miricetin	1,395	1,361	1,480	1,454	1,419	1,398	1,405	1,399	1,404	1,378	1,407	1,462	1,377	1,239	1,366	1,098	1,370	1,098
morin	1,396	1,361	1,479	1,456	1,418	1,398	1,405	1,399	1,403	1,379	1,407	1,457	1,377	1,239	1,365	1,098	1,370	1,098
naringenin	1,444	1,517	1,508	1,463	1,414	1,401	1,402	1,401	1,402	1,375	1,411	1,499	1,124	1,235	1,367	1,098	1,371	1,097
pinocembrin	1,445	1,521	1,503	1,460	1,416	1,406	1,398	1,404	1,397	1,377	1,415	1,498	1,121	1,242	1,363	1,098	1,371	1,098
pinocembrin–7–metileter	1,445	1,52	1,504	1,459	1,416	1,404	1,401	1,402	1,399	1,378	1,414	1,498	1,121	1,242	1,364	1,099	1,375	1,097
prunetin	1,371	1,352	1,473	1,464	1,416	1,407	1,397	1,407	1,395	1,387	1,412	1,105	1,460	1,245	1,362	1,098	1,375	1,098
ramnetin	1,391	1,363	1,471	1,450	1,417	1,404	1,399	1,406	1,397	1,381	1,413	1,460	1,379	1,248	1,362	1,098	1,374	1,098
sakuranetin	1,447	1,521	1,507	1,465	1,411	1,404	1,399	1,405	1,399	1,377	1,413	1,497	1,121	1,235	1,368	1,097	1,376	1,098
tamariksetin	1,396	1,361	1,479	1,455	1,418	1,398	1,405	1,399	1,404	1,378	1,407	1,460	1,377	1,239	1,366	1,098	1,370	1,097
tangeretin	1,391	1,350	1,465	1,470	1,421	1,403	1,420	1,403	1,414	1,383	1,400	1,462	1,100	1,238	1,368	1,386	1,372	1,385
tektokrizin	1,391	1,350	1,467	1,467	1,417	1,398	1,407	1,397	1,404	1,384	1,404	1,464	1,100	1,237	1,367	1,098	1,376	1,097
katehin	1,000	1,000	1,414	1,414	1,414	2,000	1,000	1,732	1,414	0,000	1,414	1,000	2,000	1,000	1,000	1,414	1,000	1,414

S obzirom na relevantnost određenu korelacijom dviju varijabli, odnosno vrijednosti deskriptora, za QSAR analizu odabrani su deskriptori koji su međusobno slabo povezani te ne nose istu informaciju. Vrijednost korelacije brojčano je iskazana koeficijentom korelacije (*r*), pri čemu su zanemareni deskriptori s povezanošću $r < -0{,}9$ odnosno $r > 0{,}9$ (slika 17), odnosno odabrani su oni deskriptori koje je jednostavnije interpretirati (tablica 17).



	logPACD	ro	eta	TF	deltaHv	TB	s	logPchem	COSMO,A	COSMO,V	PSA	SASA	Mr	Amax	Amin	ED	VW	zmax	zmin	AC
logPACD	1	-0,74345	-0,77285	-0,75098	-0,71592	-0,73921	0,244693	0,713603	-0,37865	-0,37373	-0,07227	-0,1976	-0,59548	-0,47133	-0,19992	-0,45994	-0,36705	0,059511	-0,20499	-0,
ro	-0,74345	1	0,979538	0,722621	0,862178	0,837249	0,01792	-0,65065	0,101018	0,096998	0,285913	-0,0882	0,402855	0,158034	-0,06008	0,239663	0,099056	-0,03542	0,024871	-0,
eta	-0,77285	0,979538	1	0,729713	0,838419	0,815602	-0,06523	-0,6806	0,068887	0,064725	0,256057	-0,12693	0,374647	0,128875	-0,07149	0,215641	0,065869	-0,06614	-0,0131	-0,
TF	-0,75098	0,722621	0,729713	1	0,913036	0,938738	0,010107	-0,70043	0,642676	0,650619	0,266428	0,512324	0,824478	0,656658	0,522303	0,717682	0,648353	-0,0778	0,430327	0,5
deltaHv	-0,71592	0,862178	0,838419	0,913036	1	0,994804	0,090091	-0,64017	0,49516	0,490578	0,377691	0,330234	0,72376	0,504115	0,334632	0,597233	0,491541	0,009929	0,336974	0,3
TB	-0,73921	0,837249	0,815602	0,938738	0,994804	1	0,067441	-0,64981	0,557942	0,552239	0,370752	0,394342	0,773602	0,565583	0,392851	0,654718	0,552856	0,007627	0,386312	0,
s	0,244693	0,01792	-0,06523	0,010107	0,090091	0,067441	1	0,325621	-0,09666	-0,05849	-0,03354	0,006401	-0,08353	-0,0887	-0,01469	-0,14878	-0,05404	-0,23913	-0,20209	0,0
logPchem	0,713603	-0,65065	-0,6806	-0,70043	-0,64017	-0,64981	0,325621	1	-0,43212	-0,43204	-0,03848	-0,28103	-0,60526	-0,50225	-0,23943	-0,46969	-0,42437	-0,02349	-0,2665	-0,
COSMO,A	-0,37865	0,101018	0,068887	0,642676	0,49516	0,557942	-0,09666	-0,43212	1	0,994716	0,230221	0,965885	0,947472	0,954545	0,847984	0,969296	0,994458	0,11969	0,763981	0,
COSMO,V	-0,37373	0,096998	0,064725	0,650619	0,490578	0,552239	-0,05849	-0,43204	0,994716	1	0,226178	0,975795	0,944738	0,951436	0,864177	0,966116	0,999037	0,095857	0,758227	0,9
PSA	-0,07227	0,285913	0,256057	0,266428	0,377691	0,370752	-0,03354	-0,03848	0,230221	0,226178	1	0,214167	0,282137	0,00954	0,398931	0,32812	0,239522	0,366456	-0,02544	0,2
SASA	-0,1976	-0,0882	-0,12693	0,512324	0,330234	0,394342	0,006401	-0,28103	0,965885	0,975795	0,214167	1	0,85801	0,900664	0,891112	0,9071	0,977327	0,113614	0,722494	0,9
Mr	-0,59548	0,402855	0,374647	0,824478	0,72376	0,773602	-0,08353	-0,60526	0,947472	0,944738	0,282137	0,85801	1	0,931365	0,752772	0,971054	0,945661	0,090352	0,711392	0,8
Amax	-0,47133	0,158034	0,128875	0,656658	0,504115	0,565583	-0,0887	-0,50225	0,954545	0,951436	0,00954	0,900664	0,931365	1	0,694814	0,919777	0,949094	-0,03854	0,812233	0,9
Amin	-0,19992	-0,06008	-0,07149	0,522303	0,334632	0,392851	-0,01469	-0,23943	0,847984	0,864177	0,398931	0,891112	0,752772	0,694814	1	0,811058	0,863528	0,233964	0,456669	0,8
ED	-0,45994	0,239663	0,215641	0,717682	0,597233	0,654718	-0,14878	-0,46969	0,969296	0,966116	0,32812	0,9071	0,971054	0,919777	0,811058	1	0,968897	0,154037	0,755538	0,9
VW	-0,36705	0,099056	0,065869	0,648353	0,491541	0,552856	-0,05404	-0,42437	0,994458	0,999037	0,239522	0,977327	0,945661	0,949094	0,863528	0,968897	1	0,111393	0,75461	0,9
zmax	0,059511	-0,03542	-0,06614	-0,0778	0,009929	0,007627	-0,23913	-0,02349	0,11969	0,095857	0,366456	0,113614	0,090352	-0,03854	0,233964	0,154037	0,111393	1	-0,04251	0,1
zmin	-0,20499	0,024871	-0,0131	0,430327	0,336974	0,386312	-0,20209	-0,2665	0,763981	0,758227	-0,02544	0,722494	0,711392	0,812233	0,456669	0,755538	0,75461	-0,04251	1	0,7
AC	-0,22804	-0,05101	-0,08994	0,541918	0,364874	0,42844	0,005502	-0,30366	0,97324	0,982481	0,224693	0,999227	0,876817	0,910792	0,889439	0,920502	0,984253	0,111884	0,728224	
BC	-0,22804	-0,05101	-0,08994	0,541918	0,364874	0,42844	0,005502	-0,30366	0,97324	0,982481	0,224693	0,999227	0,876817	0,910792	0,889439	0,920502	0,984253	0,111884	0,728224	
CAC	-0,58446	0,379112	0,351892	0,805925	0,703557	0,754222	-0,10166	-0,59801	0,954057	0,952028	0,272029	0,86736	0,998733	0,938941	0,758002	0,975678	0,952488	0,093694	0,73016	0,8
CBC	-0,58446	0,379112	0,351892	0,805925	0,703557	0,754222	-0,10166	-0,59801	0,954057	0,952028	0,272029	0,86736	0,998733	0,938941	0,758002	0,975678	0,952488	0,093694	0,73016	0,8
ArRC	-0,45639	0,252849	0,331326	0,152698	0,147429	0,160676	-0,68503	-0,46926	0,093483	0,057769	-0,23723	-0,09418	0,187261	0,192584	-0,15128	0,191508	0,04562	0,071737	0,212866	-0,
AIAC	-0,13959	0,08196	-9,48E-04	0,536271	0,455107	0,48772	0,387688	-0,1409	0,754558	0,777032	0,371072	0,818522	0,706493	0,67391	0,751781	0,694679	0,78409	0,038331	0,48983	0,8

Slika 17. Primjer koreliranja za neke, od ukupno 127 izračunatih deskriptora.

Tablica 17. Pregled molekulskih deskriptora koji su odabrani za daljnju QSAR analizu.

Simbol	Značenje molekulskog deskriptora
A_{min}	minimalna projekcijska površina
AlBC	broj alifatskih veza
B_{FR}	broj slobodnih rotirajućih veza
BO(C2-R2)	red veze atoma C2 i supstituenta R2
BO(C3-C4)	red veze između atoma C3 i C4
BO(C4-C5)	red veze između atoma C4 i C5
BO(C4-R4)	red veze između atoma C4 i supstituenta R4
BO(C5-C6)	red veze između atoma C5 i C6
BO(C5-C10)	red veze između atoma C5 i C10
BO(C6-C7)	red veze između atoma C6 i C7
BO(C7-C8)	red veze između atoma C7 i C8
BO(C10-O1)	red veze između atoma C10 i O1
E_{HOMO}	energija najviše popunjene molekulske orbitale
E_{LUMO}	energija najniže slobodne molekulske orbitale
F(G)	Plattov indeks
HBD	broj donora vodikove veze
ID(C2-C3)	duljina veze između atoma C2 i C3
ID(C8-C9)	duljina veze između atoma C8 i C9
J(G)	Balabanov indeks

Simbol	Značenje molekulskog deskriptora
$\log P_{chem}$	log$P$ preuzet s *chemicalize.org*
$\log P_{ACD}$	log$P$ preuzet iz ACD/Labs
MR_{chem}	molarna refraktivnost preuzeta s *chemicalize.org*
M_s(R2)	relativna masa supstituenta R2
M_s(R6)	relativna masa supstituenta R6
M_s(R8)	relativna masa supstituenta R8
μ	dipolni moment
PC(C2)	parcijalni naboj atoma C2
PC(C4)	parcijalni naboj atoma C4
PC(C5)	parcijalni naboj atoma C5
PC(C7)	parcijalni naboj atoma C7
PC(C9)	parcijalni naboj atoma C9
PC(C10)	parcijalni naboj atoma C10
PC(R2)	parcijalni naboj supstituenta R2
PC(R3)	parcijalni naboj supstituenta R3
PC(R4)	parcijalni naboj supstituenta R4
PC(R6)	parcijalni naboj supstituenta R6
PC(R7)	parcijalni naboj supstituenta R7
PC(R8)	parcijalni naboj supstituenta R8

Simbol	Značenje molekulskog deskriptora
PC(R9)	parcijalni naboj supstituenta R9
π_s(R2)	hidrofobna konstanta supstituenta R2
π_s(R3)	hidrofobna konstanta supstituenta R3
π_s(R6)	hidrofobna konstanta supstituenta R6
π_s (R8)	hidrofobna konstanta supstituenta R8
PSA	polarna površina
S	topljivost
Sz(G)	Szeged indeks
T_F	temperatura plamišta
V_s(R3)	volumen supstituenta R3
z_{max}	z-vrijednost maksimalne projekcijske površine
z_{min}	z-vrijednost minimalne projekcijske površine
χ(C4)	orbitalna elektronegativnost atoma C4
χ(C5)	orbitalna elektronegativnost atoma C5
χ(C7)	orbitalna elektronegativnost atoma C7
χ(C8)	orbitalna elektronegativnost atoma C8
χ(C9)	orbitalna elektronegativnost atoma C9
χ(R2)	orbitalna elektronegativnost supstituenta R2

4.2.2. QSAR analiza

Temeljem reduciranog skupa molekulskih deskriptora (tablica 17), provedena je QSAR analiza učinka 30 odabranih flavonoida na CYP3A4, CYP1A2, CYP2A6, CYP2D6 i CYP2C8. S obzirom na to da je za enzim CYP3A4 eksperimentalno ispitana MBI za svih 30 flavonoida, QSAR temeljen na primjeni slučajnih šuma (RF) proveden je samo za CYP3A4 jer je jedino u tom slučaju omjer broja ulaznih varijabli (deskriptora) i broja ispitanih flavonoida blizu 1. Također, provedena je regresijska i klasifikacijska analiza MBI enzima CYP3A4 uz primjenu križne validacije dobivenih modela. Za ostale enzime (CYP1A2, CYP2A6, CYP2D6 i CYP2C8) MBI je analizirana primjenom linearne regresije. Granica statističke značajnosti postavljena je na 0,05.

QSAR analiza MBI enzima CYP3A4

Provedena regresijska QSAR analiza, temeljena na primjeni RF, pokazala je da je broj ispitanih flavonoida premali za pouzdanu predikciju iznosa ostatne inhibicije, što je potvrđeno rezultatom križne validacije koji iznosi q = 0,047.

Nakon toga je provedena klasifikacijska QSAR analiza („Inhibitori“ *vs* „Ne-inhibitori“) temeljena na primjeni RF. Kako je broj članova klase „Inhibitori“ vrlo mali (7 od ukupno 30 flavonoida) korištene su sljedeće izmjene zadanih vrijednosti za učenje RF:

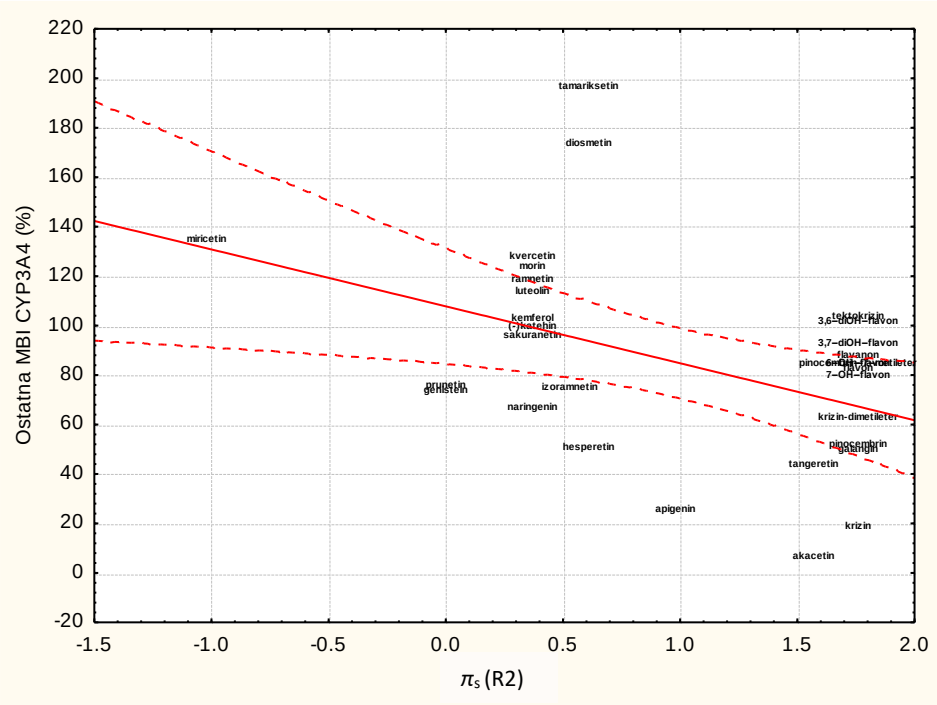
- broj stabala odluke (*ntree*) je postavljen na 100 i
- uključeno je vaganje klasa (težina klase „Inhibitori“ je 100.000, a klase „Ne-inhibitori“ je 1)

Ovim izmjenama klasa „Inhibitori“ ostvaruje značajniji učinak na konačni RF klasifikacijski model.

Križnom validacijom konačnog modela utvrđena je klasifikacijska točnost od 73,3 %. U dobivenom RF klasifikacijskom modelu najviše su rangirani sljedeći deskriptori:

1. π_s(R2)
2. BO(C5-C6)
3. PC(R2)
4. T_F
5. χ(R2)

Rezultati su pokazali kako, od navedenih deskriptora, jedino π_s(R2) statistički značajno korelira s ostatnom aktivnošću pa je njegova veza s MBI CYP3A4 prikazana na slici 18.

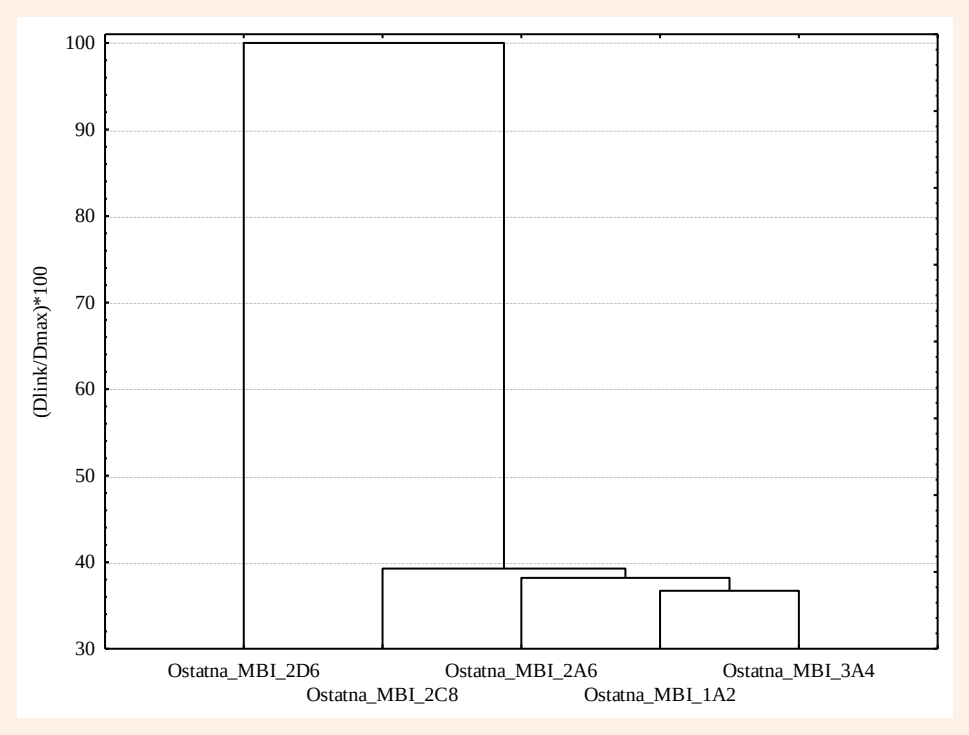


Slika 18. Grafički prikaz korelacije deskriptora π_s(R2) s ostatnom aktivnošću enzima CYP3A4 pri MBI.

Korelacija na gornjem grafu prikazanih varijabli iznosi r = -0,432 uz statističku značajnost od P = 0,017. Uočljivo je da ostatna aktivnost enzima pri MBI pada s porastom hidrofobne konstante supstituenta R2.

QSAR analiza MBI enzima CYP1A2, CYP2A6, CYP2D6 i CYP2C8

Kako bi se utvrdila povezanost učinka 11 ispitanih flavonoida na sve ispitivane enzime CYP provedena je hijerarhijska tvorba klastera (slika 19).



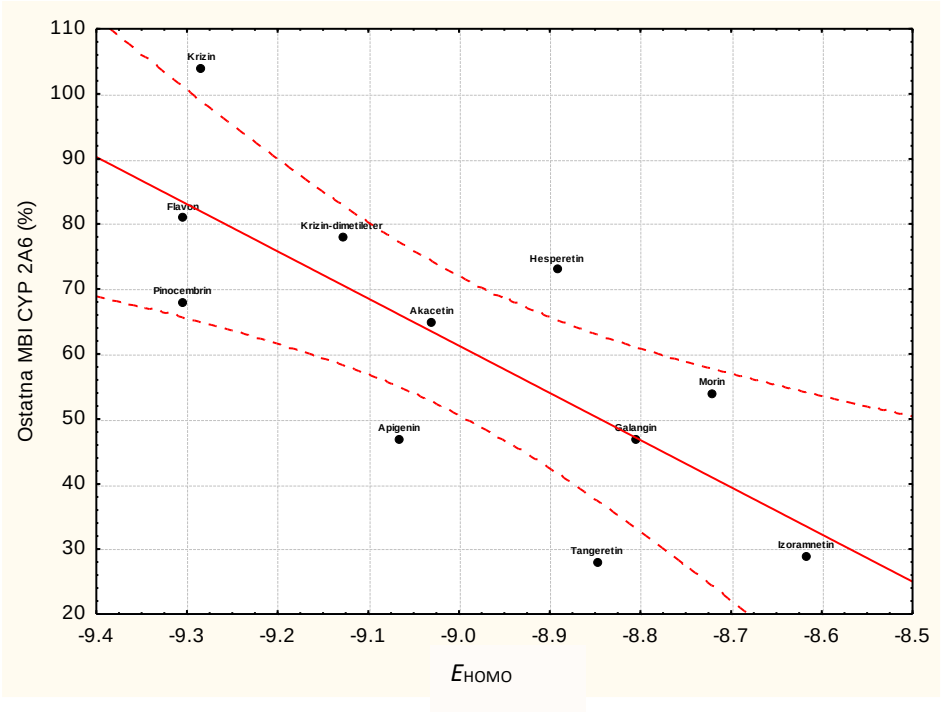
Slika 19. Međuodnosi MBI enzima CYP3A4, CYP1A2, CYP2A6, CYP2D6 i CYP2C8.

Iz udaljenosti klastera u dendrogramu uočljivo je da nema velikih razlika između ostatnih aktivnosti enzima CYP2C8, CYP2A6, CYP1A2 i CYP3A4. U istu svrhu je proveden Fisherov egzaktni test, čijom primjenom nije utvrđena statistički značajna razlika među MBI enzima CYP2C8, CYP2A6, CYP1A2 i CYP3A4. Primjenom istog testa utvrđena je statistički značajna razlika između MBI enzima CYP2D6 i svih preostalih enzima CYP, osim CYP2C8. Navedene statističke značajnosti su prikazane u tablici 18.

Tablica 18. Statističke značajnosti razlika MBI enzima CYP2D6 i MBI ostalih ispitanih enzima CYP, dobivenih usporedbom pojave ili izostanka navedenog tipa inhibicije za 11 odabranih flavonoida. *P* označava statističku značajnost. Statistički značajne razlike istaknute su *kurzivom*.

CYP2D6 *vs*:	CYP3A4	CYP1A2	CYP2A6	CYP2C8
P	*0,0019*	*0,0175*	*0,0451*	0,1071

Nakon toga, provedeno je ispitivanje povezanosti svakog od 56 deskriptora s ostatnim aktivnostima enzima CYP1A2, CYP2A6 i CYP2C8 pri MBI. Jedino je u slučaju CYP2A6 utvrđena statistički značajna veza između odabranih deskriptora i ostatne aktivnosti. Budući da su svi deskriptori koji koreliraju s ostatnom aktivnošću ujedno i međusobno korelirani, za QSAR analizu iskorišten je samo E_{HOMO} deskriptor koji pokazuje najveći koeficijent korelacije s ostatnom aktivnošću kod MBI (r = – 0,763, P = 0,006) (slika 20).



Slika 20. Grafički prikaz korelacije deskriptora E_{HOMO} s ostatnom aktivnosti CYP2A6 pri MBI.

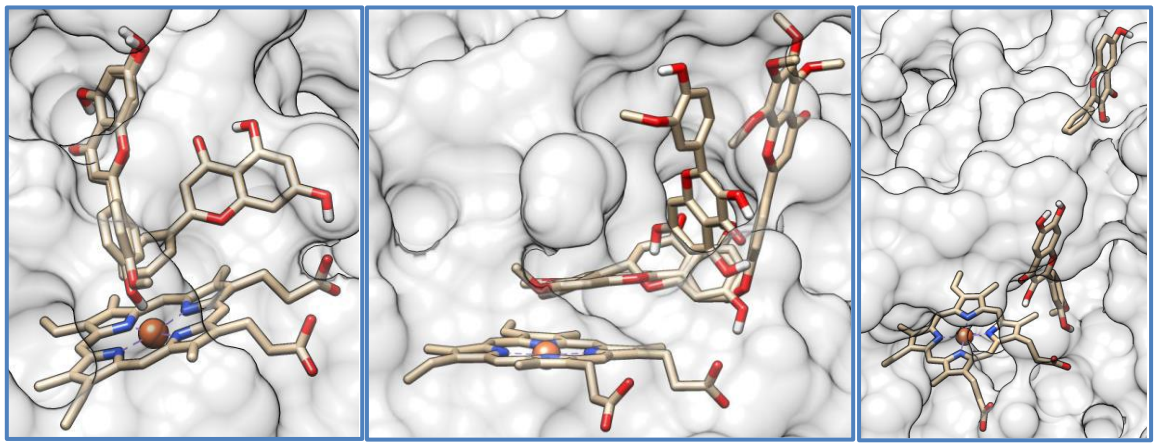
Iz grafa je vidljivo da s porastom energije najviše popunjene molekulske orbitale (E_{HOMO}) raste inhibicijski potencijal. Drugim riječima, porastom elektron donorskih svojstava flavonoida, raste inhibicijski potencijal. Navedeno se odnosi na suženi skup flavonoida (N = 11) te isto nije uočeno na cjelokupnom skupu ispitivanih flavonoida (N = 30).

4.2.3. Predikcija inhibicije citokroma P450

Predviđanje inhibicije dostupnih enzima citokrom P450, primjenom CypRules Servera, a s obzirom na 2D, odnosno 3D strukturu odabranih flavonoida, pokazalo je izostanak inhibicije za sve ispitivane flavonoide.

4.2.4. Molekularno sidrenje

Slijepo sidrenje, odnosno "screening" sidrenje po cijeloj molekuli enzima CYP3A4, provedeno je sidrenjem flavonoida koji su pokazali inhibicijski učinak, kao i onih koji se nisu pokazali kao inhibitori enzima CYP3A4 (slika 21).



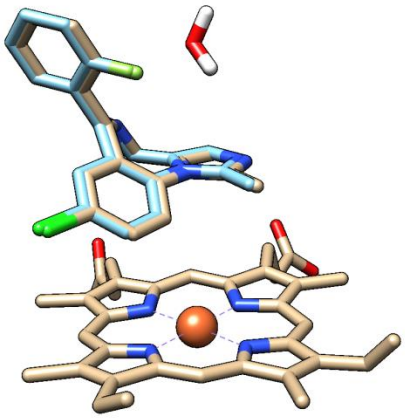
A B C

Slika 21. Usporedba sidrenja flavonoida s obzirom na inhibicijski potencijal za enzim CYP3A4; A - sidrenje flavonoida koji su se pokazali kao ireverzibilni inhibitori; B - sidrenje flavonoida koji su se pokazali kao reverzibilni inhibitori CYP3A4; C - sidrenje flavonoida koji nisu pokazali statistički značajnu inhibiciju.

Rezultati slijepog sidrenja po cijeloj molekuli enzima CYP3A4 pokazali su kako se inhibitori enzima (flavonoidi) vežu u aktivnom mjestu enzima, točnije u području hema. S obzirom na rezultate "screening" sidrenja te prirodu katalitičkog ciklusa CYP enzima, u nastavku se ispitalo vezanje flavonoida u aktivnom mjestu citokroma P450, pri čemu su se koristili flavonoidi koji su pokazali statistički značajnu, o metabolizmu ovisnu inhibiciju, kao posljedicu izravne reverzibilne inhibicije.

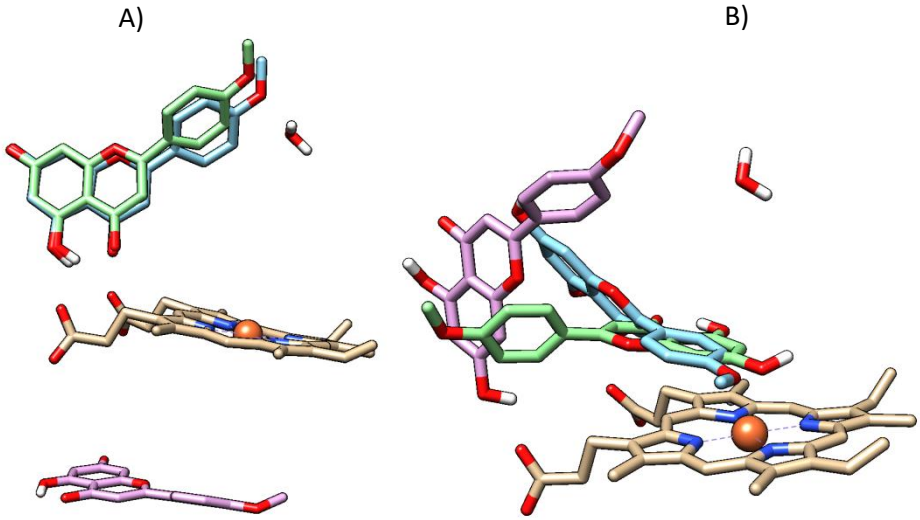
Rezultati sidrenja za enzim CYP3A4

Sidrenje midazolama u prisustvu i odsustvu HOH 735 je bilo provedeno i uspoređeno s kristalografskim podacima (slika 22). Usidreni položaji midazolama, s i bez molekule vode su identični te imaju gotovo identične koordinate kao i midazolam iz kristalografskih podataka. Navedeno je služilo kao potvrda da je sidrenje u prisustvu HOH 735 valjani pristup s obzirom na to da molekula vode može utjecati na položaj liganda u aktivnom mjestu (de Graaf i sur., 2005., Roberts i sur., 2008.).



Slika 22. Usporedba usidrenog midazolama u slučaju uklonjenih svih molekula vode i u slučaju prisutnosti HOH 735 (plavo) i kristalografskog midazolama (smeđe) u blizini hemske skupine CYP3A4. Atomi kisika su prikazani crveno, dušika plavo, vodika bijelo, a hemskog željeza narančasto. Nepolarni vodici nisu prikazani radi preglednosti.

Kao što se može vidjeti na slici 23 i u tablici 19, anioni akacetina se slabije vežu u aktivnom mjestu enzima CYP3A4 od molekula akacetina.



Slika 23. A) Usporedba usidrenih specija aniona akacetina u prisustvu i odsustvu HOH 735 molekule vode. Najbolje rangirana anionska specija u prisustvu HOH 735 je prikazana plavo, a u odsustvu HOH 735 zeleno, dok je položaj konformacija s drugom najnižom energijom i u prisustvu i u odsustvu vode identičan te je prikazan ružičasto. B) Usporedba najbolje rangiranih usidrenih specija molekule akacetina u prisustvu i odsustvu HOH 735 molekule vode. Najbolje rangirane specije su označene plavo, druge najbolje rangirane specije su označene ružičasto, a treće rangirane specije su prikazane zeleno. Atomi kisika su prikazani crveno, dušika plavo, vodika bijelo, a hemskog željeza narančasto. Nepolarni vodici nisu prikazani radi preglednosti.

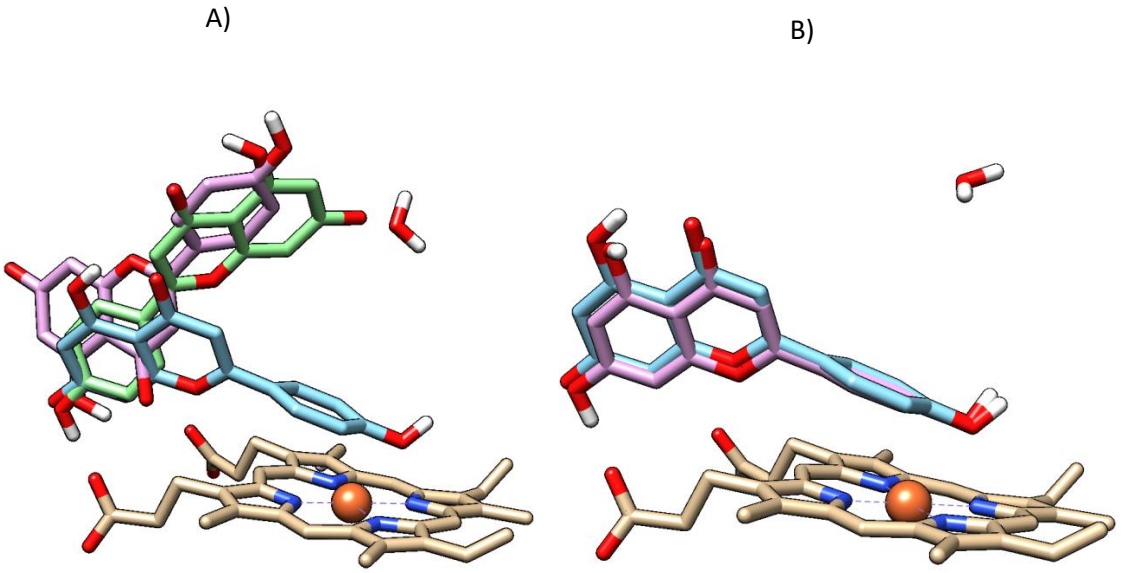
Tablica 19. Sažetak sidrenja specija akacetina u aktivnom mjestu enzima CYP3A4.

Anion akacetina na položaju 7							
U prisutnosti HOH 735				U odsutnosti HOH 735			
Rang grozda	Broj sidrenja	Energija vezanja (kcal/mol)	Konstanta inhibicije (μM)	Rang grozda	Broj sidrenja	Energija vezanja (kcal/mol)	Konstanta inhibicije (μM)
1	98	–5,81	54,76	1	98	–5,71	64,91
2	2	–5,53	88,17	2	2	–5,52	89,67

Tablica 19 - nastavak. Sažetak sidrenja specija akacetina u aktivnom mjestu enzima CYP3A4.

Molekula akacetina							
U prisutnosti HOH 735				U odsutnosti HOH 735			
Rang grozda	Broj sidrenja	Energija vezanja (kcal/mol)	Konstanta inhibicije (μM)	Rang grozda	Broj sidrenja	Energija vezanja (kcal/mol)	Konstanta inhibicije (μM)
1	71	–8,19	0,99	1	78	–8,23	0,93
2	18	–8,03	1,30	2	11	–8,05	1,26
3	11	–7,59	2,71	3	10	–7,64	2,5
				4	1	–7,44	3,53

Rezultati sidrenja specija apigenina prikazani su u tablici 20 i na slici 24. U ovom slučaju također je vidljivo da su slobodne energije vezanja molekulskih specija značajno niže od slobodnih energija vezanja anionskih specija (tablica 20).



Slika 24. A) Usporedba usidrenih specija aniona apigenina u prisustvu i odsustvu HOH 735 molekule vode. Najbolje rangirana anionska specija u prisustvu HOH 735 je prikazana plavo, a u odsustvu HOH 735 zeleno, dok je položaj konformacije s drugom najnižom energijom u prisustvu molekule vode prikazan ružičasto. B) Usporedba

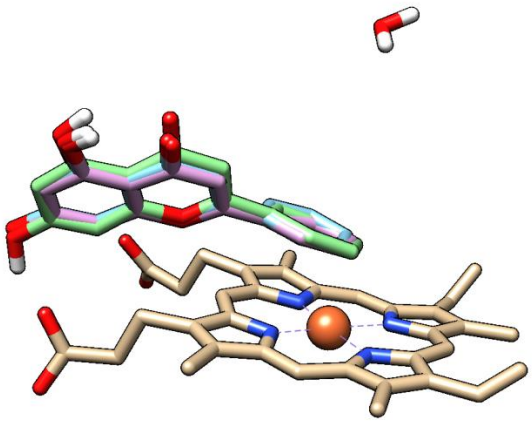
najbolje rangiranih usidrenih specija molekule apigenina, u prisustvu i odsustvu HOH 735 molekule vode, s najbolje rangiranom anionskom specijom u prisustvu molekule vode. Najbolje rangirane molekulske specije imaju identičan položaj i u prisustvu i u odsustvu vode i označene su ružičasto, dok je najbolje rangirana anionska specija u prisustvu molekule vode prikazana plavo, kao i na slici A. Atomi kisika su prikazani crveno, dušika plavo, vodika bijelo, a hemskog željeza narančasto,. Nepolarni vodici nisu prikazani radi preglednosti.

Tablica 20. Sažetak sidrenja specija apigenina u aktivnom mjestu enzima CYP3A4.

Anion apigenina na položaju 7							
U prisutnosti HOH 735				U odsutnosti HOH 735			
Rang grozda	Broj sidrenja	Energija vezanja (kcal/mol)	Konstanta inhibicije (μM)	Rang grozda	Broj sidrenja	Energija vezanja (kcal/mol)	Konstanta inhibicije (μM)
1	84	–5,57	82,12	1	100	–6,11	33,40
2	13	–5,44	103,18				
3	1	–5,04	203,04				
4	2	–4,76	323,16				

Molekula apigenina							
U prisutnosti HOH 735				U odsutnosti HOH 735			
Rang grozda	Broj sidrenja	Energija vezanja (kcal/mol)	Konstanta inhibicije (μM)	Rang grozda	Broj sidrenja	Energija vezanja (kcal/mol)	Konstanta inhibicije (μM)
1	100	–8,87	0,32	1	100	–8,91	0,29

U slučaju sidrenja specija krizina rezultati su jednoznačni (tablica 21 i slika 25). Obje specije krizina, i u prisustvu i u odsustvu HOH 735 molekule vode, vežu se u gotovo identičnom položaju, s time da se molekulske specije vežu u identičnom položaju.



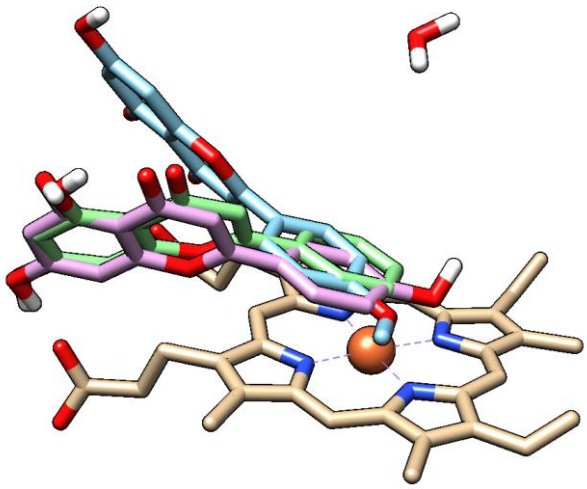
Slika 25. Usporedba usidrenih specija krizina u prisustvu i odsustvu HOH 735 molekule vode. Usidrena anionska specija u prisustvu HOH 735 je prikazana plavo, u odsustvu HOH 735 zeleno, dok molekulske specije imaju identičan položaj i prikazane su ružičasto. Atomi kisika su prikazani crveno, dušika plavo, vodika bijelo, a hemskog željeza narančasto. Nepolarni vodici nisu prikazani radi preglednosti.

I u ovom slučaju može se primijetiti kako su energije vezanja molekulskih specija puno niže od energija vezanja anionskih specija (tablica 21).

Tablica 21. Sažetak sidrenja specija krizina u aktivnom mjestu enzima CYP3A4.

Anion krizina na položaju 7							
U prisutnosti HOH 735				U odsutnosti HOH 735			
Rang grozda	Broj sidrenja	Energija vezanja (kcal/mol)	Konstanta inhibicije (μM)	Rang grozda	Broj sidrenja	Energija vezanja (kcal/mol)	Konstanta inhibicije (μM)
1	100	–6,18	29,28	1	100	–6,23	27,24
Molekula krizina							
U prisutnosti HOH 735				U odsutnosti HOH 735			
Rang grozda	Broj sidrenja	Energija vezanja (kcal/mol)	Konstanta inhibicije (μM)	Rang grozda	Broj sidrenja	Energija vezanja (kcal/mol)	Konstanta inhibicije (μM)
1	100	–8,56	0,53	1	100	–8,60	0,50

Na slici 26 može se vidjeti usporedba položaja akacetina, apigenina i krizina pri vezanju za aktivno mjesto enzima CYP3A4.



Slika 26. Usporedba vezanja najbolje rangiranih molekulskih specija akacetina (plavo), apigenina (ružičasto) i krizina (zeleno) u aktivnom mjestu enzima CYP3A4. Sve molekule su orijentirane s prstenom B u blizini hemskog željeza. Atomi kisika su prikazani crveno, dušika plavo, vodika bijelo, a hemskog željeza narančasto. Nepolarni vodici nisu prikazani radi preglednosti.

5. RASPRAVA

Praćenjem inkubacija uz dodatak flavonoida kao potencijalnog inhibitora, u odnosu na inkubacije bez inhibitora, ispitan je inhibicijski učinak flavonoida na metaboličku aktivnost odabranih enzima citokrom P450. U prisutnosti specifičnih marker supstrata pojedinog enzima CYP, određena je ostatna aktivnost enzima na osnovi produkta marker reakcije. Kako bi se utvrdila inhibicija ovisna o metabolizmu (MBI), vremenski ovisna inhibicija (TDI) i izravna reverzibilna inhibicija (DRI) provedene su tri vrste eksperimenata. Za flavonoide obuhvaćene ovom disertacijom, primarno je eksperimentalno ispitana o metabolizmu ovisna inhibicija jer uključuje predinkubaciju potrebnu za vremenski ovisnu inhibiciju, kao i inkubaciju flavonoida i marker supstrata istovremeno, posljedično ukazujući na izravnu inhibiciju.

CYP3A4

Za ispitivanje inhibicije enzima CYP3A4, od ukupno 30 ispitanih flavonoida, u primijenjenim koncentracijama, njih 7 iz skupina flavanona (pinocembrin), flavona (krizin, apigenin, akacetin, tangeretin, krizin-dimetileter) i flavonola (izoramnetin) pokazalo je statistički značajan potencijal za inhibiciju CYP3A4 ($P < 0,05$) te su snizili metaboličku aktivnost enzima CYP3A4 (tablica 4).

Flavon akacetin, pokazao se kao najznačajniji inhibitor te je smanjio enzimsku aktivnost CYP3A4 o metabolizmu ovisnom inhibicijom za 95 % ($P = 0,007$). Iako je akacetin opsežno proučavan radi pozitivnih učinaka u zaštiti kardiomiocita, kao i antibakterijske aktivnosti te antikancerogenih svojstava (Wu i sur., 2018., Zhang i sur., 2018., Gomez-Chang i sur., 2018.), prema dostupnoj literaturi nisu pronađena druga izvješća o učinku flavona na inhibiciju CYP3A4 (Šarić Mustapić i sur., 2018.). Kako bi se pretpostavila potencijalna vezna mjesta te najvjerojatnija konformacija akacetina u aktivnom mjestu CYP3A4, primijenjena je metoda molekularnog sidrenja.

Primarno je provedeno slijepo ("screening") sidrenje flavonoida po cijeloj molekuli enzima CYP3A4, s obzirom na inhibicijski učinak koji su odabrani flavonoidi pokazali eksperimentalno. Drugim riječima, slijepim sidrenjem uspoređeni su flavonoidi koji su pokazali reverzibilnu, odnosno ireverzibilnu inhibiciju enzima CYP3A4 te flavonoidi koji se nisu pokazali kao inhibitori enzima CYP3A4 (ne-inhibitori). Slijepo sidrenje (slika 21) pokazalo je kako se reverzibilni inhibitori (krizin, apigenin, akacetin) vežu u neposrednoj

blizini hemskog željeza, pri čemu se akacetin i apigenin značajno preklapaju i postavljaju okomito na hem željezo. Jedina razlika je u položaju supstituenta 4'. U ovom položaju akacetin ima metoksi skupinu dok apigenin ima hidroksilnu skupinu. Krizin koji nema supstituent na položaju 4' pozicioniran je vodoravno u odnosu na akacetin i apigenin, ali još uvijek s prstenom B u blizini hemskog željeza. S druge strane, ireverzibilni inhibitori vežu se na drugačiji način. Prsteni A i C krizin-dimetiletera nalaze se u blizini hemskog željeza. Pinocembrin je strukturni analog krizina i njihovi se položaji značajno preklapaju, osim položaja prstena B. Jedina razlika u strukturi je odsustvo C2–C3 dvostruke veze u pinocembrinu, što molekulu čini fleksibilnijom i time ireverzibilnim inhibitorom, jer tako dolazi u povoljniji položaj za jaču interakciju. Za razliku od drugih inhibitora, izoramnetin i tangeretin nalaze se na ulazu u aktivno središte. Za ne-inhibitore odabrani su 3,6-dihidroksiflavon i tangeretin. 3,6-dihidroksiflavon veže se na površini enzima, daleko od ulaza u aktivno mjesto i također daleko od hem grupe. S druge strane, tamariksetin se veže u sličnom položaju kao tangeretin, ali zbog strukturnih razlika (tamariksetin ima dvije hidroksilne skupine na prstenu A, dok tangeretin ima četiri metoksi skupine), slabije je vezan (tamariksetin $\Delta G = -32{,}59$ kJ/mol , tangeretin $\Delta G = -34{,}18$ kJ/mol) (slika 21). Rezultati slijepog sidrenja pokazali su kako se inhibitori enzima (flavonoidi) vežu u aktivnom mjestu enzima, točnije u području hema. Uzimajući u obzir dobivene rezultate slijepog sidrenja te prirodu katalitičkog ciklusa enzima CYP, metodom molekularnog sidrenja dalje se ispitalo vezanje flavonoida u aktivnom mjestu citokroma P450, pri čemu su se koristili flavonoidi koji su pokazali statistički značajnu MBI, kao posljedicu DRI (akacetin, krizin, apigenin).

S obzirom na to da molekula vode može utjecati na položaj liganda u aktivnom mjestu (de Graaf i sur., 2005., Roberts i sur., 2008.) sidrenje akacetina provedeno je u prisustvu HOH 735. Anioni akacetina slabije se vežu u aktivnom mjestu CYP3A4 od molekula akacetina, što je vidljivo na slici 23 i u tablici 19. Isto tako, najbolje rangirani grozdovi aniona akacetina su krivo orijentirani u aktivnom mjestu, dok se drugo-rangirani grozdovi nalaze s pogrešne strane hemskog prstena. Ni u slučaju sidrenja molekula akacetina, HOH 735 molekula vode ne čini nikakvu razliku te grozdovi u oba slučaja imaju identične položaje. Najbolje rangirani grozdovi su orijentirani s prstenom B usmjerenim prema hemskom željezu, drugo-rangirani grozdovi se nalaze daleko od hemskog željeza, a kod treće-rangiranih grozdova prsteni A i C su paralelni s hemskim prstenom CYP3A4 (slika 23).

Prema intenzitetu inhibicije enzima CYP3A4 slijedi krizin koji je MBI smanjio aktivnost enzima za 83 % ($P = 0{,}010$) (tablica 4). Iako su ranije Quintieri i suradnici ispitivali

učinke krizina na 1'-hidroksilaciju midazolama *in vitro*, inhibicija CYP3A4 nije dokazana (Quentieri i sur., 2008., Šarić Mustapić i sur., 2018.).

Prilikom ispitivanja izravne inhibicije nije se provodila predinkubacija kako bi se odredila reverzibilna inhibicija, u kojoj se supstrat i inhibitor istovremeno natječu za aktivno mjesto. Ispitivanje DRI pokazalo je inhibicijski učinak akacetina i krizina na CYP3A4 smanjujući ostatnu aktivnost enzima na 46 ± 6 % (P = 0,005) i 54 ± 23 % (P = 0,044) (tablica 4). Ovi rezultati pokazuju kako primijećena TDI, jest inhibicija koja se javlja kao posljedica DRI (Šarić Mustapić i sur., 2018.). Rezultati molekularnog sidrenja krizina pokazali su se jednoznačnima (slika 25). Obje specije krizina, i u prisustvu i u odsustvu HOH 735 molekule vode, vežu se u gotovo identičnom položaju, s time da se molekulske specije vežu u identičnom položaju, pri čemu je vidljivo kako su energije vezanja molekulskih specija puno niže od energija vezanja anionskih specija (tablica 21).

Dodatno, u ovoj studiji ispitivana ostatna aktivnost enzima CYP3A4, nakon inkubacije s apigeninom, iznosila je samo 24 % (P = 0,013), čime se apigenin pokazao kao iznimno potentan inhibitor enzima CYP3A4 (tablica 4). Ho i suradnici ustanovili su da broj hidroksilnih skupina, kao i položaj hidroksilacije, ima važnu ulogu u inhibicijskim učincima flavonoida te su eksperimentalno potvrdili postojanje povezanosti između broja hidroksilnih skupina i jačine inhibicije CYP3A4. Redoslijed inhibicijskog potencijala bio je miricetin > kvercetin > morin > kempferol > apigenin > flavon (sa 6, 5, 4, 3, 0 hidroksilnih skupina). To potvrđuje postojanje korelacije (r = 0,89, P < 0,0005) između broja hidroksilnih skupina i jačine inhibicije CYP3A4 (Ho i sur., 2001), što je potvrđeno i u ovoj disertaciji.

Snažan inhibicijski utjecaj apigenina na enzim CYP3A4 dodatno su potvrdila i druga ispitivanja (Cermak 2008.). Prilikom ispitivanja tipa inhibicije u ovoj disertaciji, u slučaju DRI apigenin je smanjio enzimsku aktivnost CYP3A4 za 65 % (P = 0,051) te je ostatna aktivnost CYP3A4 iznosila 35 ± 18 %. U slučaju TDI apigenin je smanjio aktivnost CYP3A4 za 66 % (P = 0,005) te je ostatna aktivnost CYP3A4 za apigenin iznosila 34 ± 10 % (tablica 4). S obzirom na to da nije uočena statistički značajna razlika u ostatnoj aktivnosti enzima CYP3A4, između MBI i TDI, može se zaključiti da je apigenin reverzibilni inhibitor CYP3A4. Reverzibilnu inhibiciju CYP3A4 pomoću apigenina dodatno su opisali Li i suradnici (Li i sur., 2018.) dok su Kimura i suradnici utvrdili da se radi o inhibiciji miješanog tipa (Kimura i sur., 2010.), što također ukazuje na važnost reverzibilne inhibicije (Šarić Mustapić i sur., 2018.).

Rezultati sidrenja specija apigenina (tablica 20, slika 24) pokazali su kako su slobodne energije vezanja molekulskih specija značajno niže od slobodnih energija vezanja anionskih specija. Međutim, za razliku od akacetina, kod apigenina se i najbolje rangirana anionska specija sidri u ispravnom položaju, s neznatnim razlikama u položaju od molekulskih specija, na koje prisustvo, odnosno odsustvo HOH 735 molekule vode nema nikakav utjecaj. Usporedbom položaja akacetina, apigenina i krizina pri vezanju za aktivno mjesto enzima CYP3A4 molekularnim sidrenjem, ustanovljeno je kako je položaj apigenina i krizina gotovo identičan. Takav rezultat mogao se i očekivati s obzirom na to da je jedina strukturna razlika između dva flavona prisustvo hidroksilne skupine na položaju 4' prstena B u slučaju apigenina. Položaj akacetina je značajno drugačiji vjerojatno zbog prisustva metoksi skupine u položaju 4' koja zauzima veliki prostor. Unatoč tome, i akacetin je u aktivnom mjestu orijentiran s prstenom B u blizini hemskog željeza (slika 23).

Iako u dostupnoj literaturi nisu pronađeni podaci koji opisuju krizin-dimetileter kao inhibitor enzima CYP, u ovoj studiji je dokazano kako je snizio metaboličku aktivnost ispitivanog enzima CYP3A4 za 39 % (P = 0,049) te je nakon inkubacije s krizin-dimetileterom ostatna aktivnost CYP3A4 bila 61 %. Utvrđivanjem tipa inhibicije ustanovljeno je kako je krizin-dimetileter čisti metabolički inaktivator enzima CYP3A4 (tablica 4) (Šarić Mustapić i sur., 2018.).

Tangeretin, flavon poznat kao glavni sastojak soka od naranče, u ovoj studiji snizio je metaboličku aktivnost enzima CYP3A4 za 58 % (tablica 4). Quintieri i suradnici izvijestili su da nesupstituirani flavon i pentametoksi supstituirani tangeretin, koji nema slobodne hidroksilne skupine na prstenima A i B, stimulira, a ne inhibira metabolizam midazolama (Quentieri i sur., 2008.). Međutim, u ovoj disertaciji ostatna aktivnost CYP3A4 ispitivana je na testosteronu kao marker supstratu. Tangeretin je pokazao statistički značajan inhibicijski učinak na CYP3A4 (P = 0,027). Određivanjem tipa inhibicije utvrđeno je da je tangeretin smanjio aktivnost enzima MBI za 58 % te je ostatna aktivnost CYP3A4 iznosila 42 %. Rezultati ove studije, u skladu su s rezultatima Obermeiera i suradnika. U toj studiji oni su izvijestili da je tangeretin inhibirao oksidaciju nifedipina, posredovanu s CYP3A4 u humanim mikrosomima jetre, nekompetitivnom inhibicijom s konstantama inhibicije od 72 μM (Obermeier i sur., 1995.). Međutim, Takanaga i suradnici nisu izvijestili o utjecaju tangeretina, niti kao aktivatora niti kao inhibitora aktivnosti CYP3A4, kada se testosteron koristi kao marker supstrat na humanim mikrosomima jetre i rekombinantnom CYP3A4 sustavu (Takanaga i sur., 2000.). Zbog navedenih razlika opravdane su preporuke regulatornih

tijela da se prilikom ispitivanja aktivnosti CYP3A4 koriste najmanje dva marker supstrata (Šarić Mustapić i sur., 2018.).

Iako je farmakokinetika pinocembrina ranije ispitivana (Cao i sur., 2015.), prema do sada dostupnim literaturnim podacima nije zabilježena inhibicija enzima CYP3A4. Zbog toga je od iznimne važnosti podatak da je u ovoj studiji pinocembrin smanjio enzimsku aktivnost CYP3A4 za čak 50 % (tablica 4) (Šarić Mustapić i sur., 2018.). Rezultati ove studije ukazuju kako je u slučaju flavanona za inhibiciju potrebna disupstitucija prstena A hidroksilnim skupinama na položajima 5 i 7, pri čemu prsten B ne smije biti supstituiran.

S obzirom na strukturna svojstva odgovorna za inhibicijski učinak, temeljem rezultata ove disertacije može se primijetiti da flavoni moraju biti disupstituirani na prstenu A i to na položajima 5 i 7, kako bi se uočio statistički značajan inhibicijski učinak bez obzira na prisutnu skupinu (metoksi ili hidroksilnu). Međutim, rezultati također pokazuju kako je inhibicija izraženija ako se radi o disupstituciji hidroksilnim skupinama. S druge strane, supstitucija prstena B, u slučaju flavona, nije značajna za inhibiciju enzima CYP3A4 (Šarić Mustapić i sur., 2018.).

U slučaju flavonola, u ovoj disertaciji uočeno je kako disupstituirani flavonoidi na položajima 3' i 4' prstena B ne utječu na aktivnost enzima, ako su oba supstituenta hidroksilne skupine (kvercetin i ramnetin), povećavaju aktivnost enzima ako je supstituent na položaju 4' veći od supstituenta na položaju 3' (tamariksetin) dok je inhibicija opažena kada je supstituent na položaju 3' veći od onog na položaju 4' (izoramnetin). Izoramnetin je jedini flavonol koji je pokazao statistički značajan inhibicijski učinak koji smanjuje aktivnost preostalog enzima na 73 % (tablica 4). U posljednje vrijeme, izoramnetin je intenzivno proučavan kao pomoćno sredstvo u liječenju karcinoma pluća, a u kombinaciji s cisplatinom i karboplatinom (Zhang i sur., 2015.). Osim toga, pokazao se djelotvornim protiv influence, kao i sredstvo za ublažavanje artritisa (Abdal Dayem i sur., 2015., Wang i sur., 2015.). Ekstrand i suradnici koristili su svinjski životinjski model za određivanje utjecaja izoramnetina ovisno o spolu. Utvrđeno je da je inhibicija kompetitivna s konstantama inhibicije od 71 i 94 μM za muške i ženske svinje. Pri koncentracijama od 16 μM nisu uočili nikakvu kompetitivnu inhibiciju (Ekstrand i sur., 2015.) što je u skladu s rezultatima ove disertacije. Međutim, pri koncentracijama izoramnetina manjim od 1 μM primijetili smo inhibiciju ovisnu o metabolizmu koja nije prethodno opisana u dostupnoj literaturi (Šarić Mustapić i sur., 2018.).

Iako je predmet ove disertacije inhibicija enzima, ne smije se zanemariti značajno stimulativno djelovanje tamariksetina na enzimsku aktivnost CYP3A4, gdje je ostatna aktivnost bila čak 195 % (tablica 4). Prema dostupnim podacima vidljivo je da je tamariksetin ranije proučavan zbog pozitivnog utjecaja na ljudsko zdravlje. Dokazano je njegovo protuupalno djelovanja te prevencija bakterijske sepse povećanim stvaranjem interleukina 10 (Park i sur., 2018.), kao i antikancerogeno djelovanje na humanim stanicama leukemije (Nicolini i sur., 2014.). Rezultati ove disertacije, koji pokazuju stimulaciju aktivnosti CYP3A4 u prisutnosti tamariksetina, suprotni su rezultatima istraživanja koje su proveli von Moltke i suradnici, gdje je primijećeno 50 % inhibicije pri koncentraciji ispod 10 μg/L (von Moltke i sur., 2004.). Iako se stimulacija *in vitro* rijetko primjećuje, objavljeno je da je antikancerogeni lijek gefitinib potentni stimulator CYP3A4 (van Waterschoot i sur., 2009., Šarić Mustapić i sur., 2018.).

TDI su pokazali akacetin, apigenin i krizin, pri čemu su ostatne aktivnosti CYP3A4 redom iznosile 57 ± 10 % (P = 0,047), 34 ± 10 % (P = 0,005) i 45 ± 3 % (P = 0,019). Međutim, nije uočena statistički značajna razlika u ostatnoj aktivnosti enzima CYP3A4 za apigenin između MBI i TDI, što dokazuje da je apigenin čisti reverzibilni inhibitor CYP3A4. S druge strane, TDI nije zabilježena s krizin-dimetileterom, izoramnetinom, pinocembrinom i tangeretinom, što ukazuje na činjenicu kako su ta četiri flavonoida ireverzibilni inhibitori CYP3A4 (Šarić Mustapić i sur., 2018.). Inhibicija ovisna o vremenu iznimno je rijetka za humane citokrome P450 i prethodno je, prema dostupnim podacima, dokazana samo za cilengitid, eksperimentalni antikancerogeni lijek koji se koristi za liječenje glioblastoma, i CYP3A4 u kojem je inhibitor bio u iznimno visokoj milimolarnoj koncentraciji (Bojić i sur., 2014.).

Primjenom RF metode strojnog i statističkog učenja, u dobivenom klasifikacijskom modelu, izabrani su oni deskriptori koji određuju inhibicijski učinak flavonoida na enzim CYP3A4. Rezultati su pokazali, kako je čak četiri, od pet najviše rangiranih deskriptora u QSAR modelu inhibicije CYP3A4 flavonoidima, povezano s prstenom B osnovne strukture flavonoida (R2). Svi odabrani deskriptori ukazuju na to da je za značajnu inhibiciju CYP3A4 potreban što hidrofobniji prsten B. Rezultate QSAR analize dodatno potvrđuje studija molekularnog sidrenja, iz koje je vidljivo kako prsten B stupa u interakciju s hemskim željezom za što je potrebno da taj prsten bude što hidrofobniji. HOMO orbitala (dobivena na suženom skupu) mora osigurati elektron donorska svojstva, koja su potrebna za interakciju s hemskim željezom. Red veze C5-C6 najvjerojatnije reflektira svojstva supstituenta R6 koji

može povećati ili smanjiti aromatski karakter prstena A, odnosno navedene veze. Navedeno je posebice vidljivo u slučaju flavona i flavanona kod kojih se prisutnost supstituenta R6 pokazala od presudne važnosti za inhibicijski potencijal enzima CYP3A4, ali uz obveznu prisutnost supstituenta R8. QSAR analiza pokazala je kako temperatura plamišta (T_F) raste s brojem supstituenata na osnovnoj strukturi flavonoida. Pokazalo se kako flavonoidi koji imaju viši T_F slabije inhibiraju CYP3A4, pri čemu se može pretpostaviti kako je disupstitucija prstena B od presudne važnosti. Navedeno je u skladu s eksperimentalnim rezultatima inhibicije, koji su pokazali kako flavonoidi iz skupine flavonola, najslabije inhibiraju CYP3A4, kao i diosmetin i luteolin iz skupine flavona. Deskriptor χ (R2) opisuje orbitalnu elektronegativnost prstena B osnovne strukture flavonoida. Rezultati QSAR analize pokazuju kako je vrijednost χ (R2) nešto manja kod flavonoida koji su se pokazali kao inhibitori ispitivanog enzima, a čija vrijednost pada s brojem supstituenata na prstenu B. Drugim riječima, iz dobivenih rezultata može se zaključiti kako flavonoidi koji imaju samo jedan (ili niti jedan) supstituent na prstenu B jače inhibiraju CYP3A4 od flavonoida koji imaju dva ili više supstituenata na prstenu B, što je ponovno u skladu s eksperimentalnim rezultatima. Povezanost orbitalne elektronegativnosti s parcijalnim nabojem, koji je jedan od pet najviše rangiranih deskriptora, također je potvrđena QSAR analizom.

CYP1A2

O-deetilacija fenacetina korištena je kao marker reakcija za praćenje aktivnosti enzima CYP1A2. Ispitani su flavonoidi iz skupina flavanona, flavona i flavonola koji su se pokazali kao potentni inhibitori enzima s obzirom na statističku značajnost u pokusu s CYP3A4 ($P < 0,1$). Prilikom ispitivanja MBI, krizin se pokazao kao najznačajniji inhibitor te je smanjio enzimsku aktivnost CYP1A2 za 82 % ($P = 0,004$). Prema intenzitetu inhibicije slijedi morin koji je smanjio aktivnost za 61 % ($P = 0,025$) te hesperetin za 45 % ($P = 0,029$). Također su se prema intenzitetu inhibicije istaknuli pinocembrin i izoramnetin koji su snizili metaboličku aktivnost ispitivanog enzima za 45 % ($P = 0,022$), odnosno 21 % ($P = 0,049$) (tablica 5).

Nakon određivanja sva tri tipa inhibicije, provedena ispitivanja ukazuju na MBI kao posljedicu TDI. Krizin se jedini pokazao kao iznimka, odnosno kao statistički značajan inhibitor prilikom određivanja sva tri tipa inhibicije. S obzirom na to da ne postoji statistički značajna razlika ostatnih aktivnosti, može se zaključiti da većina inhibicije dolazi od DRI,

odnosno da se radi o kompetitivnim inhibitorima gdje dolazi do natjecanja flavonoida sa supstratom za aktivno vezno mjesto enzima.

U ranijim istraživanjima krizin se pokazao kao snažan inhibitor enzima CYP1A1 i CYP1B1, prvenstveno zbog hidroksilne skupine na prstenima A i B i to na položajima 3, 5 i 7, pri čemu posebno važnu ulogu u inhibiciji CYP1B1 ima hidroksilna skupina na položaju 3 (Shimada in sur., 2010.). S obzirom na strukturne karakteristike krizina, pretpostavlja se kako je u slučaju flavona disupstitucija prstena A na položajima 5 i 7 od presudne važnosti za inhibiciju ispitanog enzima CYP1A2, pri čemu prsten B ne smije biti supstituiran.

Kako bi se odredilo potencijalno vezno mjesto te najvjerojatnija konformacija u aktivnom mjestu enzima CYP1A2, u našem laboratoriju proveli smo molekularno sidrenje specija krizina. Sidrenje je provedeno s i bez prisustva molekule vode (HOH 733). Rezultati su pokazali da u slučaju anionske specije kao i u slučaju molekulske specije, HOH 733 ne igra značajnu ulogu te je usidreni položaj s najnižom energijom identičan u oba slučaja (slika 8). S obzirom na to da su energije vezanja za molekulske specije puno niže od anionskih specija, može se zaključiti da je molekulska specija, odnosno njezin metabolit većinski odgovoran za inhibitorni učinak krizina (Bojić i sur., 2019.).

Iz skupine flavonola intenzitetom inhibicije istaknuo se morin koji je smanjio aktivnost CYP1A2 za 61 % (tablica 5), što je u skladu s ranije objavljenim istraživanjima (Tsyrlov i sur., 1994.). Usporedbom strukturnih značajki ostalih ispitanih flavonoida iz navedene skupine, može se uočiti kako je za inhibiciju odgovorna hidroksilacija prstena A i B na položajima 3, 5, 7 i 4', pri čemu je inhibicija značajnija ako je prsten B dodatno supstituiran hidroksilnom skupinom na položaju 2', u odnosu na izoramnetin koji ima metoksi skupinu na položaju 3' te je inhibirao djelovanje enzima za 21 %. Inhibitorni učinak izoramnetina na CYP1A2, potvrdili su Chang i suradnici. Rezultati njihovog istraživanja pokazali su kako izoramnetin inhibira CYP1A2 mješovitom ili kompetitivnom inhibicijom (Chang i sur., 2006.). Međutim, rezultati ove disertacije pokazali su kako se radi o ireverzibilnom inhibitoru, kao što je i slučaj s morinom, što je od većeg kliničkog značaja zbog povećanog rizika od farmakokinetičkih interakcija (Orr i sur., 2012., Rehman i sur., 2017.).

Flavanoni, hesperetin i pinocembrin, u ovom su istraživanju također pokazali inhibicijski potencijal za CYP1A2. Glavni izvori hesperetina su citrusi, pri čemu je isti odgovoran za okus naranče, te je uz naringenin glavni odgovoran za antioksidacijsku

aktivnost citrusa (Kroyer 1986.). Doostdar i suradnici dokazali su kako hesperetin ima selektivni inhibicijski učinak na CYP1A1 i CYP1B1 (Doostdar i sur., 2000.). S obzirom na to da su hesperetin i pinocembrin smanjili metaboličku aktivnost CYP1A2 za 55 % (P = 0,029), odnosno 45 % (P = 0,022), važno je istaknuti da se potentniji inhibitor pokazao flavonoid s disupstituiranim prstenom B.

QSAR analiza supstrata i inhibitora CYP1A2 također je provedena i drugim studijama (Lewis i sur., 2007., Sridhar i sur., 2012., Iori i sur., 2005., Sridhar i sur., 2011., Novotarskyi i sur., 2011., Roy i sur., 2008., Vasanthanathan i sur., 2010., Vasanthanathan i sur., 2009.). Planarnost molekule i molekulska masa pokazali su se ključnima za supstrate, odnosno inhibitore CYP1A2 (Sridhar i sur., 2017.). U sklopu ove disertacije, za isti enzim provedena je i hijerarhijska tvorba klastera, kako bi se utvrdila povezanost učinka ispitanih flavonoida na sve ispitivane enzime CYP (slika 19), o čemu će biti govora u nastavku rasprave.

CYP2A6

Za ispitivanje inhibicije enzima CYP2A6 primijenjena je marker reakcija 7-hidroksilacija kumarina, uz nastajanje karakterističnog metabolita 7-hidroksikumarina. Iz ispitane skupine flavanona niti jedan predstavnik nije pokazao inhibicijski potencijal za CYP2A6. Statistički značajnu MBI pokazali su flavoni apigenin i tangeretin te flavonoli izoramnetin i galangin, pri čemu se tangeretin pokazao kao najjači inhibitor koji je smanjio enzimsku aktivnost CYP2A6 za čak 72 % (P = 0,018) (tablica 5). Iako su rezultati istraživanja, koje su proveli Tiong i suradnici, pokazali značajno smanjen inhibicijski učinak tangeretina na katalitičku aktivnost CYP2A6 u odnosu na druge ispitivane flavone (Tiong i sur., 2010.), rezultati ove disertacije pokazuju upravo suprotno. Razlog iznimno velikom inhibicijskom potencijalu može se pripisati velikom broju metoksi skupina na položajima 5, 6 i 7 prstena A te položaju 4' prstena B, što značajno doprinosi lipofilnosti flavonoida, a time i povećanom inhibicijskom potencijalu.

Uz tangeretin, intenzitetom inhibicije također se istaknuo apigenin koji je snizio metaboličku aktivnost ispitivanog enzima za 53 % (P = 0,037) (tablica 5). Iako su rezultati drugih istraživanja pokazali kako apigenin inhibira CYP2A6, inhibicijom reverzibilnog tipa (Prasopthum i sur., 2015.), temeljem rezultata ove disertacije ustanovljeno je kako apigenin,

kao i svi ostali ispitani flavonoidi, ireverzibilno inhibiraju CYP2A6 o metabolizmu ovisnom inhibicijom (tablica 5).

Dokazano je kako, prisutnost hidroksilne skupine na položaju 3 prstena C osnovne strukture flavonoida te općenito prisutnost većeg broja hidroksilnih skupina, dodatno pojačava inhibicijski učinak flavonola na aktivnost enzima CYP2A6 (Tiong i sur., 2010.). Navedeno podupire rezultat ovog istraživanja, gdje je izoramnetin neznatno manje smanjio aktivnost enzima u usporedbi s tangeretinom i to za čak 71 % (P = 0,025). Galangin je također pokazao inhibicijski potencijal te je snizio metaboličku aktivnost ispitivanog enzima za 53 %, sa statističkom značajnošću od P = 0,039 (tablica 5). Morin se ponovno pokazao kao iznimka, unatoč velikom broju slobodnih hidroksilnih skupina. Tiong i suradnici takav rezultat pripisali su slobodnoj hidroksilnoj skupini na položaju 2' prstena B. Rezultati ispitivanja flavonola podrazumijevaju da položaj i orijentacija slobodne hidroksilne skupine imaju važnu ulogu u inhibiciji CYP2A6 (Tiong i sur., 2010.).

Istraživanja su pokazala kako flavonoli i flavoni koji pokazuju inhibicijske učinke, posjeduju slobodne hidroksilne skupine na položajima 5 i 7 prstena A. Pretpostavlja se da upravo slobodne hidroksilne skupine, naročito na položajima 5 i 7, stupaju u interakciju s aktivnim mjestom (Fe^{3+}) enzima CYP, zbog njegove steričke dostupnosti i odgovarajuće kiselosti. Dodatno se pretpostavlja da planarnost molekula flavonoida iz ove dvije skupine, zbog prisutnosti C2–C3 dvostruke veze u prstenu C njihove osnovne strukture, dodatno doprinosi inhibicijskom potencijalu flavonola i flavona (Tiong i sur., 2010.).

S obzirom na to da, nakon određivanja sva tri tipa inhibicije, ispitivanje DRI i TDI nije pokazalo statistički značajne rezultate (tablica 5), iz provedenih ispitivanja vidljivo je da se u slučaju inhibicije enzima CYP2A6 radi o isključivo metaboličkoj inhibiciji te da su flavonoidi tangeretin, izoramnetin, apigenin i galangin ireverzibilni inhibitori, odnosno metabolički inaktivatori enzima CYP2A6.

Ispitivanjem povezanosti svakog od 56 deskriptora (tablica 17) s ostatnim aktivnostima enzima CYP1A2, CYP2A6 i CYP2C8 (tablice 5 i 6), jedino je u slučaju CYP2A6 utvrđena statistički značajna veza između odabranih deskriptora i ostatne aktivnosti pri MBI. S obzirom na to da su svi deskriptori koji koreliraju s ostatnom aktivnošću ujedno i međusobno korelirani, za QSAR analizu je iskorišten samo E_{HOMO} deskriptor koji pokazuje najveći koeficijent korelacije s ostatnom aktivnošću enzima pri MBI (slika 20). Iz grafa je vidljivo da s porastom HOMO energije raste inhibicijski potencijal. Iz navedenog se može

zaključiti da što je flavonoid bolji elektron donor ima veći inhibicijski potencijal prema CYP2A6. Drugim riječima, najbolji reducensi među flavonoidima bi mogli najsnažnije inhibirati ovaj enzim CYP. Ipak, kako nije riječ o križno validiranom modelu, ne može se govoriti o uzročno-posljedičnoj vezi, odnosno ne može se isključiti slučajna korelacija.

CYP2D6

Za ispitivanje inhibicije enzima CYP2D6, primijenjena je marker reakcija *O*-demetilacija dekstrometorfana uz nastajanje karakterističnog metabolita dekstrorfana. U primijenjenim koncentracijama galangin, tangeretin, flavon, krizin-dimetileter i krizin, snizili su metaboličku aktivnost enzima, dok su morin, izoramnetin, apigenin, pinocembrin, hesperetin i akacetin inducirali djelovanje CYP2D6. Rezultati statističkih proračuna, provedenih pomoću računalnog programa Statistica 7.0. te rezultati statističke značajnosti provedene Studentovim t-testom, nisu pokazali statistički značajan potencijal za inhibiciju CYP2D6 ($P < 0,05$) (tablica 6). Iz navedenog se može zaključiti kako inhibicija ovog enzima, u odnosu na druge ispitane CYP enzime, ukazuje na bitno drugačije mehanizme inhibicije, što bi u nastavku istraživanja trebalo dodatno ispitati.

Primjenom Fisherovog egzaktnog testa utvrđena je statistički značajna razlika između MBI enzima CYP2D6 i svih preostalih enzima CYP, uz iznimku CYP2C8 (slika 19), što dodatno potvrđuje eksperimentalne rezultate ove disertacije. Navedene statističke značajnosti prikazane su u tablici 18.

CYP2C8

Za ispitivanje inhibicije enzima CYP2C8 primijenjena je marker reakcija 6α-hidroksilacija paklitaksela uz nastajanje karakterističnog metabolita 6α-hidroksipaklitaksela. Pang i suradnici dokazali su inhibicijski učinak hesperetina na cDNA-eksprimiranom CYP2C8 u *Escherichia coli*, primjenom karakteristične reakcije 4-metilhidroksilacije tolbutamida (Pang i sur., 2012.). Quintieri i suradnici, također su ispitivali inhibicijski učinak hesperetina na metaboličku aktivnost CYP2C8, koristeći humane jetrene mikrosome te primjenom karakteristične reakcije 6α-hidroksilacije paklitaksela ovisne o koncentraciji (Quintieri i sur., 2011.). Rezultat navedenog istraživanja pokazao je slabi inhibicijski

potencijal hesperetina, što nije u skladu s rezultatima ove disertacije, gdje hesperetin nije pokazao statistički značajnu inhibiciju, kako reverzibilnu tako ni ireverzibilnu (tablica 6). Iako su Quintieri i suradnici također pratili nastajanje metabolita 6α-hidroksipaklitaksela, pretpostavlja se da je razlika u rezultatima posljedica značajno većih koncentracija hesperetina (od 5 do 200 μM) te manjih koncentracija paklitaksela (10 μM), u odnosu na koncentracije koje su se koristile u sklopu ove disertacije. Navedeno je moguće objasniti činjenicom da svaki supstrat može u visokim koncentracijama djelovati kao inhibitor metabolizma drugog ksenobiotika s kojim dijeli metaboličke putove (Bojić 2015.). Stoga su potrebne daljnje studije kako bi se potvrdio učinak hesperetina na metabolizam CYP2C8. Poput hesperetina, ni drugi ispitivani flavanon pinocembrin, nije pokazao statistički značajan inhibicijski potencijal za CYP2C8 (tablica 6).

Krizin se ponovno pokazao kao najznačajniji inhibitor te je smanjio enzimsku aktivnost CYP2C8 za 74 % (P = 0,037). Od ostalih ispitanih flavonoida iz skupine flavona jedino je još krizin-dimetileter pokazao statistički značajnu inhibiciju te je smanjio metabolizam enzima za 69 % (P = 0,04) (tablica 6). Rezultati pokazuju kako je u slučaju flavona za inhibiciju potrebna disupstitucija prstena A na položajima 5 i 7, neovisno radi li se o hidroksilnim ili metoksi skupinama, pri čemu prsten B ne smije biti ni s čim supstituiran. Krizin, koji je na položajima 5 i 7 prstena A disupstituiran hidroksilnim skupinama, pokazao se potentnijim inhibitorom. Galangin je jedini iz skupine flavonola inhibirao CYP2C8 i to za čak 70 % (P = 0,033). S obzirom na strukturne značajke flavonola može se zaključiti, kao i kod flavona, kako prsten B ne smije biti ni s čim supstituiran kako bi se uočila inhibicija CYP2C8.

Budući da ispitivanje DRI i TDI nije pokazalo statistički značajne rezultate (tablica 6), iz provedenih ispitivanja vidljivo je da se u slučaju inhibicije CYP2C8 radi o ireverzibilnom tipu inhibicije koja je ovisna o metabolizmu. Slijedom navedenog može se zaključiti da su krizin, galangin i krizin-dimetileter metabolički inaktivatori enzima CYP2C8.

S obzirom na to da su vrijednosti ostatne enzimske aktivnosti ispitivanih enzima citokrom P450 u većini slučajeva bile iznad 50 %, pri 1 μM koncentracijama flavonoida, za očekivati je da učinak neće biti klinički značajan te iz navedenog razloga ispitivanje enzimske kinetike nije provedeno. U svrhu dodatne provjere, provedena je predikcija inhibicije enzima citokrom P450 primjenom CypRules Servera. Izračunate su vrijednosti predviđanja inhibicije dostupnih enzima citokrom P450 s obzirom na 2D, odnosno 3D strukturu odabranih

flavonoida. Temeljem dostupnih podataka, koji nisu pokazali inhibiciju enzima CYP i rezultata ovog istraživanja, koji su pokazali relativno mali broj flavonoida s inhibicijskim učinkom na metabolizam enzima citokrom P450, izračunavanje kinetičkih parametara ne bi pokazalo statistički relevantne rezultate te inhibicijsku kinetiku i konstante nije bilo potrebno odrediti.

Kako bi se utvrdila povezanost učinka ispitanih flavonoida na sve ispitivane enzime citokrom P450 (CYP3A4, CYP1A2, CYP2A6, CYP2D6 i CYP2C8), provedena je hijerarhijska tvorba klastera. Iz dendrograma (slika 19), točnije iz udaljenosti klastera u dendrogramu, očito je da nema velikih razlika između ostatnih aktivnosti enzima CYP3A4, CYP1A2, CYP2A6 i CYP2C8 te je navedeno dodatno potvrđeno Fisherovim egzaktnim testom. Drugim riječima, ispitivani flavonoidi podjednako uspješno i na sličan način inhibiraju enzime CYP3A4, CYP1A2, CYP2A6 i CYP2C8. Primjenom istog testa utvrđena je statistički značajna razlika između MBI enzima CYP2D6 i svih preostalih CYP enzima, uz iznimku CYP2C8 (tablica 18), što dodatno potvrđuje eksperimentalne rezultate ove disertacije.

QSAR analiza pokazala je kako s porastom orbitalne elektronegativnosti supstituenta R2 (χ(R2)) blago raste ostatna aktivnost enzima, odnosno pada inhibicijski potencijal za enzim CYP3A4. Može se primijetiti kako se deskriptor χ(R2) ponaša kao i deskriptor E_{HOMO}, za koji je utvrđena statistički značajna veza s ostatnim aktivnostima CYP2A6 pri MBI. Iz navedenog se može zaključiti kako bi redukcija željeza u hemu općenito, mogla biti najvjerojatniji mehanizam odgovoran za inhibiciju enzima CYP, a sve kao posljedica aktivacije flavonoida u nekoj oksidaciji koja prethodi MBI.

Dobiveni rezultati QSAR analize doprinose boljem razumijevanju fizičko-kemijskih pozadina biološki važnih svojstava molekula, poput ovdje istraživanih flavonoida te omogućavaju procjenu njihovih vrijednosti i za spojeve koji još nisu sintetizirani. Međutim, temeljem rezultata provedenih QSAR analiza te primjenom krosvalidacije dobivenih modela, može se zaključiti kako bi za postavljanje prediktivnih QSAR modela, u analize trebalo uključiti daleko veći broj ispitivanih spojeva, odnosno flavonoida. S obzirom na razlike u strukturi između pojedinih podskupina flavonoida, za postavljanje pouzdanih QSAR modela, dodatno bi doprinijelo ispitivanje većeg broja flavonoida svake podskupine zasebno. Pri tome bi se križnom validacijom konačnog QSAR modela trebala utvrditi klasifikacijska točnost od najmanje 80 %.

6. ZAKLJUČAK

Primjenom karakterističnih reakcija, u prisutnosti specifičnih marker supstrata pojedinog enzima CYP, ispitan je inhibicijski učinak flavonoida na metaboličku aktivnost enzima CYP3A4, CYP1A2, CYP2A6, CYP2D6 i CYP2C8. Provedene su tri vrste eksperimenata kako bi se utvrdila inhibicija ovisna o metabolizmu, vremenski ovisna inhibicija i izravna inhibicija, odnosno radi li se o reverzibilnoj i/ili ireverzibilnoj inhibiciji.

Sedam, od ukupno trideset ispitanih flavonoida, pokazalo je statistički značajan potencijal za inhibiciju CYP3A4 ($P < 0,05$) te su snizili metaboličku aktivnost enzima. Apigenin se pokazao kao reverzibilni inhibitor, akacetin i krizin kao reverzibilni i ireverzibilni inhibitori, dok su se krizin-dimetileter, izoramnetin, pinocembrin i tangeretin pokazali kao čisti ireverzibilni inhibitori. Rezultati pokazuju kako je za inhibicijski učinak flavona odgovorna disupstitucija na položajima 5 i 7 prstena A, bez obzira na prisutnu skupinu (metoksi ili hidroksilnu), iako se inhibicija pokazala značajnijom ako se radi o disupstituciji hidroksilnim skupinama. U slučaju flavanona, za inhibiciju je također potrebna disupstitucija prstena A hidroksilnim skupinama na položajima 5 i 7, pri čemu prsten B ne smije biti ni s čim supstituiran. S druge strane, u slučaju flavonola, uočeno je kako disupstituirani flavonoidi na položajima 3' i 4' prstena B ne utječu na aktivnost enzima ako su oba supstituenta hidroksilne skupine, povećavaju aktivnost enzima ako je supstituent na položaju 4' veći od supstituenta na položaju 3', dok je inhibicija opažena kada je supstituent na položaju 3' veći od onog na položaju 4'.

U primijenjenim koncentracijama, pet flavonoida (hesperetin, pinocembrin, krizin, izoramnetin i morin), pokazalo je statistički značajan potencijal za inhibiciju CYP1A2 ($P < 0,05$). Krizin se jedini pokazao kao statistički značajan inhibitor prilikom određivanja sva tri tipa inhibicije, dok su se ostali flavonoidi pokazali kao čisti ireverzibilni inhibitori. Rezultati su pokazali kako je u slučaju flavona disupstitucija prstena A na položajima 5 i 7 od presudne važnosti za inhibiciju ispitanog enzima, pri čemu prsten B ne smije biti supstituiran. S druge strane, u slučaju flavonola, za inhibiciju je odgovorna hidroksilacija prstena A i B na položajima 3, 5, 7 i 4', pri čemu je inhibicija značajnija ako je prsten B dodatno supstituiran hidroksilnom skupinom na položaju 2'. Kod flavanona, potentniji inhibitor pokazao se predstavnik s disupstituiranim prstenom B.

Rezultati ispitivanja inhibicije enzima CYP2A6 pokazali su značajan inhibicijski potencijal za četiri flavonoida o metabolizmu ovisnom inhibicijom. Tangeretin, izoramnetin, apigenin i galangin, pokazali su se kao ireverzibilni inhibitori, odnosno metabolički

inaktivatori enzima CYP2A6. Pretpostavlja se da je razlog iznimno velikom inhibicijskom potencijalu tangeretina, velik broj metoksi skupina na položajima 5, 6 i 7 prstena A te položaju 4' prstena B. Dokazano je kako, prisutnost hidroksilne skupine na položaju 3 prstena C te općenito prisutnost većeg broja hidroksilnih skupina, dodatno pojačava inhibicijski učinak flavonola na aktivnost CYP2A6. Flavonoli i flavoni koji pokazuju inhibicijski potencijal posjeduju slobodne hidroksilne skupine na položajima 5 i 7 prstena A.

Prilikom ispitivanja inhibicije enzima CYP2D6, niti jedan ispitivani flavonoid nije pokazao statistički značajan potencijal za inhibiciju ovog enzima. Navedeno ukazuje na bitno drugačije mehanizme inhibicije enzima CYP2D6 u odnosu na ostale ispitane enzime CYP.

Tri flavonoida, krizin, krizin-dimetileter i galangin pokazali su ireverzibilnu inhibiciju aktivnosti enzima CYP2C8. Rezultati su pokazali kako se radi o metaboličkim inaktivatorima navedenog enzima. U slučaju flavona za inhibiciju je potrebna disupstitucija prstena A na položajima 5 i 7, neovisno radi li se hidroksilnim ili metoksi skupinama. Prsten B ne smije biti ni s čim supstituiran u slučaju flavona kao i kod flavonola.

Za najpotentnije inhibitore (akacetin, krizin, apigenin) koji su pokazali statistički značajnu o metabolizmu ovisnu inhibiciju, kao posljedicu izravne inhibicije, primijenjena je metoda molekularnog sidrenja kako bi se pretpostavila potencijalna vezna mjesta te najvjerojatnija konformacija u aktivnom mjestu enzima CYP3A4. Rezultati molekularnog sidrenja pokazuju kako su energije vezanja molekulskih specija u aktivno mjesto CYP3A4 niže od energija vezanja anionskih specija. Položaj apigenina i krizina gotovo je identičan, s obzirom na to da je jedina strukturna razlika između ova dva flavona prisustvo hidroksilne skupine na položaju 4' prstena B u slučaju apigenina. Položaj akacetina je nešto drugačiji, vjerojatno zbog prisustva metoksi skupine na položaju 4' koja zauzima veliki prostor. Unatoč tome, i akacetin je u aktivnom mjestu orijentiran s prstenom B u blizini hemskog željeza.

Regresijska QSAR RF analiza pokazala je da je broj ispitanih flavonoida nedostatan za pouzdanu predikciju iznosa ostatne aktivnosti, odnosno da su mehanizmi inhibicije CYP3A4 suviše heterogeni, dok su u dobivenom RF klasifikacijskom modelu izabrani oni deskriptori koji određuju inhibicijski učinak flavonoida na enzim CYP3A4. Čak četiri od pet najviše rangiranih deskriptora povezano je s prstenom B osnovne strukture flavonoida (R2). Pri tome svi odabrani deskriptori ukazuju da je za značajnu inhibiciju CYP3A4 potreban što hidrofobniji prsten B koji stupa u interakciju s hemskim željezom. Navedeno je dodatno potvrđeno studijom molekularnog sidrenja. Red veze C5-C6 najvjerojatnije reflektira svojstva

supstituenta R6 koji može povećati ili smanjiti aromatski karakter prstena A što je posebice vidljivo u slučaju flavona i flavanona, kod kojih se prisutnost supstituenta R6 pokazala od presudne važnosti za inhibicijski potencijal enzima CYP3A4, ali uz obveznu prisutnost supstituenta R8. QSAR analiza pokazala je kako temperatura plamišta raste s brojem supstituenata na osnovnoj strukturi flavonoida, što je obrnuto proporcionalno inhibicijskom potencijalu, uz pretpostavku o odlučujućem učinku disupstitucije prstena B. Orbitalna elektronegativnost prstena B osnovne strukture flavonoida također se može povezati s brojem supstituenata na prstenu B, pri čemu je vrijednost nešto manja kod flavonoida koji su se pokazali kao inhibitori ispitivanog enzima te pada s brojem supstituenata na prstenu B.

S obzirom na omjer broja ulaznih varijabli (deskriptora) i broja ispitanih flavonoida, a u svrhu utvrđivanja povezanosti učinka ispitanih flavonoida na ispitivane enzime citokrom P450 (CYP3A4, CYP1A2, CYP2A6, CYP2D6 i CYP2C8), provedena je hijerarhijska tvorba klastera. Iz dobivenih rezultata vidljivo je da ispitivani flavonoidi podjednako uspješno i na sličan način inhibiraju sve ispitane enzime citokrom P450 koji su u njihovoj prisutnosti pokazali smanjenu metaboličku aktivnost (CYP3A4, CYP1A2, CYP2A6, CYP2C8). Navedeno je potvrđeno Fisherovim egzaktnim testom čijom primjenom je dodatno utvrđena statistički značajna razlika između metabolizmom posredovane inhibicije enzima CYP2D6 i svih preostalih enzima CYP, uz iznimku CYP2C8.

Dodatno je ispitana povezanost svakog od odabranih deskriptora s ostatnim aktivnostima ispitanih enzima CYP. Jedino je u slučaju CYP2A6 utvrđena statistički značajna povezanost ostatne aktivnosti s energijom najviše popunjene molekulske orbitale. Drugim riječima, iz dobivenih rezultata pretpostavlja se kako bi najbolji reducensi među flavonoidima mogli najsnažnije inhibirati ovaj CYP enzim.

QSAR analiza pokazala je kako s porastom orbitalne elektronegativnosti supstituenta R2, blago raste ostatna aktivnost enzima, odnosno pada inhibicijski potencijal za enzim CYP3A4 te se ponaša kao i deskriptor E_{HOMO}, za koji je utvrđena statistički značajna veza s ostatnim aktivnostima CYP2A6 u slučaju inhibicije ovisne o metabolizmu. Iz navedenog se može zaključiti kako bi redukcija željeza u hemu, općenito, mogla biti najvjerojatniji mehanizam odgovoran za inhibiciju enzima CYP, a sve kao posljedica aktivacije flavonoida u nekoj oksidaciji koja prethodi o metabolizmu ovisnoj inhibiciji enzima.

S obzirom na rezultate provedenih QSAR analiza, može se zaključiti kako bi za postavljanje prediktivnih QSAR modela, u analize trebalo uključiti daleko veći broj ispitivanih flavonoida. Osim toga bilo bi značajno zasebno ispitati svaku pojedinu podskupinu flavonoida, kako bi se mogli donijeti pouzdani zaključci o metabolizmu i inhibicijskom potencijalu drugih flavonoida koji nisu bili uključeni u ovo istraživanje.

7. POPIS LITERATURE

- Abdal Dayem A, Choi HY, Kim YB, Cho SG (2015) Antiviral effect of methylated flavonol isorhamnetin against influenza. PLoS One. 10: 1–21.
- Ai G, Liu Q, Hua W, Huang Z, Wang D (2013) Hepatoprotective evaluation of the total flavonoids extracted from flowers of *Abelmoschus manihot (L.)* Medic: *In vitro* and *in vivo* studies. J Ethnopharmacol. 146: 794–802.
- Atherton KM, Mutch E, Ford D (2006) Metabolism of the soyabean isoflavone daidzein by CYP1A2 and the extra-hepatic CYPs 1A1 and 1B1 affects biological activity. Biochem Pharmacol. 72: 624–631.
- Bailey DG, Arnold JM, Munoz C, Spence JD (1993) Grapefruit juice-felodipine interaction: mechanism, predictability, and effect of naringin. Clin Pharmacol Ther. 53: 637–642.
- Beecher GR (2003) Overview of dietary flavonoids: Nomenclature, occurrence and intake. J Nutr. 133: 3248S–3254S.
- Benavente-Garcia O, Castillo J (2008) Update on uses and properties of citrus flavonoids: new findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. J Agric Food Chem. 56: 6185–6205.
- Bojić M (2012) Laboratorijsko ispitivanje i računalno simuliranje antiagregacijskog učinka polifenola, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, doktorska disertacija
- Bojić M (2015) Predklinička ispitivanja inhibicijskog i interakcijskog potencijala novih lijekova na razini citokroma P450. Farm Glas. 71: 229–242.
- Bojić M, Barbero L, Dolgos H, Freisleben A, Gallemann D, Riva S, Guengerich FP (2014) Time- and NADPH-dependent inhibition of cytochrome P450 3A4 by the cyclopentapeptide cilengitide: significance of the guanidine group and accompanying spectral changes. Drug Metab Dispos. 42: 1438–1446.
- Bojić M, Debeljak Ž., Medić-Šarić M, Tomičić M (2012) Interference of selected flavonoid aglycons in platelet aggregation assays. Clin Chem Lab Med. 50: 1403–1408.
- Bojić M, Debeljak Z, Tomičić M, Medić-Šarić M, Tomić S (2011) Evaluation of antiaggregatory activity of flavonoid aglycone series. Nutr J. 10: 1–8.
- Boonruang S, Prakobsri K, Pouyfung P, Srisook E, Prasopthum A, Rongnoparut P, Sarapusit S (2017) Inhibition of human cytochromes P450 2A6 and 2A13 by flavonoids, acetylenic thiophenes and sesquiterpene lactones from *Pluchea indica* and *Vernonia cinerea*. J Enzyme Inhib Med Chem. 32: 1136–1142.

- Bors W, Heller W, Michel C, Saran M (1990) Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. Methods Enzymol. 186: 343–355.
- Breiman L (2001) Random forests. Machine Learn. 45: 5–32.
- Breiman L, Cutler A (2005) www.math.usu.edu/adele/forests, pristupljeno 17.05.2019.
- Bryliakov KP, Talsi E (2014) Active sites and mechanisms of bioinspired oxidation with H_2O_2, catalyzed by non-heme Fe and related Mn complexes. Coord Chem Rev. 276: 73–96
- Busby WFJr, Ackermann JM, Crespi CL (1999) Effect of methanol, ethanol, dimethyl sulfoxide, and acetonitrile on *in vitro* activities of CDNA-expressed human cytochromes P-450. Drug Metab Dispos. 27: 246–249.
- Cao G, Ying P, Yan B, Xue W, Li K, Shi A, Sun T, Yan J, Hu X (2015) Pharmacokinetics, safety, and tolerability of single and multiple-doses of pinocembrin injection administered intravenously in healthy subjects. J Ethnopharmacol. 168: 31–36.
- Cao L, Kwara A, Greenblatt DJ (2017) Metabolic interactions between acetaminophen (paracetamol) and two flavonoids, luteolin and quercetin, through *in vitro* inhibition studies. J Pharm Pharmacol. 69: 1762–1772.
- Carbó-Dorca R, Robert D, Amat L, Girones X, Besalu E (2000) Molecular Quantum Similarity in QSAR and Drug Design. 1st edition. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Carrasco R, Padrón JA, Gálvez J (2004) Definition of a novel atomic index for QSAR: the refractotopological state. J Pharm Pharm Sci. 7: 19–26.
- Castell M, Pérez-Cano FJ, Abril-Gil M, Franch À (2014) Flavonoids on allergy. Curr Pharm Des. 20: 973–987.
- Cawley GC, Talbot NLC (2010) On Over-fitting in Model Selection and Subsequent Selection Bias in Performance Evaluation. J Machine Learn Res. 11: 2079–2107.
- Cermak R (2008) Effect of dietary flavonoids on pathways involved in drug metabolism. Expert Opin Drug Metab Toxicol. 4: 17–35.
- Chang TKH, Chen J, Yeung EYH (2006) Effect of *Ginkgo biloba* extract on procarcinogen-bioactivating human CYP1 enzymes: identification of isorhamnetin, kaempferol, and quercetin as potent inhibitors of CYP1B1. Toxicol Appl Pharmacol. 213: 18–26.

- Chauret N, Gauthier A, Nicoll-Griffith DA (1998) Effect of common solvents on *in vitro* cytochrome P450-mediated metabolic activities in human liver microsomes. Drug Metab Dispos. 26: 1–4.
- Chen J, Mangelinckx S, Adams A, Wang ZT, Li WL, De Kimpe N (2015) Natural flavonoids as potential herbal medication for the treatment of diabetes mellitus and its complications. Nat Prod Commun. 10: 187–200.
- Chen Y, Xiao P, Ou-Yang DS, Fan L, Guo D, Wang YN, Han Y, Tu JH, Zhou G, Huang YF, Zhou HH (2009) Simultaneous action of the flavonoid quercetin on cytochrome P450 (CYP) 1A2, CYP2A6, N-acetyltransferase and xanthine oxidase activity in healthy volunteers. Clin Exp Pharmacol Physiol. 36: 828–833.
- D'Archivio M, Filesi C, Di Benedetto R, Gargiulo R, Giovannini C, Masella R (2007) Polyphenols, dietary sources and bioavailability. Ann Ist Super Sanita. 43: 348–361.
- Debeljak Ž (2006) Matematički modeli u dizajnu antimikrobnog učinka 3, 4-disupstituiranih kumarina, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, doktorska disertacija
- de Camargo AC, Regitano-d'Arce MAB, Rasera GB, Canniatti-Brazaca SG, do Prado-Silva L, Alvarenga VO, Sant'Ana AS, Shahidi F (2017) Phenolic acids and flavonoids of peanut by-products: Antioxidant capacity and antimicrobial effects. Food Chem. 237: 538–544.
- de Graaf C, Pospisil P, Pos W, Folkers G, Vermeulen NP (2005) Binding mode prediction of cytochrome P450 and thymidine kinase protein-ligand complexes by consideration of water and rescoring in automated docking. J Med Chem. 48: 2308–2318.
- Delaporte E, Rodrigues AD (2001) Current Protocols in Pharmacology. Current Protocols in Pharmacology, John Wiley & Sons, Inc.
- de Lima Toccafondo Vieira M, Huang SM (2012) Botanical-drug interactions: a scientific perspective. Planta Med. 78: 1400–1415.
- Devillers J, Balaban AT (1999) Topological Indices and Related Descriptors in QSAR and QSPR. Gordon and Breach Science Publishers, Amsterdam.
- Ding HW, Huang AL, Zhang YL, Li B, Huang C, Ma TT, Meng XM, Li J (2017) Design, synthesis and biological evaluation of hesperetin derivatives as potent anti-inflammatory agent. Fitoterapia. 121: 212–222.
- Doostdar H, Burke MD, Mayer RT (2000) Bioflavonoids: selective substrates and inhibitors for cytochrome P450 CYP1A and CYP1B1. Toxicology. 144: 31–38.

- Draper AJ, Madan A, Parkinson A (1997) Inhibition of coumarin 7-hydroxylase activity in human liver microsomes. Arch Biochem Biophys. 341: 47–61.
- Dugas AJ Jr, Castañeda-Acosta J, Bonin GC, Price KL, Fischer NH, Winston G (2000) Evaluation of the total peroxyl radical-scavenging capacity of flavonoids: structure-activity relationships. J Nat Prod. 63: 327–331.
- Ekstrand B, Rasmussen MK, Woll F, Zlabek V, Zamaratskaia G (2015) *In vitro* gender-dependent inhibition of porcine cytochrome P450 activity by selected flavonoids and phenolic acids. Biomed Res Int. 2015: 1–7.
- Esmaeili AH, Hajizadeh Moghaddam A, Chaichi MJ (2014) Identification, determination, and study of antioxidative activities of hesperetin and gallic acid in hydro-alcoholic extract from flowers of *Eriobotrya japonica* (Lindl.). Avicenna J Phytomed. 4: 260–266.
- Falcone Ferreyra ML, Rius SP, Casati P (2012) Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. Front Plant Sci. 3: 1–15.
- Ferrer J, Austin M, Stewart C J, Noel J (2008) Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids. Plant Physiol. Biochem. 46: 356–370.
- Firuzi O, Lacanna A, Petrucci R, Marrosu G, Saso L (2005) Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by "ferric reducing antioxidant power" assay and cyclic voltammetry. Biochim Biophys Acta. 1721: 174–84.
- Foster BC, Vandenhoek S, Hana J, Krantis A, Akhtar MH, Bryan M, Budzinski JW, Ramputh A, Arnason JT (2003) *In vitro* inhibition of human cytochrome P450-mediated metabolism of marker substrates by natural products. Phytomedicine 10: 334–342.
- Franco DM, Silva EM, Saldanha LL, Adachi SA, Schley TR, Rodrigues TM, Dokkedal AL, Nogueira FT, Rolim de Almeida LF (2015) Flavonoids modify root growth and modulate expression of SHORT-ROOT and HD-ZIP III. J Plant Physiol. 188: 89–95.
- Friščić M, Štibrić Baglama M, Milović M, Hazler Pilepić K, Maleš Ž (2018) Content of bioactive constituents and antioxidant potential of *Galium* L. Species. Croat Chem Acta. 91: 411–417.
- Fuhr U, Klittich K, Staib AH (1993) Inhibitory effect of grapefruit juice and its bitter principal, naringenin, on CYP1A2 dependent metabolism of caffeine in man. Br J Clin Pharmacol. 35: 431–436.

- Gharagheizi F, Alamdari RF (2008) Prediction of Flash Point Temperature of Pure Components Using a Quantitative Structure–Property Relationship Model. QSAR & Comb Sci. 27: 679–683
- Grange JM, Davey RW (1990) Antibacterial properties of propolis (bee glue). J R Soc Med. 83: 159–60.
- Grimm SW, Einolf HJ, Hall SD, He K, Lim HK, Ling KH, Lu C, Nomeir AA, Seibert E, Skordos KW, Tonn GR, Van Horn R, Wang RW, Wong YN, Yang TJ, Obach RS (2009) The conduct of *in vitro* studies to address time-dependent inhibition of drug-metabolizing enzymes: a perspective of the pharmaceutical research and manufacturers of America. Drug Metab Dispos. 37: 1355–1370.
- Gomez-Chang E, Uribe-Estanislao GV, Martinez-Martinez M, Gálvez-Mariscal A, Romero I (2018) Anti-Helicobacter pylori Potential of Three Edible Plants Known as Quelites in Mexico. J Med Food. 21: 1150–1157.
- González R, Ballester I, López-Posadas R, Suárez MD, Zarzuelo A, Martínez-Augustin O, Sánchez de Medina F (2011) Effects of flavonoids and other polyphenols on inflammation. Crit Rev Food Sci Nutr. 51: 331–62.
- Guengerich FP (1994) Analysis and characterization of enzymes. U: Principles and Methods of Toxicology (W.A. Hayes, ed.), Raven Press, New York, 1259–1313.
- Guengerich FP (2005) Human cytochrome P450 enzymes. U: Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry. 3rd ed. Ortiz de Montellano PR (ed.), Kluwer Academic/Plenum Press, 377–531.
- Guengerich FP (2008) Cytochrome P450 and chemical toxicology. Chem Res Toxicol 21: 70–83.
- Guengerich FP (2012) Human Cytochrome P450s: The Work of Frederick Peter Guengerich. J Biol Chem. 287: 15798–15800.
- Guengerich FP (2018) Cytochrome P450 research and *The Journal of Biological Chemistry*. Biol Chem. 294: 1671–1680.
- Harborne JB (1993) The Flavonoids: Advances in Research Since 1986. 1st edn. Chapman and Hall, London.
- Harborne JB, Baxter H (1999) The handbook of natural flavonoids, Vols 1 and 2. Chichester, John Wiley and Sons.
- Hasler A, Estabrook R, Murray M, Pikuleva I, Waterman M, Capdevila J, Holla V, Helvig C, Falck JR, Farrell G (1999) Human cytochromes P450. Mol Aspects Med. 20: 1–137.

- Havsteen B (1983) Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. Biochem Pharmacol. 32: 1141–8.
- Havsteen BH (2002) The biochemistry and medical significance of the flavonoids. Pharmacol Ther. 96: 67–202.
- Hawkins DM, Basak SC, Mills D (2003) Assessing Model Fit by Cross-Validation. J Chem Inf Comput Sci. 43: 579-586.
- He L, He F, Bi H, Li J, Zeng S, Luo HB, Huang M (2010) Isoform-selective inhibition of chrysin towards human cytochrome P450 1A2. Kinetics analysis, molecular docking, and molecular dynamics simulations. Bioorg Med Chem Lett. 20: 6008–6012.
- He W, Wu JJ, Ning J, Hou J, Xin H, He YQ, Ge GB, Xu W (2015) Inhibition of human cytochrome P450 enzymes by licochalcone A, a naturally occurring constituent of licorice. Toxicol In Vitro. 29: 1569–1576.
- Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ (2002) Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. J Nutr Biochem. 13: 572–584.
- Hellum BH, Hu Z, Nilsen OG (2007) The induction of CYP1A2, CYP2D6 and CYP3A4 by six trade herbal products in cultured primary human hepatocytes. Basic Clin Pharmacol Toxicol. 100: 23–30.
- Helsby NA, Chipman JK, Gescher A, Kerr D (1998) Inhibition of mouse and human CYP 1A- and 2E1-dependent substrate metabolism by the isoflavonoids genistein and equol. Food Chem Toxicol. 36: 375–382.
- Hermann R, von Richter O (2012) Clinical evidence of herbal drugs as perpetrators of pharmacokinetic drug interactions. Planta Med. 78: 1458–1477.
- Henderson MC, Miranda CL, Stevens JF, Deinzer ML, Buhler DR (2000) In vitro inhibition of human P450 enzymes by prenylated flavonoids from hops, *Humulus lupulus*. Xenobiotica. 30: 235–251.
- Ho PC, Saville DJ, Wanwimolruk S (2001) Inhibition of human CYP3A4 activity by grapefruit flavonoids, furanocoumarins and related compounds. J Pharm Sci. 4: 217–227.
- Hollenberg PF (2002) Characteristics and common properties of inhibitors, inducers, and activators of CYP enzymes. Crit Care Med. 30: 1924–1925.
- Hong H, Xie Q, Ge W, Qian F, Fang H, Shi L, Su Z, Perkins R, Tong W (2008) Mold(2), molecular descriptors from 2D structures for chemoinformatics and toxicoinformatics. J Chem Inf Model. 48: 1337–1344.

- Huey R, Morris GM, Olson AJ, Goodsell DS (2007) A semiempirical free energy force field with charge-based desolvation. J Comput Chem. 28: 1145–1152.
- Hügel HM, Jackson N, May B, Zhang AL, Xue CC (2016) Polyphenol protection and treatment of hypertension. Phytomedicine. 23: 220–231.
- Hypercube Inc. (2002) HyperChem Release 8.0 for Windows, Tools for Molecular Modeling.
- Ionescu CM, Sehnal D, Falginella FL, Pant P, Pravda L, Bouchal T, Svobodová Vařeková R, Geidl S, Koča J (2015) AtomicChargeCalculator: interactive web-based calculation of atomic charges in large biomolecular complexes and drug-like molecules. J Cheminform. 7: 1–13.
- Iori F, da Fonseca R, Ramos MJ, Menziani MC (2005) Theoretical quantitative structure-activity relationships of flavone ligands interacting with cytochrome P450 1A1 and 1A2 isozymes. Bioorg Med Chem. 13: 4366–4374.
- IUPAC, Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. ("Gold Book") (1997) Online verzija: (2019) "Electron affinity“ – pristupljeno 14.02.2020.
- Jayaraman R, Subramani S, Sheik Abdullah SH, Udaiyar M (2018) Antihyperglycemic effect of hesperetin, a citrus flavonoid, extenuates hyperglycemia and exploring the potential role in antioxidant and antihyperlipidemic in streptozotocin-induced diabetic rats. Biomed Pharmacother. 97: 98–106.
- Jeong H, Lee J, Kim S, Yeo YY, So H, Wu H, Song YS, Jang CY, Kim HD, Kim MJ, Chang M (2018) Hepatic Metabolism of Sakuranetin and Its Modulating Effects on Cytochrome P450s and UDP-Glucuronosyltransferases. Molecules. 23: 1–15.
- Kakimoto K, Murayama N, Takenaka S, Nagayoshi H, Lim YR, Kim V, Kim D, Yamazaki H, Komori M, Guengerich FP, Shimada T (2019) Cytochrome P450 2A6 and other human P450 enzymes in the oxidation of flavone and flavanone. Xenobiotica. 49: 131–142.
- Kale A, Gawande S, Kotwal S (2008) Cancer phytotherapeutics: role for flavonoids at the cellular level. Phytother Res. 22: 567–577.
- Kamel A, Harriman S (2013) Inhibition of cytochrome P450 enzymes and biochemical aspects of mechanism-based inactivation (MBI). Drug Discov Today Technol. 10: 177–189.
- Kanno S, Tomizawa A, Hiura T, Osanai Y, Shouji A, Ujibe M, Ohtake T, Kimura K, Ishikawa M (2005) Inhibitory effects of naringenin on tumor growth in human cancer cell lines and sarcoma S-180-implanted mice. Biol Pharm Bull. 28: 527–530.

- Kheradmand E, Hajizadeh Moghaddam A, Zare M (2018) Neuroprotective effect of hesperetin and nano-hesperetin on recognition memory impairment and the elevated oxygen stress in rat model of Alzheimer's disease. Biomed Pharmacother. 97: 1096–1101.
- Kicel A, Kolodziejczyk-Czepas J, Owczarek A, Marchelak A, Sopinska M, Ciszewski P, Nowak P, Olszewska MA (2018) Polyphenol-Rich Extracts from Cotoneaster Leaves Inhibit Pro-Inflammatory Enzymes and Protect Human Plasma Components against Oxidative Stress *In Vitro*. Molecules. 23: 1–18.
- Kier LB, Hall LH (1986) Molecular Connectivity in Structure-Activity Analysis, Research Studies Press/Wiley, New York.
- Kim S, Park TI (2013) Naringenin: a partial agonist on estrogen receptor in T47D-KBluc breast cancer cells. Int J Clin Exp Med. 6: 890–899.
- Kim KY, Kang H (2016) Sakuranetin Inhibits Inflammatory Enzyme, Cytokine, and Costimulatory Molecule Expression in Macrophages through Modulation of JNK, p38, and STAT1. Evid Based Complement Alternat Med. 2016: 1–8.
- Kimura Y, Ito H, Ohnishi R, Hatano T (2010) Inhibitory effects of polyphenols on human cytochrome P450 3A4 and 2C9 activity. Food Chem Toxicol. 48: 429–435.
- Korobkova EA (2015) Effect of natural polyphenols on CYP metabolism: Implication for diseases. Chem Res Toxicol. 28: 1359–1390.
- Kroyer G (1986) The antioxidant activity of citrus fruit peels. Z Ernahrungswiss. 25: 63–69.
- Lee H, Wang HW, Su HY, Hao NJ (1994) The structure–activity relationships of flavonoids as inhibitors of cytochrome P-450 enzymes in rat liver microsomes and the mutagenicity of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline. Mutagenesis. 9: 101–106.
- Lee KS, Kim SK (2013) Direct and metabolism-dependent cytochrome P450 inhibition assays for evaluating drug-drug interactions. J Appl Toxicol. 33: 100–8.
- Lee SH, Park YB, Bae KH, Bok SH, Kwon YK, Lee ES, Choi MS (1999) Cholesterol-lowering activity of naringenin *via* inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase and acyl coenzyme A: cholesterol acyltransferase in rats. Ann Nutr Metab. 43: 173–180.
- Lewis DF, Lake BG, Dickins M (2007) Quantitative structure-activity relationships (QSARs) in inhibitors of various cytochromes P450: The importance of compound lipophilicity. J Enzyme Inhib Med Chem. 22: 1–6.

- Li AP (2002) A review of the common properties of drugs with idiosyncratic hepatotoxicity and the ‘‘multiple determinant hypothesis’’ for the manifestation of idiosyncratic drug toxicity. Chem Biol Interact. 142: 7–23.
- Li Y, Ning J, Wang Y, Wang C, Sun C, Huo X, Yu Z, Feng L, Zhang B, Tian X, Ma X (2018) Drug interaction study of flavonoids toward CYP3A4 and their quantitative structure activity relationship (QSAR) analysis for predicting potential effects. Toxicol Lett. 294: 27-36.
- Li Y, Zhang Y, Wang R, Wei L, Deng Y, Ren W (2017) Metabolic profiling of five flavonoids from Dragon's Blood in human liver microsomes using high-performance liquid chromatography coupled with high resolution mass spectrometry. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 1052: 91–102.
- Liaw A, Wiener M (2002) Classification and Regression by random Forest. R News. 2: 18–22.
- Lin JH, Lu AY (1998) Inhibition and induction of cytochrome P450 and the clinical implications. Clin Pharmacokinet. 35: 361–390.
- Lin JH, Rodrigues AD (2000) *In vitro* models for early studies of drug metabolism. U: Testa B, van de Waterbeemd H, Folkers G, Guy R, E ed.) In Pharmacokinetics Optimization in Drug Research: Biological, Physicochemical and Computational Strategies. John Wiley & Sons, New York, 217–243.
- Liu KH, Kim MJ, Jeon BH, Shon JH, Cha IJ, Cho KH, Lee SS, Shin JG (2006) Inhibition of human cytochrome P450 isoforms and NADPH-CYP reductase *in vitro* by 15 herbal medicines, including *Epimedii herba*. J Clin Pharm Ther. 31: 83–91.
- Liu R, Tam TW, Mao J, Saleem A, Krantis A, Arnason JT, Foster BC (2010) The effect of natural health products and traditional medicines on the activity of human hepatic microsomal-mediated metabolism of oseltamivir. J Pharm Pharm Sci. 13: 43-55.
- Lu WJ, Ferlito V, Xu C, Flockhart DA, Caccamese S (2011) Enantiomers of naringenin as pleiotropic, stereoselective inhibitors of cytochrome P450 isoforms. Chirality. 23: 891–896.
- Lotito S, Frei B (2006) Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: Cause, consequence, or epiphenomenon? Free Radic Biol Med. 41: 1727–1746.
- Magalingam KB, Radhakrishnan AK, Haleagrahara N (2015) Protective Mechanisms of Flavonoids in Parkinson's Disease. Oxid Med Cell Longev. 2015: 1–14.

- Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L (2004) Polyphenols: Food sources and bioavailability. Am J Clin Nutr. 79: 727–747.
- Martens S, Mithöfer A (2005) Flavones and flavone synthases. 66: 2399–2407.
- Martens S, Preuß A, Matern U (2010) Multifunctional flavonoid dioxygenases: Flavonol and anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* L. Phytochemistry. 71: 1040–1049.
- Medić-Šarić M, Franić D, Debeljak Ž (1998) Lipofilnost lijekova. Farm. Glas. 54: 74–79.
- Medić-Šarić M, Jasprica I, Smolčić-Bubalo A, Mornar A (2004) Optimization of Chromatographic Conditions in Thin Layer Chromatography of Flavonoids and Phenolic Acids. Croat Chem Acta. 77: 361–366.
- Middleton E Jr, Chithan K (1994) The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer. U: Harborne JB (ed.) The flavonoids: advances in research since 1986. London, Chapman and Hall 619–652.
- Middleton E Jr, Kandaswami C, Theoharides TC (2000)The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. Pharmacol Rev. 52: 673–751.
- Mihalić Z, Nikolić S, Trinajstić N (1992) Comparative study of molecular descriptors derived from the distance matrix. J Chem Comput Sci. 32: 28–37.
- Mikstacka R, Rimando AM, Dutkiewicz Z, Stefański T, Sobiak S (2012) Design, synthesis and evaluation of the inhibitory selectivity of novel trans-resveratrol analogues on human recombinant CYP1A1, CYP1A2 and CYP1B1. Bioorg Med Chem. 20: 5117–5126.
- Miniscalco A, Lundahl J, Regardh CG, Edgar B, Eriksson UG (1992) Inhibition of dihydropyridine metabolism in rat and human liver microsomes by flavonoids found in grapefruit juice. J Pharmacol Exp Ther. 261: 1195–1199.
- Mintas M, Raić-Malić S, Raos N (2000) Načela dizajniranja lijekova, HINUS, Zagreb, 39–41.
- Miyazawa M, Kinoshita H, Okuno Y (2003) Antimutagenic activity of sakuranetin from *Prunus jamasakura*. J Food Sci. 68: 52–56.
- Molinaro AM, Simon R, Pfeiffer RM (2005) Prediction error estimation: a comparison of resampling methods. Bioinformatics. 21: 3301–3307.

- Moon YJ, Wang X, Morris ME (2006) Dietary flavonoids: effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. Toxicol In Vitro. 20: 187–210.
- Monagas M, Bartolome B, Gomez-Cordoves C (2005) Updated knowledge about the presence of phenolic compounds in wine. Crit Rev Food Sci Nutr. 45: 85–118
- Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, Olson AJ (2009) AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. J Comput Chem. 30: 2785–2791.
- Morris GM, Lim-Wilby M (2008) Molecular docking. Methods Mol Biol. 443: 365–382.
- Mudri I (2006) Optimizacija kinetičkih rezultata *in vitro* modela za ispitivanje biotransformacije lijekova putem citokroma P450, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Magistarski rad.
- Muto S, Fujita K, Yamazaki Y, Kamataki T (2001) Inhibition by green tea catechins of metabolic activation of procarcinogens by human cytochrome P450. Mutat Res. 479: 197–206.
- Nagayoshi H, Murayama N, Kakimoto K, Takenaka S, Katahira J, Lim YR, Kim V, Kim D, Yamazaki H, Komori M, Guengerich FP, Shimada T (2019) Site-specific oxidation of flavanone and flavone by cytochrome P450 2A6 in human liver microsomes. Xenobiotica. 28: 1–12.
- Nguyen S, Huang H, Foster BC, Tam TW, Xing T, Smith ML, Arnason JT, Akhtar H (2014) Antimicrobial and P450 inhibitory properties of common functional foods. J Pharm Pharm Sci. 17: 254–265.
- Nelson DR (2004) Cytochrome P450 nomenclature. Methods Mol Biol. 320: 1-10.
- Nebert DW, Russell DW (2002) Clinical importance of the cytochromes P450. Lancet 360: 1155–1162.
- Nicolini F, Burmistrova O, Marrero MT, Torres F, Hernández C, Quintana J, Estévez F (2014) Induction of G2/M phase arrest and apoptosis by the flavonoid tamarixetin on human leukemia cells. Mol Carcinog. 53: 939–950.
- Novotarskyi S, Sushko I, Korner R, Pandey AK, Tetko IV (2011) A comparison of different QSAR approaches to modeling CYP450 1A2 inhibition. J Chem Inf Model. 51: 1271–1280.
- Obach RS (2000) Inhibition of human cytochrome P450 enzymes by constituents of St. John's Wort, an herbal preparation used in the treatment of depression. J Pharmacol Exp Ther. 294: 88–95.

- Obermeier MT, White RE, Yang CS (1995) Effects of bioflavonoids on hepatic P450 activities. Xenobiotica. 25: 575–584.
- Orr ST, Ripp SL, Ballard TE, Henderson JL, Scott DO, Obach RS, Sun H, Kalgutkar AS (2012) Mechanism-based inactivation (MBI) of cytochrome P450 enzymes: structure-activity relationships and discovery strategies to mitigate drug-drug interaction risks. J Med Chem. 55: 4896–4933.
- Österberg, Norinder U (2000) Prediction of polar surface area and drug transport processes using simple parameters and PLS statistics. J Chem Inf Comput Sci. 40: 1408–1411.
- Padrón JA, Carrasco R, Pellón RF (2002) Molecular descriptor based on a molar refractivity partition using Randic-type graph-theoretical invariant. J Pharm Pharm Sci. 5: 258–266.
- Pang CY, Mak JW, Ismail R, Ong CE (2012) *In vitro* modulatory effects of flavonoids on human cytochrome P450 2C8 (CYP2C8). Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 385: 495–502.
- Park HJ, Lee SJ, Cho J, Gharbi A, Han HD, Kang TH, Kim Y, Lee Y, Park WS, Jung ID, Park YM (2018) Tamarixetin Exhibits Anti-inflammatory Activity and Prevents Bacterial Sepsis by Increasing IL-10 Production. J Nat Prod. 81: 1435–1443.
- Patel S, Mathan JJ, Vaghefi E, Braakhuis AJ (2015) The effect of flavonoids on visual function in patients with glaucoma or ocular hypertension: a systematic review and meta-analysis. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 253: 1841–1850.
- Pietta PG (2000) Flavonoids as antioxidants. J Nat Prod. 63: 1035–1042.
- Prasopthum A, Pouyfung P, Sarapusit S, Srisook E, Rongnoparut P (2015) Inhibition effects of Vernonia cinerea active compounds against cytochrome P450 2A6 and human monoamine oxidases, possible targets for reduction of tobacco dependence. Drug Metab Pharmacokinet. 30: 174–181.
- Promden W, Monthakantirat O, Umehara K, Noguchi H, De-Eknamkul W (2014) Structure and antioxidant activity relationships of isoflavonoids from *Dalbergia parviflora*. Molecules. 19: 2226–2237.
- Quintieri L, Palatini P, Moro S, Floreani M (2011) Inhibition of cytochrome P450 2C8-mediated drug metabolism by the flavonoid diosmetin. Drug Metab Pharmacokinet. 26: 559–568.

- Quintieri L, Palatini P, Nassi A, Ruzza P, Floreani M (2008) Flavonoids diosmetin and luteolin inhibit midazolam metabolism by human liver microsomes and recombinant CYP 3A4 and CYP3A5 enzymes. Biochem Pharmacol. 75: 1426–1437.
- Rahimi R, Nikfar S, Larijani B, Abdollahi M (2005) A review on the role of antioxidants in the management of diabetes and its complications. Biomed Pharmacother. 59: 365–373.
- Rahman A, Korzekwa KR, Grogan J, Gonzalez FJ, Harris JW (1994) Selective biotransformation of taxol to 6 α-hydroxytaxol by human cytochrome P450 2C8. Cancer Res. 54: 5543–5546.
- Randić M (1975) On characterization of molecular branching, J Am Chem Soc. 97: 6609–6615.
- Rastija V (2007) Kromatografska analiza polifenola u vinima Hrvatske, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, doktorska disertacija.
- Ratnasooriya C, Rupasinghe HPV, Jamieson A (2010) Juice quality and polyphenol concentration of fresh fruits and pomace of selected Nov Scotia-grown grape cultivars. Can J Plant Sci. 90: 193–205.
- RCSB Protein Data Bank, https://www.rcsb.org/ - pristupljeno 07.11.2019.
- Rehman SU, Kim IS, Choi MS, Kim SH, Zhang Y, Yoo HH (2017) Time-dependent Inhibition of CYP2C8 and CYP2C19 by Hedera helix Extracts, A Traditional Respiratory Herbal Medicine. Molecules 22: 1241.
- Reinen J, Smit M, Wenker M (2018) Evaluation of Strategies for the Assessment of Drug-Drug Interactions Involving Cytochrome P450 Enzymes. Eur J Drug Metab Pharmacokinet. 43: 737–750.
- Rendić SP, Guengerich FP (2015) Survey of Human Oxidoreductases and Cytochrome P450 Enzymes Involved in the Metabolism of Chemicals. Chem Res Toxicol. 28: 38–42.
- Rendić S, Medić-Šarić M (2013) Metabolizam lijekova i odabranih ksenobiotika. Medicinska naklada, Zagreb.
- Rice-Evans C, Miller NJ (1994) Total antioxidant status in plasma and body fluids. Methods Enzymol. 234: 279–293.
- Riley RJ, Grime K, Weaver R (2007) Time-dependent CYP inhibition. Expert Opin Drug Met. 3: 51–66.
- Roberts BC, Mancera RL (2008) Ligand-protein docking with water molecules. J Chem Inf Model. 48: 397–408.

- Rougée LRA, Mohutsky MA, Bedwell DW, Ruterbories KJ, Hall SD (2017) The Impact of the Hepatocyte-to-Plasma pH Gradient on the Prediction of Hepatic Clearance and Drug-Drug Interactions for CYP2C9 and CYP3A4 Substrates. Drug Metab Dispos. 45: 1008–1018.
- Roy K, Roy PP (2008) Comparative QSAR studies of CYP1A2 inhibitor flavonoids using 2D and 3D descriptors. Chem Biol Drug Des. 72: 370–382.
- Sansen S, Yano JK, Reynald RL, Schoch GA, Griffin KJ, Stout CD, Johnson EF (2007) Adaptations for the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons exhibited by the structure of human P450 1A2. J Biol Chem. 282:14348–55.
- Satoh T, Fujisawa H, Nakamura A, Takahashi N, Watanabe K (2016) Inhibitory Effects of Eight Green Tea Catechins on Cytochrome P450 1A2, 2C9, 2D6, and 3A4 Activities. J Pharm Pharm Sci. 19: 188–197.
- Schrag ML, Wienkers LC (2001) Covalent alteration of the CYP3A4 active site: evidence for multiple substrate binding domains. Arch Biochem Biophys. 391: 49–55.
- Schultz HP (1989) Topological organic chemistry. 1. Graph theory and topological indices of alkanes. J Chem Inf Comput Sci. 29: 227–228.
- Sevrioukova IF, Poulos TL (2017) Structural basis for regiospecific midazolam oxidation by human cytochrome P450 3A4. Proc Natl Acad Sci U S A. 114: 486–491.
- Shao J, Chen J, Li T, Zhao X (2014) Spectroscopic and molecular docking studies of the *in vitro* interaction between puerarin and cytochrome P450. Molecules. 19: 4760–4769.
- Shimada T (2017) Inhibition of Carcinogen-Activating Cytochrome P450 Enzymes by Xenobiotic Chemicals in Relation to Antimutagenicity and Anticarcinogenicity. Toxicol Res. 33: 79–96.
- Shimada H, Eto M, Ohtaguro M, Ohtsubo M, Mizukami Y, Ide T, Imamura Y (2010) Differential mechanisms for the inhibition of human cytochrome P450 1A2 by apigenin and genistein. J Biochem Mol Toxicol. 24: 230–234.
- Shimada T, Kim D, Murayama N, Tanaka K, Takenaka S, Nagy LD, Folkman LM, Foroozesh MK, Komori M, Yamazaki H, Guengerich FP (2013) Binding of diverse environmental chemicals with human cytochromes P450 2A13, 2A6, and 1B1 and enzyme inhibition. Chem Res Toxicol. 26: 517–528.
- Shimada T, Tanaka K, Takenaka S, Murayama N, Martin MV, Foroozesh MK, Yamazaki H, Guengerich FP, Komori M (2010) Structure-function relationships of

inhibition of human cytochromes P450 1A1, 1A2, 1B1, 2C9, and 3A4 by 33 flavonoid derivatives. Chem Res Toxicol. 23: 1921–1935.

- Shirzad M, Heidarian E, Beshkar P, Gholami-Arjenaki M (2017) Biological Effects of Hesperetin on Interleukin-6/Phosphorylated Signal Transducer and Activator of Transcription 3 Pathway Signaling in Prostate Cancer PC3 Cells. Pharmacognosy Res. 9: 188–194.
- Shityakov S, Puskás I, Roewer N, Förster C, Broscheit J (2014) Three-dimensional quantitative structure-activity relationship and docking studies in a series of anthocyanin derivatives as cytochrome P450 3A4 inhibitors. Adv Appl Bioinform Chem. 7: 11–21.
- Smolčić-Bubalo A (2007) Nove metode u istraživanju hrvatskog propolisa, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, doktorska disertacija
- Sohl CD, Cheng Q, Guengerich FP (2009) Chromatographic assays of drug oxidation by human cytochrome P450 3A4. Nat Protoc. 4: 1252–1257.
- Spaggiari D, Geiser L, Daali Y, Rudaz S (2014) Phenotyping of CYP450 in human liver microsomes using the cocktail approach. Anal Bioanal Chem. 406: 4875–4887.
- Spencer JP (2003) Metabolism of tea flavonoids in the gastrointestinal tract. J Nutr. 133: 3255S–3261S.
- Sridhar J, Ellis J, Dupart P, Liu J, Stevens CL, Foroozesh M (2012) Development of flavone propargyl ethers as potent and selective inhibitors of cytochrome P450 enzymes 1A1 and 1A2. Drug Metab Lett. 6: 275–284.
- Sridhar J, Foroozesh M, Stevens CL (2011) QSAR models of cytochrome P450 enzyme 1A2 inhibitors using CoMFA, CoMSIA and HQSAR. SAR QSAR Environ Res. 22: 681–697.
- Sridhar J, Goyal N, Liu J, Foroozesh M (2017) Review of Ligand Specificity Factors for CYP1A Subfamily Enzymes from Molecular Modeling Studies Reported to-Date. Molecules. 22: 1–19.
- Srivastava JK, Gupta S (2009) Extraction, characterization, stability and biological activity of flavonoids isolated from chamomile flowers. Mol Cell Pharmacol. 1: 1–15.
- Stracke R, Ishihara H, Huep G, Barsch GHA, Mehrtens F, Niehaus K, Weisshaar B (2007) Differential regulation of closely related R2R3-MYB transcription factors controls flavonol accumulation in different parts of the *Arabidopsis thaliana* seedlings. Plant J. 50: 660–677.

- Stresser DM, Mao J, Kenny JR, Jones BC, Grime K (2014) Expert Opin Drug Metab Toxicol. 10: 157–174.
- Su Q, Sun Y, Ye Z, Yang H, Kong B, Li L (2018) Pinocembrin protects endothelial cells from oxidized LDL-induced injury. Cytokine. 111: 475–480.
- Šarić Mustapić D, Debeljak Ž, Maleš Ž, Bojić M (2018) The Inhibitory Effect of Flavonoid Aglycones on the Metabolic Activity of CYP3A4 Enzyme. Molecules. 23: 1–12.
- Taguchi L, Pinheiro NM, Olivo CR, Choqueta-Toledo A, Grecco SS, Lopes FD, Caperuto LC, Martins MA, Tiberio IF, Câmara NO, Lago JH, Prado CM (2015) A flavanone from *Baccharis retusa* (*Asteraceae*) prevents elastase-induced emphysema in mice by regulating NF-κB, oxidative stress and metalloproteinases. Respir Res. 16: 79.
- Tam TW, Akhtar H, Arnason JT, Cvijovic K, Boon H, Cameron DW, Drouin CE, Jaeger W, Tsuyuki RT, Vohra S, Foster BC (2011) Inhibition of human cytochrome P450 metabolism by blended herbal products and vitamins. J Pharm Pharm Sci. 14: 1–16.
- Tam TW, Liu R, Saleem A, Arnason JT, Krantis A, Foster BC (2014) Cytochrome P450 3A4 and 2D6- mediated metabolism of leisure and medicinal teas. J Pharm Pharm Sci. 17: 294–301.
- Tanaka T (2014) Flavonoids for allergic diseases: present evidence and future perspective. Curr Pharm Des. 20: 879–885.
- Tanaka T, Takahashi R (2013) Flavonoids and asthma. Nutrients. 5: 2128–2143.
- Tang C, Shou M, Rodrigues AD (2000) Substrate-dependent effect of acetonitrile on human liver microsomal cytochrome P40 2C9 (CYP2C9) activity. Drug Metab. Dispos. 28: 567–572.
- Tao J, Shen C, Sun Y, Chen W, Yan G (2018) Neuroprotective effects of pinocembrin on ischemia/reperfusion-induced brain injury by inhibiting autophagy. Biomed Pharmacother. 106: 1003–1010.
- Terrier N, Poncet-Legrand C, Cheynier V (2009) Flavanols, Flavonols and Dihydroflavonols. U: M. V. Moreno-Arribas, M. C. Polo (ed.), Wine Chemistry and Biochemistry, Springer, New York, 463–507.
- Tiong KH, Yiap BC, Tan EL, Ismail R, Ong CE (2010) *In vitro* modulation of naturally occurring flavonoids on cytochrome P450 2A6 (CYP2A6) activity. Xenobiotica. 40: 458–66.

- Todeschini R, Consonni V (2000) Handbook of Molecular Descriptors, Wiley – VCH Verlag GmbH, Weinheim.
- Tournaire C, Croux S, Maurette MT, Beck I, Hocquaux M, Braun AM, Oliveros E. (1993) Antioxidant activity of flavonoids: Efficiency of singlet oxygen (1Δg) quenching. J Photochem Photobiol B. 19: 205–15.
- Trinajstić N (1992) Chemical Graph Theory. CRC Press, Boca Raton
- Tsyrlov IB, Mikhailenko VM, Gelboin HV (1994) Isozyme- and species-specific susceptibility of cDNA-expressed CYP1A P-450s to different flavonoids. Biochim Biophys Acta. 1205: 325–335.
- Ubeaud G, Hagenbach J, Vandenschrieck S, Jung L, Koffel JC (1999) *In vitro* inhibition of simvastatin metabolism in rat and human liver by naringenin. Life Sci. 65: 1403–1412.
- U.S. Food and Drug Administration (FDA), Drug Development and Drug Interactions: Table of Substrates, Inhibitors and Inducers. http://www.fda.gov/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/DevelopmentResources/DrugInteractionsLabeling/ucm093664.htm. – pristupljeno 31.10.2019.
- Václavíková R, Horský S, Simek P, Gut I (2003) Paclitaxel metabolism in rat and human liver microsomes is inhibited by phenolic antioxidants. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 368: 200–209.
- van Acker SA, de Groot MJ, van den Berg DJ, Tromp MN, Donné-Op den Kelder G, van der Vijgh WJ, Bast A (1996) A quantum chemical explanation of the antioxidant activity of flavonoids. Chem Res Toxicol. 9: 1305–12.
- van Acker SA, van den Berg DJ, Tromp MN, Griffioen DH, van Bennekom WP, van der Vijgh WJ, Bast A (1996) Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. Free Radic Biol Med. 20: 331–42.
- van Waterschoot RA, Rooswinkel RW, Sparidans RW, van Herwaarden AE, Beijnen JH, Schinkel AH (2009) Inhibition and stimulation of intestinal and hepatic CYP3A activity: studies in humanized CYP3A4 transgenic mice using triazolam. Drug Metab Dispos. 37: 2305–13.
- Vasanthanathan P, Olsen L, Jorgensen FS, Vermeulen NP, Oostenbrink C (2010) Computational prediction of binding affinity for CYP1A2-ligand complexes using empirical free energy calculations. Drug Metab Dispos. 38: 1347–1354.

- Vasanthanathan P, Taboureau O, Oostenbrink C, Vermeulen NP, Olsen L, Jorgensen FS (2009) Classification of cytochrome P450 1A2 inhibitors and noninhibitors by machine learning techniques. Drug Metab Dispos. 37: 658–664.
- Vauzour D (2014) Effect of flavonoids on learning, memory and neurocognitive performance: relevance and potential implications for Alzheimer's disease pathophysiology. J Sci Food Agric. 94: 1042–1056.
- Vedrina M, Marković S, Medić-Šarić M, Trinajstić N(1997) TAM: a program for the calculation of topological indices in QSPR and QSAR studies. Comp Chem, 21: 355–361.
- von Moltke LL, Weemhoff JL, Bedir E, Khan IA, Harmatz JS, Goldman P, Greenblatt DJ(2004) Inhibition of human cytochromes P450 by components of Ginkgo biloba. J Pharm Pharmacol 56: 1039–44.
- Wang JF, Chou KC (2010) Molecular modeling of cytochrome P450 and drug metabolism. Curr Drug Metab. 11: 342–6.
- Watanabe Y, Fukuyoshi S, Kato K, Hiratsuka M, Yamaotsu N, Hirono S, Gouda H, Oda A (2017) Investigation of substrate recognition for cytochrome P450 1A2 mediated by water molecules using docking and molecular dynamics simulations. J Mol Graph Model. 74: 326–336.
- Weng ZM, Wang P, Ge GB, Dai ZR, Wu DC, Zou LW, Dou TY, Zhang TY, Yang L, Hou J (2017) Structure-activity relationships of flavonoids as natural inhibitors against *E. coli* β-glucuronidase. Food Chem Toxicol. 109: 975–983.
- Wienkers LC, Heath TG (2005) Predicting *in vivo* drug interactions from *in vitro* drug discovery data. Nat Rev Drug Discov. 4: 825–833.
- Wu WY, Li YD, Cui YK, Wu C, Hong YX, Li G, Wu Y, Jie LJ, Wang Y, Li GR (2018) The Natural Flavone Acacetin Confers Cardiomyocyte Protection Against Hypoxia/Reoxygenation Injury via AMPK-Mediated Activation of Nrf2 Signaling Pathway. Front Pharmacol. 9: 497.
- Xu YC, Leung SW, Yeung DK, Hu LH, Chen GH, Che CM, Man RY (2007) Structure-activity relationships of flavonoids for vascular relaxation in porcine coronary artery. Phytochemistry. 68: 1179–88.
- Yano JK, Wester MR, Schoch GA, Griffin KJ, Stout CD, Johnson EF (2004) The structure of human microsomal cytochrome P450 3A4 determined by X-ray crystallography to 2.05-A resolution. J Biol Chem. 279: 38091–4.

- Yuan Y, Qiu X, Nikolić D, Chen SN, Huang K, Li G, Pauli GF, van Breemen RB (2014) Inhibition of human cytochrome P450 enzymes by hops (*Humulus lupulus*) and hop prenylphenols, Eur J Pharm Sci. 53: 55–61.
- Walle T (2004) Absorption and metabolism of flavonoids. Free Radic Biol Med. 36: 829–37.
- Walle T, Ta N, Kawamori T, Wen X, Tsuji PA, Walle UK (2007) Cancer chemopreventive properties of orally bioavailable flavonoids—methylated versus unmethylated flavones, Biochem Pharmacol. 73: 1288–96.
- Wang X, Zhong W (2015) Isorhamnetin attenuates collagen-induced arthritis via modulating cytokines and oxidative stress in mice. Int J Clin Exp Med. 8: 16536–42.
- Zadeh DH (2019) Atomic shells according to ionization energies. J Mol Model. 251: 1-7.
- Zanger UM, Schwab M (2013) Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation, Pharmacol Ther. 138: 103–41.
- Zanger UM, Turpeinen M, Klein K, Schwab M (2008) Functional pharmacogenetics/genomics of human cytochromes P450 involved in drug biotransformation. Anal Bioanal Chem. 392: 1093–1108.
- Zhang HW, Hu JJ, Fu RQ, Liu X, Zhang YH, Li J, Liu L, Li YN, Deng Q, Luo QS, Ouyang Q, Gao N (2018) Flavonoids inhibit cell proliferation and induce apoptosis and autophagy through downregulation of PI3Kγ mediated PI3K/AKT/mTOR/p70S6K/ULK signaling pathway in human breast cancer cells. Sci Rep. 8: 11255.
- Zhang L, Kong Y, Wu D, Zhang H, Wu J, Chen J, Ding J, Hu L, Jiang H, Shen X (2008) Three flavonoids targeting the beta-hydroxyacyl-acyl carrier protein dehydratase from Helicobacter pylori: crystal structure characterization with enzymatic inhibition assay. Protein Sci. 17: 1971–8.
- Zhang S, Yang X, Coburn RA, M. Morris ME (2005) Structure activity relationships and quantitative structure activity relationships for the flavonoid-mediated inhibition of breast cancer resistance protein. Biochem Pharmacol. 70: 627–39.
- Zhang Q, Tang X, Liu Z, Song X, Peng D, Zhu W, Ouyang Z, Wang W (2018) Hesperetin Prevents Bone Resorption by Inhibiting RANKL-Induced Osteoclastogenesis and Jnk Mediated Irf-3/c-Jun Activation. Front Pharmacol. 9: 1028.

- Zhai S, Dai R, Friedman FK, Vestal RE (1998) Comparative inhibition of human cytochromes P450 1A1 and 1A2 by flavonoids, Drug Metab Dispos. 26: 989–92.
- Zhokhova NI, Baskin II, Palyulin VA, Zefirov AN, Zefirov NS (2003) Fragmental descriptors in QSPR: flash point calculations. Russ Chem Bull. 52: 1885–1892.
- Zierau O, Gester S, Schwab P, Metz P, Kolba S, Wulf M, Vollmer G (2002) Estrogenic activity of the phytoestrogens naringenin, 6-(1,1-dimethylallyl) naringenin and 8-prenylnaringenin. Planta Med. 68: 449–51.

8. ŽIVOTOPIS

Darija Šarić Mustapić rođena je 18. siječnja 1986. godine u Zagrebu. Osnovnu školu i XV. gimnaziju (MIOC) završila je u Zagrebu. Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisala je 2004. godine. Diplomski rad pod naslovom „Psihotropna biljna vrsta *Salvia divinorum* Epl. & Jativa - mogućnost primjene u terapiji" izradila je na Zavodu za farmakognoziju, Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Zdenke Kalođera. Obranom diplomskog rada 2010. godine stekla je visoku stručnu spremu i stručno zvanje magistra farmacije. 2004. godine upisala je AROMAVITA učilište za aromaterapiju čiji program je uspješno završila 2005. godine te je osposobljena za zanimanje aromaterapeut. Pripravnički staž za ljekarnike uspješno je odradila tijekom 2010./2011. godine u Zdravstvenoj ustanovi „Ljekarne Lukačin" u Zagrebu. 2011. godine položila je stručni ispit za magistre farmacije pri Ministarstvu zdravstva i socijalne skrbi u Zagrebu. U studenome iste godine upisala je Poslijediplomski doktorski studij na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, smjer biologija. Od 2012. godine do danas zaposlena je u Agenciji za lijekove i medicinske proizvode (HALMED) gdje radi u Odjelu za odobravanje lijekova u Odsjeku za validaciju zahtjeva.

Kao koautorica objavila je 3 znanstvena i 1 pregledni rad, sudjelovala je kao koautorica na domaćim i inozemnih kongresima s 19 radova, od toga 16 postera i 3 predavanja (prilog I). Također, aktivno je sudjelovala na brojnim domaćim i inozemnim kongresima bez rada.

Aktivna je u brojnim društvenim aktivnostima kao članica zagrebačkog ronilačkog kluba „Geronimo", planinarskog društva Sveučilišta „Velebit", speleološkog društva „Velebit", pripadnica specijalističke postrojbe civilne zaštite za spašavanje iz ruševina pri Državnoj Upravi za Zaštitu i Spašavanje (DUZS), članica snowboard kluba „Mladost" i kluba jedrenja na dasci „Tri strijele".

Udana je i majka je dvoje djece.

9. PRILOZI

PRILOG I

Znanstveni i pregledni radovi

1. **Šarić Mustapić D**, Debeljak Ž, Maleš Ž, Bojić M (2018) The Inhibitory Effect of Flavonoid Aglycones on the Metabolic Activity of CYP3A4 Enzyme. Molecules. 223: (2553) 1–12. (prilog II)
2. Maleš Ž, **Šarić D**, Bojić M (2013) Quantitative Determination of Flavonoids and Chlorogenic Acid in the Leaves of *Arbutus unedo* L. Using Thin Layer Chromatography. J Anal Methods Chem. 385473: 1–4.
3. Bojić M, Simon Haas V, **Šarić D**, Maleš Ž (2013) Determination of Flavonoids, Phenolic Acids, and Xanthines in Mate Tea (*Ilex paraguariensis* St.-Hil.). J Anal Methods Chem. 658596: 1–6.
4. **Šarić D**, Kalođera Z, Lacković Z (2010) Psihotropna biljna vrsta *Salvia divinorum* Epl. & Jativa – izvor najpotentnijeg halucinogena u prirodi. Farm Glas. 66: 523–541.

Posteri i predavanja

1. **Šarić Mustapić D**, Maleš Ž, Bojić M (2019) Strukturne karakteristike aglikona flavonoida odgovorne za inhibiciju citokroma P450 3A4. 6. Hrvatski kongres farmacije s međunarodnim sudjelovanjem, Zagreb, Hrvatsko farmaceutsko društvo.
2. Bojić M, Maleš Ž, Kondža M, Rimac H, **Šarić Mustapić D** (2019) Inhibition of cytochrome P450 1A2 by flavonoid aglycones most commonly found in Croatian medicinal plants. Euroanalysis 2019, Istanbul. 445, 1.
3. Kondža M, **Šarić Mustapić D**, Rimac H, Maleš Ž, Bojić M (2019) Inhibicijski učinak flavonoida na aktivnost enzima citokrom P450 2A6. 8. simpozij studenata farmacije i medicinske biokemije, Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet.
4. Rimac H, **Šarić Mustapić D**, Debeljak Ž, Bojić M (2016) Assessment of CYP3A4 Inhibition by Selected Flavonoids - a Molecular Docking Approach. 8th Croatian Congress of Pharmacology with International Participation, Split, Hrvatsko farmakološko društvo.
5. **Šarić Mustapić D**, Bojić M, Debeljak Ž (2016) Utjecaj flavonoida na metaboličku aktivnost enzima CYP3A4. Simpozij studenata doktorskih studija PMF-a, Zagreb, Prirodoslovno-matematički fakultet.

6. Bojić M, **Šarić Mustapić D**, Žuntar I (2016) Flavonoids as cytochrome CYP3A4 inhibitors: how significant is their inhibition potential? 5th Croatian Congress of Toxicology with International Participation, CROTOX 2016, Zagreb, Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada.
7. Bojić M, **Šarić Mustapić D**, Debeljak Ž (2015) Inhibicijski učinak akacetina na metaboličku aktivnost citokroma P450 3A4. Pharmacia, Sarajevo, Pharmaceutical Society of Federation of Bosnia and Herzegovina.
8. Benković G, Rimac H, **Šarić Mustapić D**, Bojić M (2015) Vezanja flavonoidnih aglikona na humani serumski albumin. 5. hrvatski kongres farmacije s međunarodnim sudjelovanjem. Farmaceutska izvrsnost u službi zdravlja, Rovinj, Hrvatsko farmaceutsko društvo.
9. **Šarić Mustapić D**, Bojić M, Debeljak Ž (2015) Utjecaj flavonoida na metaboličku aktivnost enzima CYP3A4. 5. hrvatski kongres farmacije s međunarodnim sudjelovanjem, Farmaceutska izvrsnost u službi zdravlja, Rovinj, Hrvatsko farmaceutsko društvo.
10. Bojić M, Benković G, Rimac H, **Šarić D,** Debeljak Ž (2014) HPLC determination of the structural features of flavonoids responsible for the binding to the human serum albumin. ITP & LACE 2014, Natal, Grupo VLS Print Solution.
11. Bojić M, Mendaš G, Vinković-Vrček I, **Šarić D** (2012) Determination of thiamine, riboflavin, niacin and pyridoxine in flours made from organically and conventionally grown wheat. 7. Encontro Nacional de Cromatografia, Porto, Sociedade Portuguesa de Quimica.
12. **Šarić D**, Bojić M, Strapač M (2012) Jednoznačno razlikovanje benzodiazepina tankoslojnom kromatografijom. IX. susret mladih kemijskih inženjera, Zagreb, Hrvatsko društvo kemijskih inženjera i tehnologa.
13. **Šarić D,** Bojić M, Medić-Šarić M (2011) Chromatographic analysis of hederasaponins in ivy syrups. IOCD Symposium 2011, Cape Town, University of Western Cape.
14. Bojić M, Maleš Ž, **Šarić D** (2011) Primjena stabilnog slobodnog ABTS radikala u određivanju antioksidacijske učinkovitosti listova planike – *Arbutus unedo L.*XXII. hrvatski skup kemičara i kemijskih inženjera, Zagreb, HDKI/Kemija u industriji.
15. Bojić M, Zadro M, **Šarić D**, Debeljak Ž (2011) Primjena numeričke taksonomije u TLC analizi benzodiazepina. XXII. hrvatski skup kemičara i kemijskih inženjera, Zagreb, HDKI/Kemija u industriji.

16. **Šarić D**, Bojić M, Maleš Ž (2010) *A*ntioksidacijski učinak listova planike (*Arbutus Unedo* L.). VIII. susret mladih kemijskih inženjera 2010, Zagreb, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu.
17. **Šarić D**, Bojić M, Buhač T (2010) Određivanje hederakozida C u OTC sirupima na bazi ekstrakta bršljana. 4. Croatian Congress on Pharmacy with International Participation Challenges in Pharmaceutical Sciences and Practice, Zagreb, Hrvatsko farmaceutsko društvo.
18. Buhač T, Vrsalović M, **Šarić D**, Bojić M (2010) Registracija OTC preparata kao garancija kvalitete. 4. Croatian Congress on Pharmacy with International Participation Challenges in Pharmaceutical Sciences and Practice, Zagreb, Hrvatsko farmaceutsko društvo.
19. Bojić M, Zadro M, **Šarić D,** Debeljak Ž (2010) Application of numerical taxonomy in the investigation of benzodiazepines. 4º. Simpósio Brasileiro de Cromatografia e Técnicas Afins (SIMCRO 2010), Campos do Jordão, Instituto internacional de cromatografia.

PRILOG II

molecules

MDPI

Article

The Inhibitory Effect of Flavonoid Aglycones on the Metabolic Activity of CYP3A4 Enzyme

Darija Šarić Mustapić [1,2], Željko Debeljak [3,4], Željan Maleš [5] and Mirza Bojić [6,*]

1 PDS Biology, Faculty of Science, University of Zagreb, Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Croatia; darija.saric.mustapic@halmed.hr
2 Agency for Medicinal Products and Medical Devices, Ksaverska cesta 4, 10000 Zagreb, Croatia
3 Institute of Clinical Laboratory Diagnostics, Osijek University Hospital Center, Josipa Huttlera 4, 31000 Osijek, Croatia; debeljak.zeljko@kbo.hr
4 Department of Pharmacology, School of Medicine, University of Osijek, Cara Hadrijana 10/E, 31000 Osijek, Croatia
5 Department of Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmacy and Biochemistry,University of Zagreb, Schrottova 39, 10000 Zagreb, Croatia; zmales@pharma.hr
6 Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia
* Correspondence: mbojic@pharma.hr; Tel.: +385-1-4818-304

Received: 7 September 2018; Accepted: 5 October 2018; Published: 7 October 2018

check for updates

Abstract: Flavonoids are natural compounds that have been extensively studied due to their positive effects on human health. There are over 4000 flavonoids found in higher plants and their beneficial effects have been shown in vitro as well as in vivo. However, data on their pharmacokinetics and influence on metabolic enzymes is scarce. The aim of this study was to focus on possible interactions between the 30 most commonly encountered flavonoid aglycones on the metabolic activity of CYP3A4 enzyme. 6β-hydroxylation of testosterone was used as marker reaction of CYP3A4 activity. Generated product was determined by HPLC coupled with diode array detector. Metabolism and time dependence, as well as direct inhibition, were tested to determine if inhibition was reversible and/or irreversible. Out of the 30 flavonoids tested, 7 significantly inhibited CYP3A4, most prominent being acacetin that inhibited 95% of enzyme activity at 1 μM concentration. Apigenin showed reversible inhibition, acacetin, and chrysin showed combined irreversible and reversible inhibition while chrysin dimethylether, isorhamnetin, pinocembrin, and tangeretin showed pure irreversible inhibition. These results alert on possible flavonoid–drug interactions on the level of CYP3A4.

Keywords: flavonoids; CYP3A4; HPLC-DAD; testosterone

1. Introduction

Flavonoids are natural compounds abundantly present in nature, widely distributed in seeds, leaves, and flowers of plants. There are over 4000 flavonoids identified to date, which makes them one of the largest groups of natural products known. They present benzo-γ-pyrone derivatives consisting of phenolic and pyrane rings (Table 1). Based on the difference of the basic structure, flavonoids are classified into several groups: flavans, flavanones, isoflavanones, flavones, isoflavones, anthocyanidines, chalcones, and flavonolignans [1].

It is well-known that the polyphenolic compounds, in particular flavonoids, show various beneficial effects on the human health, that have been demonstrated by various studies. Amongst the many promising health benefits, flavonoids have important biological activities—such as antiallergic, anti-inflammatory, antioxidative, antimicrobial, antitumorigenic, and antimutagenic—thus preventing

cancer, heart disease, bone loss, and a number of diseases [2–8]. Antioxidant property of flavonoids has been most extensively studied and structure-activity (SAR) as well as quantitative structure–activity (QSAR) models have been reported [9–13]. SAR studies showed that modification of flavonoids including hydroxylation and *O*-methylation can influence metabolic faith and their in vitro activity [12].

As many xenobiotics, including flavonoids, are metabolized in vivo, they can interfere with the activity of the metabolic enzymes in the human liver and cause potential risks of drug–herbal drug interactions [14–19]. Cytochrome P450 enzymes (CYPs) are the major heme-containing enzyme family and the most important drug-metabolizing enzymes. They play important roles in the metabolism of xenobiotics and the biosynthesis of endogenous molecules (steroids, fatty acids, bile acids, and eicosanoids) [17,20,21]. 75% of the enzymes that metabolize drugs in the human body are cytochrome P450s. Five cytochrome P450s account for 90% of the drug metabolism [22]. The greatest contributor to the biotransformation of drugs is CYP3A4/5 (30.2%), followed by CYP2D6 (20.0%), CYP2C9 (12.8%), CYP1A2 (8.9%), and others [23,24]. Clinically important interactions have been reported between dietary supplements, including functional foods, herbal products, and prescription drugs [25–30].

The aim of the present study was to evaluate the inhibitory effect of thirty flavonoid aglycones, most commonly found in herbal drugs and propolis, on the most important drug metabolizing enzyme CYP3A4. Although flavonoids are found mainly as glycosides in natural sources, they are susceptible to hydrolysis in gut [31]. Thus, they reach systemic circulation as aglycones, and as such are exposed to the cytochrome P450 enzymes. The selection of flavonoid aglycones was arbitrary, and reflects most commonly found aglycones in propolis and herbal medicinal drugs of Lamiaceae family found in Croatia [1].

For enzyme activity assessment testosterone 6β-hydroxylation was used as it represents a marker reaction of CYP3A4 activity. Generated product/metabolite was monitored by high performance liquid chromatography coupled with diode array detector (HPLC-DAD). If the inhibitory effect has been observed, the type of inhibition was determined as this can have repercussion on the possible drug–flavonoid interactions.

2. Results and Discussion

To test the CYP3A4 enzyme inhibition, residual activity was assessed based on the product of the marker reaction generated by monitoring incubations with addition of flavonoid, as a potential inhibitor, vs. incubations without inhibitor. Figure 1 shows an example of the typical inhibitor, chrysin. Positive control (incubation with substrate, and the NADPH generating system) shows production of 6β-hydroxytestosterone as major metabolite of testosterone hydroxylation. Negative control (incubation with substrate and without the NADPH generating system) shows no product generation, confirming that 6β-hydroxytestosterone is product of generated by CYP3A4 enzyme. When chrysin is added to the incubation mixture (containing substrate, and the NADPH generating system), 6β-hydroxytestosterone production is depleted. Troleandomycin, an irreversible inhibitor of CYP3A4, used as a positive control in 25 μM concentration caused complete inhibition of CYP3A4, while 0.15 μM ketoconazole, a direct reversible inhibitor of CYP3A4, reduced enzyme activity by 80 ± 4% ($p < 0.001$).

Screening of all flavonoids was conducted against metabolism dependent inhibition experimental setup, as it includes preincubation required for time dependent inhibition, as well as incubation of flavonoids and marker substrate at the same time, consequently detecting direct inhibition. Seven flavonoids have been shown to inhibit CYP3A4 with statistical significance $p < 0.05$.

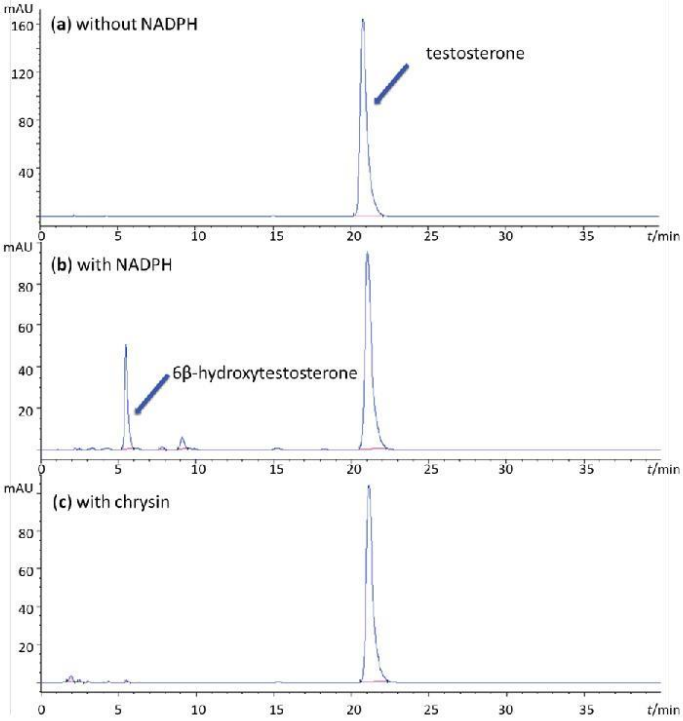


Figure 1. Chromatogram of testosterone oxidation by recombinant baculovirus system with hyper expressed CYP3A4, monitored at 240 nm. (**a**) Incubation without the NADPH-generating system. The testosterone substrate is shown at t_R = 20.7 min. (**b**) Incubation with the NADPH generating system, showing the metabolite, 6β-hydroxytestosterone, at t_R = 5.4 min. (**c**) Incubation with the NADPH-generating system and flavonoid (chrysin). Significant inhibition of the CYP3A4 activity is observed as the production of the major testosterone metabolite is significantly lower (t_R = 5.4 min).

Flavanones acacetin and pinocembrin decreased enzyme activity by 95% and 50% respectively, acacetin being the most prominent inhibitor (Table 1). Acacetin has positive effects cardiomyocyte protection, antibacterial activity as well as anticancer properties [32–34]. Doostdar et al. studied the influence of acacetin on CYP1 family and reported inhibitory effect on CYP1A subfamily and CYP1B1 enzyme [35]. However, there are no reports on CYP3A4 inhibition.

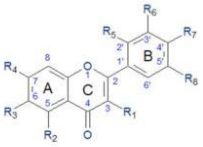
Pinocembrin has been extensively studied due to its positive effects on cardiovascular system. This flavanone protects endothelial cells from oxidized LDL-induced injury, and has neuroprotective effects on ischemia/reperfusion-induced brain injury by inhibiting autophagy [36,37]. Although pharmacokinetic of pinocembrin was studied, no CYP3A4 inhibition was reported [38]. In this study, pinocembrin decreased enzyme activity by 50% (Table 1).

Residual activity of CYP3A4 after incubations with flavones apigenin, chrysin, chrysin dimethyl ether, and tangerine was 24%, 17%, 61%, and 42% (Table 1). Apigenin has been well studied due to it positive effects in prevention of breast cancer, and positive effects on cardio myoblasts and pancreatic cells in pancreatitis [39–43]. At 1 μM concentration, decrease in activity of 76% for was observed apigenin. Reversible inhibition of CYP3A4 by apigenin was reported by Li et al. with an inhibition constant of 6.2 μM, while Kimura et al. reported mix type inhibition [44,45]. Both these studies indicate

importance of reversible inhibition. However, based on our study metabolism dependent inhibition of CYP3A4 by apigenin, here reported for the first time, is of greater importance.

Table 1. Structural characteristics of flavonoids screened as potential inhibitors of CYP3A4 enzyme. Results of screening of metabolism dependent inhibition are expressed as residual enzyme activity when compared to the control without the addition of flavonoid. *p* denotes statistical significance.

Basic Skeleton of Flavonoids



	Flavonoid	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5	R_6	R_7	R_8	Residual Activity (%)	*p*
	Flavanones										
1	Acacetin	H	OH	H	OH	H	H	OCH_3	H	5 ± 4	0.007
2	Flavanone	H	H	H	H	H	H	H	H	86 ± 46	0.361
3	Hesperetin	H	OH	H	OH	H	H	OCH_3	OH	49 ± 19	0.065
4	Pinocembrin-7-methylether	H	OH	H	OCH_3	H	H	H	H	83 ± 2	0.147
5	Pinocembrin	H	OH	H	OH	H	H	H	H	50 ± 15	0.003
6	Sakuranetin	H	OH	H	OCH_3	H	H	OH	H	94 ± 45	0.439
	Flavones										
7	6-hydroxyflavone	H	H	OH	H	H	H	H	H	83 ± 14	0.220
8	7-hydroxyflavone	H	H	H	OH	H	H	H	H	78 ± 14	0.172
9	Apigenin	H	OH	H	OH	H	H	OH	H	24 ± 3	0.013
10	Chrysin	H	OH	H	OH	H	H	H	H	17 ± 3	0.010
11	Chrysin-dimethylether	H	OCH_3	H	OCH_3	H	H	H	H	61 ± 21	0.049
12	Diosmetin	H	OH	H	OH	H	OH	OCH_3	H	172 ± 82	0.169
13	Flavone	H	H	H	H	H	H	H	H	81 ± 16	0.087
14	Luteolin	H	OH	H	OH	H	OH	OH	H	112 ± 31	0.356
15	Naringenin	H	OH	H	OH	H	H	OH	H	65 ± 24	0.155
16	Tangeretin [1]	H	OCH_3	OCH_3	OCH_3	H	H	OCH_3	H	42 ± 3	0.027
17	Techtocrysin	H	OH	H	OCH_3	H	H	H	H	102 ± 15	0.449
	Flavonoles										
18	3,6-dihydroxyflav.	OH	H	OH	H	H	H	H	H	100 ± 14	0.220
19	3,7-dihydroxyflav.	OH	H	H	OH	H	H	H	H	91 ± 27	0.375
20	Galangin	OH	OH	H	OH	H	H	H	H	48 ± 24	0.093
21	Isohramnetin	OH	OH	H	OH	H	OCH_3	OH	H	73 ± 6	0.048
22	Kaempferol	OH	OH	H	OH	H	H	OH	H	101 ± 14	0.449
23	Morin	OH	OH	H	OH	OH	H	OH	H	122 ± 8	0.061
24	Myricetin	OH	OH	H	OH	H	OH	OH	OH	133 ± 35	0.195
25	Quercetin	OH	OH	H	OH	H	OH	OH	H	126 ± 10	0.152
26	Rhamnetin	OH	OH	H	OCH_3	H	OH	OH	H	117 ± 84	0.386
27	Tamarixetin	OH	OH	H	OH	H	OH	OCH_3	H	195 ± 29	0.023
	Isoflavones										
28	Genistein	H	OH	H	OH	H	H	OH	H	72 ± 24	0.179
29	Prunetin	H	OH	H	OCH_3	H	H	OH	H	74 ± 14	0.149
	Catechins [2]										
30	Catechin	OH	OH	H	OH	H	H	OH	OH	98 ± 10	0.441

[1] Additional methoxy group at the position 8. [2] No keto group at the position 4.

Chrysin dimethylether has been reported to have antitrypanosomal and antileishmanial properties while chrysin inhibits diabetic renal tubulointerstitial fibrosis, xanthine oxidase activity, and foam cell formation having potentially positive effects in diabetes, gout, and atherosclerosis [46–49]. Neither chrysin, nor chrysin dimethylether were reported as inhibitors of CYP3A4 previously. Although the effect of chrysin on 1′-hydroxilation of midazolam (another marker reaction of CYP3A4 enzyme) was studied, inhibition of CYP3A4 activity was not observed [50].

Tangeretin, a component of orange juice, has been reported to have positive effects on human health that include antioxidant, antiviral, and anticancer properties [51–53]. Quintieri et al. reported that the nonsubstituted flavone and the pentamethoxy-substituted tangeretin, lacking free hydroxyl

groups in their A and B rings, stimulate, rather than inhibit, the metabolism of midazolam [50]. However, in our study in which residual activity of CYP3A4 was studied on testosterone as marker substrate, an inhibitory effect was observed. Our results are in accordance with Obermeier et al. who reported that tangeretin inhibited CYP3A4 mediated nifedipine oxidation in human liver microsomes in an uncompetitive manner with inhibition constant of 72 μM [54]. Lastly, Takanaga et al. reported no influence of tangeretin, neither activation, nor inhibition, on CYP3A4 activity when using testosterone as marker substrate on human liver microsomes and recombinant CYP3A4 systems [55]. Observed difference justifies recommendations of medicinal products regulatory agencies to use at least two marker substrates when studding CYP3A4 activity [56].

Isorhamnetin was the only flavonol to show inhibitory effect decreasing residual enzyme activity to 73% (Table 1). Isorhamnetin has lately been extensively studied as supportive agent in therapy of non-small cell lung carcinoma when combined with cisplatin and carboplatin by enhancing anticancer properties of platina derivatives and apoptosis [57]. On animal models, it has been also shown acts against influenza as well as attenuates collagen induced arthritis [58,59]. Ding et al. did not observe change in activity of CYP3A4 treated with isorhamnetin on hepatocyte carcinoma cell line HepG2 [60]. Ekstrand et al. [61] used a porcine animal model to assess the influence of isorhamnetin depending on the gender. Inhibition was assessed to be competitive with inhibition constants of 71 and 94 μM for male and female pigs, respectively. Under 16 μM concentration no competitive inhibition was observed, which is in accordance with our results [61]. However, under 1 μM concentration of isorhamnetin, we have observed metabolism dependent inhibition that has not been previously reported.

Interestingly, stimulation of enzyme activity of CYP3A4 was observed with tamarixetin; observed residual activity was 195% (Table 1). Tamarixetin exhibits anti-inflammatory activity, and prevents bacterial sepsis by stimulating immune system and interleukin 10 production [62]. It also has anticancer properties on human leukemia cells [63]. Li et al. have shown that tamarixetin has no influence on CYP3A4 induction through pregnane X receptor, constitutive androstane receptor, and aryl hydrocarbon receptor [64]. Our observation of stimulation of CYP3A4 activity by tamarixetin is in contrast to von Moltke et al. who observed 50% inhibition at sub 10 μM concentration [65]. Although stimulation in vitro (not mediated by increased induction of enzyme in vivo) is rarely observed, it has been reported that anticancer drug gefitinib is a potent stimulator of CYP3A4 [66].

Looking at the structural features responsible for the inhibitory effect (Table 1, Figure 2), it can be observed that flavanones and flavones hydroxylated at the positions 5 and 7 of the A ring, and monosubstituted at the position 4′ of the B ring, decrease CYP3A4 enzyme activity regardless of group present (methoxy or hydroxyl) e.g., acacetin and apigenin. As the hydroxyl group at the B ring is nonionizable under the physiological pH, hydrophobic interactions of the flavonoid with the CYP3A4 are probably of importance. In case of flavanones and flavonoles, the B ring does not necessarily need to be substituted for the inhibitory effect to be observed e.g., pinocembrin, chrysin, chrysin-dimethylether. However, in that instance hydroxyl group should not be methylated, and susceptible to ionization under physiological conditions, indicating importance of ion–ion interactions between flavanones and CYP3A4 enzyme. At the same time, flavanones and flavonoles have to be substituted at the position 5 for the inhibitory effect to be observed. In case of flavonoles, it is interesting to observe that disubstituted flavonoids at the positions 3′ and 4′ of the B ring do not influence enzyme activity if both substituents are hydroxyl groups (quercetin and rhamnetin), increase enzyme activity if substituent at the position 4′ is bigger in size than substituent at the position 3′ (tamarixetin) while inhibition is observed when substituent at the position 3′ is greater than the one at the position 4′ (isorhamnetin).

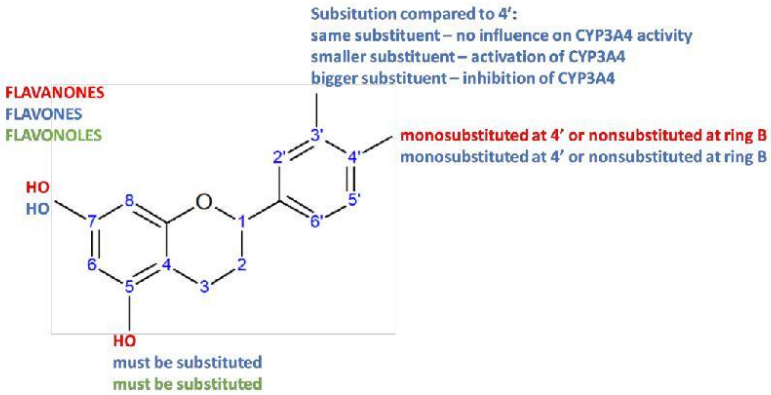


Figure 2. Contribution of structural features to the inhibitory effect (if not otherwise stated) of different classes of flavonoids on the activity of CYP3A4 enzyme. Each class is represented with a different color.

To distinguish if the observed metabolism dependent inhibition (of the seven confirmed inhibitors of CYP3A4 in this study) was a result of time dependent inhibition, in which additional time is needed for the inhibitor to interact with enzyme to cause the inhibition, preincubations were conducted without presence of NADPH coenzyme. In this way, no reduction of CYP3A4 heme iron to Fe^{2+} form occurred, giving sufficient time for the potential inhibitor to interact with the enzyme.

In time dependent inhibition assay, inhibition was observed with acacetin, apigenin, and chrysin. Residual CYP3A4 activity was 57 ± 10% ($p = 0.047$), 34 ± 10% ($p = 0.005$), and 45 ± 3% ($p = 0.019$), respectively (Figure 3). However, no statistical difference was observed in residual activity of CYP3A4 enzyme for apigenin between metabolism and time dependent inhibition assays, indicating that apigenin is pure reversible inhibitor of CYP3A4. No time dependent inhibition was observed with chrysin dimethylether, isorhamnetin, pinocembrin, and tangeretin, and this was confirmed in direct inhibition assay, indicating these four flavonoids are irreversible inhibitors of CYP3A4.

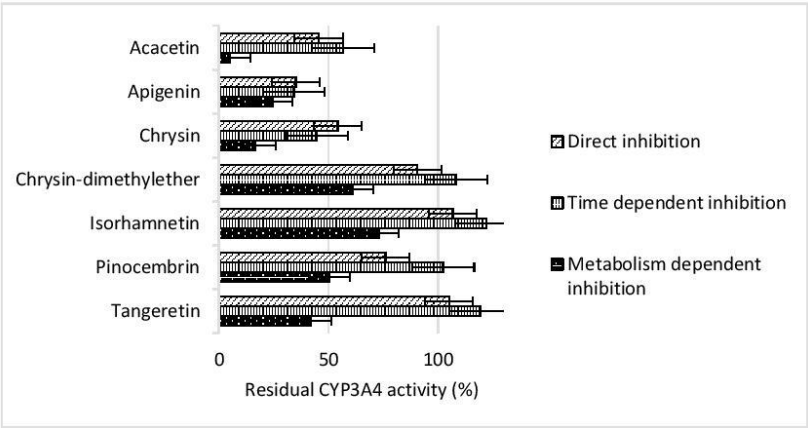


Figure 3. Residual enzyme activity of CYP3A4 determined after incubation with individual flavonoids, and expressed as a percentage of control reaction without addition of flavonoids. Flavonoids were preincubated with enzyme with and without NADPH coenzyme to test metabolic, and time dependent inhibition, respectively. Direct inhibition had no preincubation.

In direct inhibition assay no preincubation is conducted, and this experimental setup is designed to detect reversible inhibition in which substrate and inhibitor compete at the same time for the active site. Direct inhibition assay showed inhibitory effect of acacetin, apigenin, and chrysin on CYP3A4 by decreasing residual enzyme activity to 46 ± 6% ($p = 0.005$), 35 ± 18% ($p = 0.049$), and 54 ± 23% ($p = 0.044$), respectively (Figure 2). These results show that no real time dependent inhibition is present, and observed inhibition of CYP3A4 in time dependent inhibition assay is consequence of the direct inhibition.

Time dependent inhibition is extremely rare for human cytochromes P450 and has been previously reported only for cilengitide, an experimental anticancer drug used for treatment of glioblastoma, and CYP3A4 enzyme in which inhibitor was in extremely high millimolar concentration [67].

Direct inhibition is reversible and its clinical implications, i.e., drug–drug interactions, can be avoided if inhibitor is discontinued from the treatment and substitute with another drug. More important interactions are those irreversible, that have been demonstrated for six flavonoids acacetin and chrysin (in combination with reversible inhibition), and chrysin dimethylether, isorhamnetin, pinocembrin, and tangeretin (pure irreversible inhibitors). Irreversible inhibition cannot be overcome by discontinuation and substitution of a medicinal drug, as the enzyme is inactivated and time is needed for a new enzyme to be re-expressed. As the half-life of cytochromes P450 is between 24 and 72 h, regeneration of enzyme activity can take up to two weeks, preventing successful therapy. This is especially of importance in cases where medicinal drug is exclusively metabolized by inhibited enzyme or inhibited enzyme is susceptible to genetic polymorphism, as well as concomitant use of drugs and flavonoid rich foods metabolizing through same enzyme due to possible drug–flavonoid interactions [56].

A significant number of papers on metabolism of flavonoids and their inhibition of metabolic enzymes has been published [44,45,50,54–56,61,64,65]. However, as this class of compounds covers thousands of substances, metabolic data and inhibitory effects on the majority of them is still missing. Moreover, data published is not always confirmed by subsequent studies, e.g., tamarixetin is activator of CYP3A4 in our study, while previously it has been reported that it either has no effect or it inhibits CYP3A4 [64,65]. For the first time we have reported inhibition of CYP3A4 by acacetin, pinocembrin, chrysin, and chrysin dimethylether, and we have also shown that pinocembrin and isorhamnetin act as irreversible inhibitors of CYP3A4. Catalytic cycle of cytochromes P450 can be affected by inhibitor at different stages [56]. Reversible inhibitors usually affect first step of the catalytic cycle, i.e., binding of the substrate in case of most commonly observed competitive inhibition [56]. Irreversible inhibitors usually affect cytochromes P450 when radical form of substrate is generated forming a reactive intermediate product that can covalently bind to the enzyme and cause inactivation [56]. Sometimes inhibitors can have both reversible and irreversible effect on the enzyme as it has been shown with cilengitide and CYP3A4 [67]. Further studies of chrysin dimethylether, isorhamnetin, pinocembrin, and tangeretin inhibition of CYP3A4 are needed to determine inactivation kinetics and steps of the catalytic cycle of cytochrome P450 3A4 that are affected by the inhibitor or potential reactive intermediate products/metabolites.

3. Materials and Methods

3.1. Materials

Thirty flavonoids used in this study (3,6-dihydroxyflavon, 3,7-dihydroxyflavon, 6-hydroxyflavon, 7-hydroxyflavon, acacetin, apigenin, catechin, chrysin, chrysin dimethyleter, diosmetin, flavanone, flavone, galangin, genistein, hesperetin, isorhamnetin, kaempferol, luteolin, morin, myricetin, naringenin, pinocembrin, pinocembrin-7-metyleter, prunetin, quercetin, quercetin, rhamnetin, sakuranetin, tamarixetin, and tangeretin) were acquired commercially from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), TransMIT GmbH (Gießen, Germany), Extrasynthèse (Genay, France). For the evaluation of activity of CYP3A4 testosterone was used as marker substrate (Sigma-Aldrich). 6β-hydroxytestosterone

was purchased from Cayman Europe (Tallinn, Estonia). Positive controls used to test direct inhibition (ketoconazole) and irreversible inhibition (troleandomycin) were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

The recombinant baculosomes with hyperexpressed CYP3A4 and coexpressed NADPH cytochrome P450 reductase and cytochrome b_5, was used as source of enzyme. Baculosomes were commercially obtained from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA), and all other chemicals from Sigma-Aldrich if not otherwise indicated. A 1.0 M solution phosphate buffer of pH 7.4 was prepared in house. NADPH generating system was prepared of 0.1 M glucose-6-phosphate, 10 mg mL^{-1} $NADP^+$, and 1000 IU mL^{-1} glucose-6-phosphate dehydrogenase in ratio 100:50:2 ($v/v/v$) [67].

3.2. CYP3A4 Inhibition Assays

6β-Hydroxylation of testosterone was used as marker reaction to monitor activity of the CYP3A4 enzyme [67]. Incubations were conducted at 37 °C in the total volume of 100 μL. pH was set to 7.4 using the potassium phosphate buffer (final concentration 50 mM). Incubation mixture contained 5 pmol of the CYP3A4 enzyme. Residual activity was determined by coincubation flavonoid (1 μM) with a marker substrate (200 μM testosterone) for 30 min, with or without preincubation depending of inhibition type tested. Reactions were initiated by adding 15 μL of NADPH generating system. Each reaction mixture was quenched by the addition of four volumes of dichloromethane and centrifuged at 1900× g for 10 min. The organic layer was transferred, and the solvent was evaporated under a stream of nitrogen. The dried sample was dissolved in methanol for HPLC analysis [67].

3.3. Determination of the Inhibition Type

Three types of experiments were conducted to determine metabolism dependent inhibition, time dependent inhibition, and direct inhibition [67]. To determine metabolism dependent inhibition, flavonoids were first preincubated with enzymes with the addition of the generating system for 30 min, after which testosterone was added to determine residual activity. Incubation reaction was quenched after 15 min by adding organic solvent.

If metabolism-dependent inhibition was determined, time dependent inhibition was assessed by preincubating flavonoids and enzymes, after which residual activity was determined by adding NADPH generating system along with substrate. In this instance, the direct inhibition was also tested without preincubation, i.e., NADPH generating system, was added to incubation mixture containing flavonoid and substrate [67].

3.4. HPLC-DAD Analysis

HPLC analysis was performed on Agilent 1100 instrument (Santa Clara, CA, USA) coupled with diode array detector on Agilent Zorbax SB C18 column (4.6 × 250 mm, 3 μm). The mobile phase used consisted of 64% methanol and 36% water; analysis was isocratic at a flow rate of 1.0 mL min^{-1}. Chromatograms were recorded at 240 nm, and the amount of generated product (6β-hydroxytestosterone) was determined as the area under the curve based on the calibration curve of the standard [67].

3.5. Statistical Analysis

All incubations were conducted in triplicate. The results are expressed as residual activity of the enzyme, i.e., percentage of product generated in incubation with the addition of flavonoid in ratio to the control without flavonoid. Statistical significance was tested with Student's t-test in the program R (The R Project for Statistical Computing, Vienna, Austria). Mann–Whitney U-test was used to test normality (p = 0.508) and Levene's test homogeneity (p = 0.882) of the inhibitory data for apigenin justifying the use of the selected statistical analysis.

4. Conclusions

Out of 30 flavonoids screened for potential CYP3A4 enzyme inhibition, 7 showed statistically significant inhibition. Apigenin showed reversible inhibition; acacetin and chrysin showed combined irreversible and reversible inhibition; while chrysin dimethylether, isorhamnetin, pinocembrin, and tangeretin showed pure irreversible inhibition. These results bring attention to possible flavonoid–drug interactions on the level of CYP3A4. As CYP3A4 is the most significant enzyme for the metabolism of xenobiotics including drugs, further in vivo studies are needed to assess clinical significance of the observed inhibitions, and possible drug–flavonoid interactions.

Author Contributions: M.B. designed the study; D.Š.M. and M.B. performed incubation assays and HPLC-DAD analysis; Ž.D., Ž.M., D.Š.M., and M.B. analyzed the data and wrote the paper.

Funding: This research was funded by the Croatian Science Foundation grant number UIP-2014-09-5704 (M.B.).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Medić-Šarić, M.; Jasprica, I.; Smolčić-Bubalo, A.; Mornar, A. Optimization of chromatographic conditions in thin layer chromatography of flavonoids and phenolic acids. *Croat. Chem. Acta* **2004**, *77*, 361–366.
2. Benavente-Garcia, O.; Castillo, J. Update on uses and properties of citrus flavonoids: New findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 6185–6205. [CrossRef] [PubMed]
3. Bojić, M.; Debeljak, Ž.; Medić-Šarić, M.; Tomičić, M. Interference of selected flavonoid aglycons in platelet aggregation assays. *Clin. Chem. Lab. Med.* **2012**, *50*, 1403–1408. [CrossRef] [PubMed]
4. Friščić, M.; Štibrić Baglama, M.; Milović, M.; Hazler Pilepić, K.; Maleš, Ž. Content of bioactive constituents and antioxidant potential of *Galium* L. species. *Croat. Chem. Acta* **2018**, *91*, 1–7. [CrossRef]
5. Kale, A.; Gawande, S.; Kotwal, S. Cancer phytotherapeutics: Role for flavonoids at the cellular level. *Phytother. Res.* **2008**, *22*, 567–577. [CrossRef] [PubMed]
6. Walle, T.; Ta, N.; Kawamori, T.; Wen, X.; Tsuji, P.A.; Walle, U.K. Cancer chemopreventive properties of orally bioavailable flavonoids–methylated versus unmethylated flavones. *Biochem. Pharmacol.* **2007**, *73*, 1288–1296. [CrossRef] [PubMed]
7. Zhang, S.; Yang, X.; Coburn, R.A.; Morris, M.E. Structure activity relationships and quantitative structure activity relationships for the flavonoid-mediated inhibition of breast cancer resistance protein. *Biochem. Pharmacol.* **2005**, *70*, 627–639. [CrossRef] [PubMed]
8. Martens, S.; Mithöfer, A. Flavones and flavone synthases. *Phytochemistry* **2005**, *66*, 2399–2407. [CrossRef] [PubMed]
9. Csepanyi, E.; Szabados-Furjesi, P.; Kiss-Szikszai, A.; Frensemeier, L.M.; Karst, U.; Lekli, I.; Haines, D.D.; Tosaki, A.; Bak, I. Antioxidant Properties and oxidative transformation of different chromone derivatives. *Molecules* **2017**, *22*, 588. [CrossRef] [PubMed]
10. Amić, D.; Davidović-Amić, D.; Beslo, D.; Rastija, V.; Lucić, B.; Trinajstić, N. SAR and QSAR of the antioxidant activity of flavonoids. *Curr. Med. Chem.* **2007**, *14*, 827–845. [CrossRef] [PubMed]
11. Bubols, G.B.; Vianna Dda, R.; Medina-Remon, A.; von Poser, G.; Lamuela-Raventos, R.M.; Eifler-Lima, V.L.; Garcia, S.C. The antioxidant activity of coumarins and flavonoids. *Mini Rev. Med. Chem.* **2013**, *13*, 318–334. [PubMed]
12. Chen, L.; Teng, H.; Xie, Z.; Cao, H.; Cheang, W.S.; Skalicka-Woniak, K.; Georgiev, M.I.; Xiao, J. Modifications of dietary flavonoids towards improved bioactivity: An update on structure-activity relationship. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2018**, *58*, 513–527. [CrossRef] [PubMed]
13. Machado, N.F.L.; Marques, M.P.M. Bioactive Chromone Derivatives – Structural Diversity. *Bioact. Compd.* **2010**, *6*, 76–89. [CrossRef]
14. He, W.; Wu, J.J.; Ning, J.; Hou, J.; Xin, H.; He, Y.; Ge, G.B.; Xu, W. Inhibition of human cytochrome P450 enzymes by licochalcone A, a naturally occurring constituent of licorice. *Toxicol. In Vitro* **2015**, *29*, 1569–1576. [CrossRef] [PubMed]

15. Henderson, M.; Miranda, C.; Stevens, J.; Deinzer, M.; Buhler, D. In vitro inhibition of human P450 enzymes by prenylated flavonoids from hops, *Humulus lupulus*. *Xenobiotica* **2000**, *30*, 235–251. [CrossRef] [PubMed]
16. Obach, R.S. Inhibition of human cytochrome P450 enzymes by constituents of St. John's Wort, an herbal preparation used in the treatment of depression. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2000**, *294*, 88–95. [PubMed]
17. Yuan, Y.; Qiu, X.; Nikolic, D.; Chen, S.N.; Huang, K.; Li, G.; Pauli, G.F.; van Breemen, R.B. Inhibition of human cytochrome P450 enzymes by hops (*Humulus lupulus*) and hop prenylphenols. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2014**, *53*, 55–61. [CrossRef] [PubMed]
18. Zhai, S.; Dai, R.; Friedman, F.K.; Vestal, R.E. Comparative inhibition of human cytochromes P450 1A1 and 1A2 by flavonoids. *Drug Metab. Dispos.* **1998**, *26*, 989–992. [PubMed]
19. Shimada, T. Inhibition of Carcinogen-Activating Cytochrome P450 Enzymes by Xenobiotic Chemicals in Relation to Antimutagenicity and Anticarcinogenicity. *Toxicol. Res.* **2017**, *33*, 79–96. [CrossRef] [PubMed]
20. Hasler, J.A.; Estabrook, R.; Murray, M.; Pikuleva, I.; Waterman, M.; Capdevila, J.; Holla, V.; Helvig, C.; Falck, J.R.; Farrell, G. Human cytochromes P450. *Mol. Aspects Med.* **1999**, *20*, 1–137. [CrossRef]
21. Spaggiari, D.; Geiser, L.; Daali, Y.; Rudaz, S. Phenotyping of CYP450 in human liver microsomes using the cocktail approach. *Anal. Bioanal. Chem.* **2014**, *406*, 4875–4887. [CrossRef] [PubMed]
22. Guengerich, F.P.; Martin, M.V.; Beaune, P.H.; Kremers, P.; Wolff, T.; Waxman, D.J. Characterization of rat and human liver microsomal cytochrome P-450 forms involved in nifedipine oxidation, a prototype for genetic polymorphism in oxidative drug metabolism. *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 5051–5060. [PubMed]
23. Satoh, T.; Fujisawa, H.; Nakamura, A.; Takahashi, N.; Watanabe, K. Inhibitory Effects of Eight Green Tea Catechins on Cytochrome P450 1A2, 2C9, 2D6, and 3A4 Activities. *J. Pharm. Pharm. Sci.* **2016**, *19*, 188–197. [CrossRef] [PubMed]
24. Zanger, U.M.; Schwab, M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacol. Ther.* **2013**, *138*, 103–141. [CrossRef] [PubMed]
25. Nguyen, S.; Huang, H.; Foster, B.C.; Tam, T.W.; Xing, T.; Smith, M.L.; Arnason, J.T.; Akhtar, H. Antimicrobial and P450 inhibitory properties of common functional foods. *J. Pharm. Pharm. Sci.* **2014**, *17*, 254–265. [CrossRef] [PubMed]
26. Liu, R.; Tam, T.W.; Mao, J.; Saleem, A.; Krantis, A.; Arnason, J.T.; Foster, B.C. The effect of natural health products and traditional medicines on the activity of human hepatic microsomal-mediated metabolism of oseltamivir. *J. Pharm. Pharm. Sci.* **2010**, *13*, 43–55. [CrossRef] [PubMed]
27. Tam, T.W.; Akhtar, H.; Arnason, J.T.; Cvijovic, K.; Boon, H.; Cameron, D.W.; Drouin, C.E.; Jaeger, W.; Tsuyuki, R.T.; Vohra, S.; et al. Inhibition of human cytochrome p450 metabolism by blended herbal products and vitamins. *J. Pharm. Pharm. Sci.* **2011**, *14*, 1–16. [CrossRef] [PubMed]
28. Tam, T.W.; Liu, R.; Saleem, A.; Arnason, J.T.; Krantis, A.; Foster, B.C. Cytochrome P450 3A4 and 2D6-mediated metabolism of leisure and medicinal teas. *J. Pharm. Pharm. Sci.* **2014**, *17*, 294–301. [CrossRef] [PubMed]
29. De Lima Toccafondo Vieira, M.; Huang, S.M. Botanical-drug interactions: A scientific perspective. *Planta Med.* **2012**, *78*, 1400–1415. [CrossRef] [PubMed]
30. Hermann, R.; von Richter, O. Clinical evidence of herbal drugs as perpetrators of pharmacokinetic drug interactions. *Planta Med.* **2012**, *78*, 1458–1477. [CrossRef] [PubMed]
31. Čović, D.; Bojić, M.; Medić-Šarić, M. Metabolism of flavonoids and phenolic acids. *Farm. Glas.* **2009**, *65*, 693–704.
32. Wu, W.Y.; Li, Y.D.; Cui, Y.K.; Wu, C.; Hong, Y.X.; Li, G.; Wu, Y.; Jie, L.J.; Wang, Y.; Li, G.R. The natural flavone acacetin confers cardiomyocyte protection against hypoxia/reoxygenation injury via AMPK-mediated activation of Nrf2 signaling pathway. *Front. Pharmacol.* **2018**, *15*, 497. [CrossRef] [PubMed]
33. Zhang, H.W.; Hu, J.J.; Fu, R.Q.; Liu, X.; Zhang, Y.H.; Li, J.; Liu, L.; Li, Y.N.; Deng, Q.; Luo, Q.S.; et al. Flavonoids inhibit cell proliferation and induce apoptosis and autophagy through downregulation of PI3Kγ mediated PI3K/AKT/mTOR/p70S6K/ULK signaling pathway in human breast cancer cells. *Sci. Rep.* **2018**, *26*, 11255. [CrossRef] [PubMed]
34. Gomez-Chang, E.; Uribe-Estanislao, G.V.; Martinez-Martinez, M.; Gálvez-Mariscal, A.; Romero, I. Anti-Helicobacter pylori Potential of Three Edible Plants Known as Quelites in Mexico. *J. Med. Food* **2018**. [CrossRef] [PubMed]
35. Doostdar, H.; Burke, M.D.; Mayer, R.T. Bioflavonoids: Selective substrates and inhibitors for cytochrome P450 CYP1A and CYP1B1. *Toxicology* **2000**, *144*, 31–38. [CrossRef]

36. Tao, J.; Shen, C.; Sun, Y.; Chen, W.; Yan, G. Neuroprotective effects of pinocembrin on ischemia/reperfusion-induced brain injury by inhibiting autophagy. *Biomed. Pharmacother.* **2018**, *106*, 1003–1010. [CrossRef] [PubMed]
37. Su, Q.; Sun, Y.; Ye, Z.; Yang, H.; Kong, B.; Li, L. Pinocembrin protects endothelial cells from oxidized LDL-induced injury. *Cytokine* **2018**. [CrossRef] [PubMed]
38. Cao, G.; Ying, P.; Yan, B.; Xue, W.; Li, K.; Shi, A.; Sun, T.; Yan, J.; Hu, X. Pharmacokinetics, safety, and tolerability of single and multiple-doses of pinocembrin injection administered intravenously in healthy subjects. *J. Ethnopharmacol.* **2015**, *168*, 31–36. [CrossRef] [PubMed]
39. Makanjuola, S.B.L.; Ogundaini, A.O.; Ajonuma, L.C.; Dosunmu, A. Apigenin and apigeninidin isolates from the Sorghum bicolor leaf targets inflammation via cyclo-oxygenase-2 and prostaglandin-E2 blockade. *Int. J. Rheum. Dis.* **2018**, *21*, 1487–1495. [CrossRef] [PubMed]
40. Lee, J.A.; Ha, S.K.; Cho, E.; Choi, I. Resveratrol as a Bioenhancer to Improve Anti-Inflammatory Activities of Apigenin. *Nutrients* **2015**, *7*, 9650–9661. [CrossRef] [PubMed]
41. Nabavi, S.M.; Habtemariam, S.; Daglia, M.; Nabavi, S.F. Apigenin and Breast Cancers: From Chemistry to Medicine. *Anticancer Agents Med. Chem.* **2015**, *15*, 728–735. [CrossRef] [PubMed]
42. Mrazek, A.A.; Porro, L.J.; Bhatia, V.; Falzon, M.; Spratt, H.; Zhou, J.; Chao, C.; Hellmich, M.R. Apigenin inhibits pancreatic stellate cell activity in pancreatitis. *J. Surg. Res.* **2015**, *196*, 8–16. [CrossRef] [PubMed]
43. Thangaiyan, R.; Robert, B.M.; Arjunan, S.; Govindasamy, K.; Nagarajan, R.P. Preventive effect of apigenin against isoproterenol-induced apoptosis in cardiomyoblasts. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **2018**, e22213. [CrossRef] [PubMed]
44. Li, Y.; Ning, J.; Wang, Y.; Wang, C.; Sun, C.; Huo, X.; Yu, Z.; Feng, L.; Zhang, B.; Tian, X.; et al. Drug interaction study of flavonoids toward CYP3A4 and their quantitative structure activity relationship (QSAR) analysis for predicting potential effects. *Toxicol. Lett.* **2018**, *294*, 27–36. [CrossRef] [PubMed]
45. Kimura, Y.; Ito, H.; Ohnishi, R.; Hatano, T. Inhibitory effects of polyphenols on human cytochrome P450 3A4 and 2C9 activity. *Food Chem. Toxicol.* **2010**, *48*, 429–435. [CrossRef] [PubMed]
46. Tasdemir, D.; Kaiser, M.; Brun, R.; Yardley, V.; Schmidt, T.J.; Tosun, F.; Rüedi, P. Antitrypanosomal and antileishmanial activities of flavonoids and their analogues: In vitro, in vivo, structure-activity relationship, and quantitative structure-activity relationship studies. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2006**, *50*, 1352–1364. [CrossRef] [PubMed]
47. Kang, M.K.; Park, S.H.; Choi, Y.J.; Shin, D.; Kang, Y.H. Chrysin inhibits diabetic renal tubulointerstitial fibrosis through blocking epithelial to mesenchymal transition. *J. Mol. Med. (Berl.)* **2015**, *93*, 759–772. [CrossRef] [PubMed]
48. Lin, S.; Zhang, G.; Liao, Y.; Pan, J. Inhibition of chrysin on xanthine oxidase activity and its inhibition mechanism. *Int. J. Biol. Macromol.* **2015**, *81*, 274–282. [CrossRef] [PubMed]
49. Wang, S.; Zhang, X.; Liu, M.; Luan, H.; Ji, Y.; Guo, P.; Wu, C. Chrysin inhibits foam cell formation through promoting cholesterol efflux from RAW264.7 macrophages. *Pharm. Biol.* **2015**, *53*, 1481–1487. [CrossRef] [PubMed]
50. Quintieri, L.; Palatini, P.; Nassi, A.; Ruzza, P.; Floreani, M. Flavonoids diosmetin and luteolin inhibit midazolam metabolism by human liver microsomes and recombinant CYP 3A4 and CYP3A5 enzymes. *Biochem. Pharmacol.* **2008**, *75*, 1426–1437. [CrossRef] [PubMed]
51. Xu, J.J.; Liu, Z.; Tang, W.; Wang, G.C.; Chung, H.Y.; Liu, Q.Y.; Zhuang, L.; Li, M.M.; Li, Y.L. Tangeretin from Citrus reticulate Inhibits Respiratory Syncytial Virus Replication and Associated Inflammation in Vivo. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 9520–9527. [CrossRef] [PubMed]
52. Periyasamy, K.; Baskaran, K.; Ilakkia, A.; Vanitha, K.; Selvaraj, S.; Sakthisekaran, D. Antitumor efficacy of tangeretin by targeting the oxidative stress mediated on 7,12-dimethylbenz(a) anthracene-induced proliferative breast cancer in Sprague-Dawley rats. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2015**, *75*, 263–272. [CrossRef] [PubMed]
53. Lakshmi, A.; Subramanian, S.P. Tangeretin ameliorates oxidative stress in the renal tissues of rats with experimental breast cancer induced by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. *Toxicol. Lett.* **2014**, *229*, 333–348. [CrossRef] [PubMed]
54. Obermeier, M.T.; White, R.E.; Yang, C.S. Effects of bioflavonoids on hepatic P450 activities. *Xenobiotica* **1995**, *25*, 575–584. [CrossRef] [PubMed]

55. Takanaga, H.; Ohnishi, A.; Yamada, S.; Matsuo, H.; Morimoto, S.; Shoyama, Y.; Ohtani, H.; Sawada, Y. Polymethoxylated flavones in orange juice are inhibitors of P-glycoprotein but not cytochrome P450 3A4. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2000**, *293*, 230–236. [PubMed]
56. Bojić, M. Preclinical cytochrome P450 inhibition and interaction studies of new drug candidates. *Farm. Glas.* **2015**, *71*, 229–242.
57. Zhang, B.Y.; Wang, Y.M.; Gong, H.; Zhao, H.; Lv, X.Y.; Yuan, G.H.; Han, S.R. Isorhamnetin flavonoid synergistically enhances the anticancer activity and apoptosis induction by cis-platin and carboplatin in non-small cell lung carcinoma (NSCLC). *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **2015**, *8*, 25–37. [PubMed]
58. AbdalDayem, A.; Choi, H.Y.; Kim, Y.B.; Cho, S.G. Antiviral effect of methylated flavonol isorhamnetin against influenza. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0121610.
59. Wang, X.; Zhong, W. Isorhamnetin attenuates collagen-induced arthritis via modulating cytokines and oxidative stress in mice. *Int. J. Clin. Exp. Med.* **2015**, *8*, 16536–16542. [PubMed]
60. Ding, L.L.; Zhang, J.J.; Dou, W. Effects of isorhamnetin on CYP3A4 and herb-drug interaction. *Yao Xue Xue Bao* **2012**, *47*, 1006–1010. [PubMed]
61. Ekstrand, B.; Rasmussen, M.K.; Woll, F.; Zlabek, V.; Zamaratskaia, G. In vitro gender-dependent inhibition of porcine cytochrome p450 activity by selected flavonoids and phenolic acids. *Biomed. Res. Int.* **2015**, *2015*, 387918. [CrossRef] [PubMed]
62. Park, H.J.; Lee, S.J.; Cho, J.; Gharbi, A.; Han, H.D.; Kang, T.H.; Kim, Y.; Lee, Y.; Park, W.S.; Jung, I.D.; et al. Tamarixetin exhibits anti-inflammatory activity and prevents bacterial sepsis by increasing IL-10 production. *J. Nat. Prod.* **2018**, *81*, 1435–1443. [CrossRef] [PubMed]
63. Nicolini, F.; Burmistrova, O.; Marrero, M.T.; Torres, F.; Hernández, C.; Quintana, J.; Estévez, F. Induction of G2/M phase arrest and apoptosis by the flavonoid tamarixetin on human leukemia cells. *Mol. Carcinog.* **2014**, *53*, 939–950. [PubMed]
64. Li, L.; Stanton, J.D.; Tolson, A.H.; Luo, Y.; Wang, H. Bioactive terpenoids and flavonoids from Ginkgo biloba extract induce the expression of hepatic drug-metabolizing enzymes through pregnane X receptor, constitutive androstane receptor, and aryl hydrocarbon receptor-mediated pathways. *Pharm. Res.* **2009**, *26*, 872–882. [CrossRef] [PubMed]
65. Von Moltke, L.L.; Weemhoff, J.L.; Bedir, E.; Khan, I.A.; Harmatz, J.S.; Goldman, P.; Greenblatt, D.J. Inhibition of human cytochromes P450 by components of *Ginkgo biloba*. *J. Pharm. Pharmacol.* **2004**, *56*, 1039–1044. [CrossRef] [PubMed]
66. Van Waterschoot, R.A.; Rooswinkel, R.W.; Sparidans, R.W.; van Herwaarden, A.E.; Beijnen, J.H.; Schinkel, A.H. Inhibition and stimulation of intestinal and hepatic CYP3A activity: Studies in humanized CYP3A4 transgenic mice using triazolam. *Drug Metab. Dispos.* **2009**, *37*, 2305–2313. [CrossRef] [PubMed]
67. Bojić, M.; Barbero, L.; Dolgos, H.; Freisleben, A.; Gallemann, D.; Riva, S.; Guengerich, F.P. Time- and NADPH-dependent inhibition of cytochrome P450 3A4 by the cyclopentapeptide cilengitide: Significance of the guanidine group and accompanying spectral changes. *Drug Metab. Dispos.* **2014**, *42*, 1438–1446. [CrossRef] [PubMed]

Sample Availability: Samples of the compounds are available from the authors and commercially.

© 2018 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

PRILOG III

Popis najznačajnijih kratica i simbola

BO – engl. *Bond Order*, red veze

DRI – engl. *Direct Reversible Inhibition,* izravna reverzibilna inhibicija

E_{HOMO} – engl. *Highest Occupied Molecular Orbital Energy*, energija najviše popunjene molekulske orbitale

E_{LUMO} – engl. *Lowest Unoccupied Molecular Orbital Energy*, energija najniže nepopunjene molekulske orbitale

HPLC – DAD – engl. *High Performance Liquid Chromatography/High Pressure Liquid Chromatography with Diode Array Detector,* tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti s detektorom s nizom dioda

K_i – konstanta inhibicije

LOO – engl. *Leave One Out*, ispusti-jedan-van

λ – valna duljina

MBI – engl. *Metabolism-Based Inhibition,* inhibicija ovisna o metabolizmu

NADH – nikotinamid adenin dinukleotid

NADPH – nikotinamid adenin dinukleotid fosfat

P – statistička značajnost

PC – parcijalni naboj

PDB – engl. *Protein Data Bank,* banka podataka proteina

π_s – hidrofobna konstanta po Hanschu

q – križna validacija

QSAR - engl. *Quantitative Structure Activity Relationship,* kvantitativni odnos strukture i djelovanja

QSPR – engl. *Quantitative Structure Property Relationship,* kvantitativni odnos strukture i svojstava

r – koeficijent korelacije

RF – engl. *Random Forest,* metoda slučajne šume

TDI – engl. *Time-Dependent Inhibition,* inhibicija ovisna o vremenu

T_F – temperatura plamišta

t_R – vrijeme zadržavanja

χ – orbitalna elektronegativnost