

# Kinetika reakcija demetilacije aglikona flavonoida posredovanih citokromima P450 3A4 i 2D6

---

**Vučenović, Josipa**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2018**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:679954>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-19**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



**Josipa Vučenović**

**Kinetika reakcija demetilacije aglikona  
flavonoida posredovanih citokromima P450 3A4  
i 2D6**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2018.

**Josipa Vučenović**

**Kinetika reakcija demetilacije aglikona  
flavonoida posredovanih citokromima P450 3A4  
i 2D6**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2018.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Biokemija lijekova Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Zavodu za farmaceutsku kemiju pod stručnim vodstvom dr. sc. Mirze Bojića, docenta Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Zahvaljujem se mentoru doc. dr. sc. Mirzi Bojiću na stručnom vodstvu, pomoći i savjetima pri izradi ovoga rada.

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1. FLAVONOIDI .....	2
1.1.1. STRUKTURNE KARAKTERISTIKE I KLASIFIKACIJA .....	2
1.1.2. FLAVONOIDI U HRANI .....	4
1.1.3. METABOLIZAM .....	5
1.1.4. UČINAK NA ZDRAVLJE LJUDI .....	5
1.2. CITOKROMI P450 .....	6
1.2.1. CITOKROM P450 3A4 .....	6
1.2.1.1. SUPSTRATI I KARAKTERISTIČNE REAKCIJE .....	7
1.2.1.2. INTERAKCIJE .....	8
1.2.2. CITOKROM P450 2D6 .....	9
1.2.2.1. SUPSTRATI I KARAKTERISTIČNE REAKCIJE .....	9
1.2.2.2. INTERAKCIJE .....	11
1.3. REAKCIJE O-DEMETILACIJE POSREDOVANE CYP ENZIMIMA .....	11
<b>2. OBRAZLOŽENJE TEME</b> .....	<b>12</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	<b>15</b>
3.1. MATERIJALI .....	16
3.2. METODE .....	17
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>22</b>
4.1. CYP3A4 .....	23
4.1.1. SAKURANETIN .....	23
4.1.2. TANGERETIN .....	23

4.2. CYP2D6.....	25
4.2.1. AKACETIN.....	26
4.2.2. TANGERETIN.....	26
<b>5. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>30</b>
<b>6. LITERATURA.....</b>	<b>32</b>
<b>7. SAŽETAK.....</b>	<b>37</b>



## Popis kratica

CYP - citokrom

COX - ciklooksigenaza

DAD - diode array

E - enzim

ES - kompleks enzim-supstrat

ESI - elektrosprej ionizacija

$K_{cat}$  - katalitička konstanta

$K_m$  - Michaelis- Mentenčina konstanta

LC-MS - tekućinska kromatografija spregnuta sa spektrometrijom masa

MALDI - matricom potpomognuta ionizacija laserskom desorpcijom

NADPH - nikotinamidadeninukleotidfosfat

P - produkt

TOF - vrijeme proleta

UV-Vis - UV-vidljivi dio spektra

$V_{max}$  - maksimalna brzina

$V_0$  - početna brzina





# **1. UVOD**

## 1.1. FLAVONOIDI

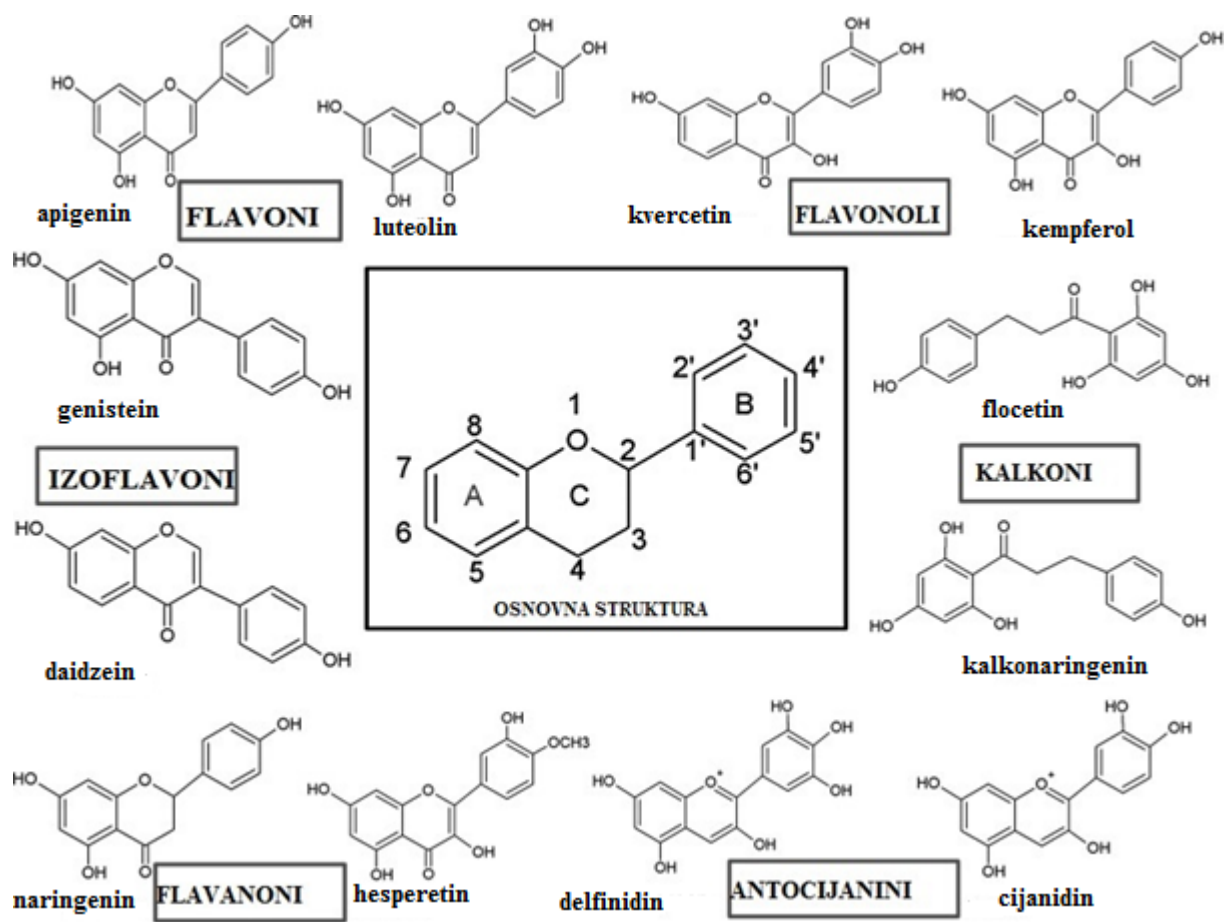
Flavonoidi su skupina više od pet tisuća spojeva koja ima jako bitnu ulogu u biljkama, kao što su regulacija staničnog rasta i privlačenje kukaca oprašivača. Bioraspoloživost flavonoida u ljudskom organizmu ovisi o njihovoj strukturi. Kemijska priroda im je određena stupnjem hidroksilacije i polimerizacije, supstituentima i stuktornom skupinom kojoj pripadaju (Kumar i Pandey, 2013.). Epidemiološke studije daju snažne dokaze da hrana obogaćena flavonoidima pozitivno djeluje na zdravlje ljudi različitim mehanizmima, a najviše se ističu antioksidativni, protuupalni te kardioprotektivni učinci. Unatoč brojnim učincima na zdravlje, kao i sve ostale djelatne tvari koje se unose u organizam, prevelika količina flavonoida potencijalno može imati i neke neželjene posljedice (Ye i sur., 2016.). Od 1990-ih godina intenziviraju se istraživanja flavonoida, upravo zbog brojnih pogodnih djelovanja na ljudsko zdravlje, no već 1930. godine je prvi put izolirana molekula flavonoida iz naranči. Prvotno je taj novi spoj nazvan vitamin P, a zapravo se radilo o flavonoidu rutinu (Hodek, 2001.).

### 1.1.1. STRUKTURNE KARAKTERISTIKE I KLASIFIKACIJA

Osnovu strukture flavonoida čine dva benzenska (A i B) i jedan piranski prsten (C). Ovu raznoliku skupinu spojeva možemo podijeliti u različite podskupine, ovisno o tome na koji je ugljikov atom prstena C spojen prsten B te o stupnju nezasićenosti i oksidacije prstena C. Oni spojevi kojima je prsten B vezan na ugljikov atom na poziciji 3 prstena C zovu se izoflavoni. Ako je prsten B vezan na C-4 ugljikov atom, radi se o neoflavonoidima, dok se oni spojevi kojima je prsten B vezan na ugljikov atom u poziciji 2 dalje dijele u nekoliko podskupina: flavone, flavonole, flavanonole, flavanone, flavanole, antocijanine i kalkone (Panche, Diwan i Chandra, 2016.).

Flavonoidi se pojavljuju kao aglikoni, glikozidi i metilirani derivati. U biljkama se pojavljuju kao glikozidi, spojevi koji se sastoje od neugljikohidratnog (aglikona) i ugljikohidratnog dijela povezanih acetalnom vezom. Do glikozilacije dolazi u položajima 3 i 7, a najčešće ugljikohidratnu komponentu čine *L*-ramnoza, *D*-glukoza, glukoramnoza, galaktoza i arabinoza (Kumar i Pandey, 2013.).

Slika 1. prikazuje osnovnu strukturu i glavne podskupine flavonoida.

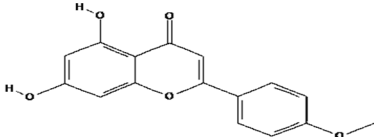
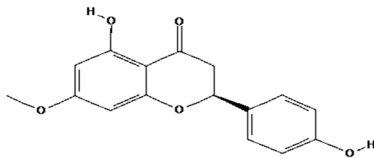
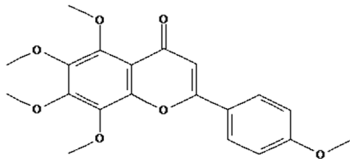


Slika 1. Osnovna struktura i podskupine flavonoida.

Flavonoidi na koje se eksperimentalni dio ovog rada odnosi su aglikoni: tangeretin (5,6,7,8,4'-pentametoksiflavon), sakuranetin (5,4'-dihidroksi-7-metoksiflavonon) i akacetin (5,7-dihidroksi-4'-metoksiflavon).

Tablica 1. pokazuje strukture flavonoida obuhvaćene u ovom radu.

**Tablica 1.** Struktura flavonoida obuhvaćenih eksperimentalnim dijelom ovog rada.

<b>akacetin</b>	
<b>sakuranetin</b>	
<b>tangeretin</b>	

### 1.1.2. FLAVONOIDI U HRANI

Glavni prehrambeni izvori flavonoida su citrusno voće, čaj, jabuke, bobičasto voće, crno vino, leguminoze i povrće. Njihov sadržaj u navedenim namirnicama može varirati, ovisno o načinu uzgoja biljaka, uvjetima okoliša, prikupljanju, skladištenju i preradi hrane.

Procjenjuje se da ljudi prehranom unesu oko 500 različitih flavonoida, a u zapadnim zemljama se dnevno unosi oko 2 g polifenola (Rothwell i sur., 2015.).

Najzastupljeniji flavonoidi u hrani su flavonoli, a glavni predstavnici te skupine su kvercetin i kempferol. Glavni izvor ovih flavonoida je bijeli luk. Nalazimo ih u glikoziliranom obliku (Manach i sur., 2004.). Tangeretin je u najvećoj mjeri pronađen u kori kineske mandarine, ali ga ima i u slatkim narančama i drugim citrusima (Rong Li i sur., 2016.). Glavni izvor

sakuranetina su listovi riže (Katsumata i sur., 2016.). Akacetin je pronađen u različitim biljnim vrstama, a najznačajniji izvori su kela (*Ammi visnaga*), ginkgo i vrste porodice glavočika (Polya, 2003.).

### **1.1.3 METABOLIZAM**

Kao što je već navedeno, flavonoidi imaju potencijal biti jako korisni za ljudski organizam pa stoga ni ne čudi sve veći broj istraživanja ove skupine spojeva. U početku se smatralo da se flavonoidi ne mogu apsorbirati iz svojih biljnih izvora, budući da su vezani sa ugljikohidratima u beta glikozide. Međutim, mikroorganizmi u ljudskom probavnom sustavu mogu hidrolizirati glikozide, pri čemu se oslobađa aglikon flavonoida, koji se onda može apsorbirati kroz stijenku crijeva. Iznimka je kvercetin, koji se bolje apsorbira u obliku glikozida negoli kao aglikon. Dva su izrazito bitna faktora u metabolizmu flavonoida. Jedan je već spomenuta mikroflora, a drugi je jetra. Kao i kod ostalih ksenobiotika, metabolizam flavonoida u jetri dijeli se na fazu 1 i fazu 2. U prvoj fazi flavonoidi se hidroksiliraju i/ili O-demetiliraju enzimima citokrom P450, a zatim podliježu reakcijama glukuronidacije, sulfonacije ili metilacije različitim enzimima koji su zaduženi za reakcije druge faze. Nakon što prođu drugu fazu, sada polarniji metaboliti flavonoida (većinom glukuronati i sulfonati), izluče se urinom (Hodek i sur., 2001.).

### **1.1.4. UTJECAJ NA ZDRAVLJE LJUDI**

Flavonoide je otkrio Albert Szent-Gyorgy kao tvari s jakim antioksidativnim djelovanjem. Zbog svoje sposobnosti hvatanja slobodnih radikala mogu smanjiti oksidativna oštećenja membrana, proteina i DNA te se stoga istražuju u svrhu terapije bolesti jetre i srca, raka, makularne degeneracije i katarakte oka. Osim direktnog antioksidativnog učinka, flavonoidi mogu kelirati dvovalentne ione (Fe, Cu) kojima je onda onemogućeno sudjelovanje u oksidativnim procesima. Flavonoidi pokazuju djelovanje na brojne enzime u ljudskom organizmu. Pokazalo se da mogu inhibirati sintezu prostaglandina inhibicijom COX enzima. Inhibiraju i fosfodiesterazu, odgovornu za adheziju leukocita na mjesto ozljede. Takvo djelovanje na navedene enzime objašnjava protuupalni učinak flavonoida.

Neki dijelovi strukture flavonoida pokazuju citotoksično djelovanje, što objašnjava antitumorska svojstva ovih spojeva. Inhibiraju topoisomerasu 1 i 2, potiču apoptozu tumorskih stanica te inhibiraju rast tumora ovisnih o spolnim hormonima (Hodek, 2001.).

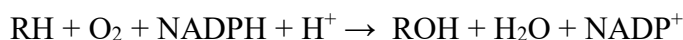
Istraživanja upućuju na antioksidativno, protutumoralno, antiplazmodijalno djelovanje akacetina. Proučavan je njegov protutumorski učinak i zaključeno je da inhibira proliferaciju stanica raka pluća i jetre te također djeluje protiv raka kolona (Singh i sur, 2004.).

Studije bioloških učinaka tangeretina su pokazale da djeluje inhibitorno na proliferaciju glatkih mišićnih stanica krvnih žila i tako usporava aterosklerozu. Dokazano je i njegovo djelovanje na agregaciju trombocita u *in vitro* i *in vivo* uvjetima. Smatra se da bi trajan unos hrane bogate tangeretinom mogao imati kumulativan učinak na inhibiciju agregacije trombocita (Vaiyapuri i sur., 2013.).

## 1.2. CITOKROMI P450

Citokromi P450 predstavljaju superporodicu enzima čija je uloga u metabolizmu ksenobiotika prevođenje spojeva u polarnije oblike koji se učinkovitije eliminiraju iz organizma. Riječ je o hemoproteinima koji u svom aktivnom mjestu imaju atom željeza vezan na porfirinski prsten. Apoproteinski dio enzima je preko cisteinskog ostatka koordiniran na atom željeza.

CYP enzimi su smješteni na membranama endoplazmatskog retikuluma i mitohondrija, a predstavljaju monooksigenaze koje hidroksilnu skupinu iz molekuskog kisika ugrađuju u supstrat i vodu :



Danas je poznato preko 200 000 različitih vrsta citokroma P450, a zna se i da ti enzimi metaboliziraju 96% poznatih lijekova. Najveći dio metaboliziraju CYP3A4/5 (33%), CYP2D6 (13%), CYP2C9 (10%), CYP2C19 (9%) i CYP1A2 (9%) (Bojić, 2015.).

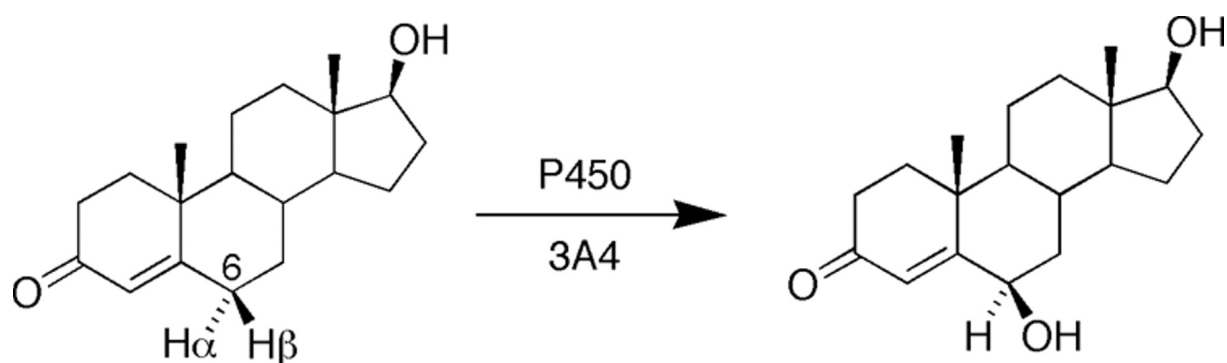
Klasifikacija citokroma P450 provodi se na temelju sličnosti u primarnoj strukturi proteina. Enzimi će biti svrstani u istu porodicu ako su im slijedovi aminokiselina slični više od 40% , a istoj potporodici pripadati će ako im je aminokiselinska sličnost veća od 60%. Porodica se označava brojem, a potporodica velikim slovom, na primjer CYP3A. Pojedinačni enzim označava se dodatnim brojem iza slova potporodice (Rendić, 2006.).

### 1.2.1. CITOKROM P450 3A4

Citokrom P450 3A4 je najzastupljeniji CYP enzim u ljudskom organizmu i smatra se najvažnijim enzimom u metabolizmu ksenobiotika. Najveća zastupljenost CYP3A4 je u jetri i tankom crijevu, ali pronađen je i u kolonu, plućima, nadbubrežnoj žlijezdi, mozgu i abdomenu. Poteškoće koje bi se mogle javiti zbog metabolizma lijekova preko CYP3A4 uključuju postojanje velikog broja inhibitora ovog enzima, kao i njegovih induktora. Pri tom ne treba uzimati u obzir samo registrirane lijekove kao jedine koji mogu mijenjati aktivnost enzima, jer i neke druge tvari mogu činiti isto to, a primjer takvih su crni papar i sok od grejpa kao inhibitori te gospina trava kao induktor CYP3A4. Nadalje, zabilježeno je da je aktivnost enzima snižena kod nekih bolesti, kao što su celijakija, rak ili ciroza jetre. Postoji sve veći broj istraživanja CYP3A4 enzima i njegove uloge u nastajanju i liječenju raka, djelovanja na steroidne hormone i citostatike.

#### 1.2.1.1. SUPSTRATI I KARAKTERISTIČNE REAKCIJE

Kao što je već navedeno, CYP3A4 metabolizira jako veliki broj supstrata. Jedna od karakterističnih reakcija, koja se i danas koristi u *in vitro* istraživanjima je 6 $\beta$  - hidroksilacija testosterona (slika 2), dok je druga 1' - hidroksilacija midazolama, lijeka koji se koristi kao anksiolitik.



Slika 2. 6 $\beta$  - hidroksilacija testosterona enzimom CYP3A4.



Neki vrlo često propisivani lijekovi su također supstrati CYP3A4 enzima, na primjer alprazolam. Statini, lovastatin i simvastatin, također su supstrati ovog enzima, isto kao i sildenafil, poznatiji po svom generičkom nazivu Viagra®. Jedna od karakterističnih reakcija je oksidacija nifedipina, blokatora kalcijevih kanala koji se koristi u terapiji hipertenzije.

Lijekovi nisu jedini supstrati ovog proteina. On katalizira i detoksifikaciju hidrofobnih žučnih kiselina koje time postaju polarnije i lakše se izlučuju pomoću transportera, a u protivnom bi djelovale citotoksično. Zabilježena je indukcija CYP3A4 u stanju kolestaze kod kojeg dolazi do povećanja količine hidrofobnih žučnih kiselina, što je još jedan dokaz utjecaja bolesti na aktivnost CYP-ova (Stedman i sur., 2004.).

### **1.2.1.2. INTERAKCIJE**

Veliki broj lijekova koji se metaboliziraju CYP enzimima podložna je međusobnim interakcijama koje su uzrokovane inhibicijom ili indukcijom citokroma. Enzim CYP3A4 nije iznimka, štoviše iznimno je zastupljen kada je riječ o interakcijama lijekova.

Njegovom inhibicijom doći će do usporavanja metabolizma i klirensa onih spojeva koji se preko CYP3A4 biotransformiraju. Postoje dva osnovna tipa inhibicije: reverzibilna i ireverzibilna. Kod reverzibilne inhibicije razlikujemo kompetitivnu, akompetitivnu i nekompetitivnu inhibiciju. Najčešći je oblik kod inhibicije citokroma kompetitivna inhibicija, pri čemu se inhibitor natječe sa supstratom za vezanje na aktivno mjesto enzima. Akompetitivna inhibicija predstavlja vezanje inhibitora nakon što se već stvorio kompleks enzim-supstrat. Nekompetitivna je inhibicija miješanog tipa. Pozitivna strana reverzibilne inhibicije je to što se ona, ako je uzrokovana politerapijom, može riješiti na način da se inhibitor CYP enzima izbaciti iz terapije ili zamijeni prikladnijim lijekom. To nije slučaj sa ireverzibilnom inhibicijom. Ponovna će uspostava enzimske aktivnosti u tom slučaju zahtijevati vrijeme potrebno za ponovnu sintezu enzima (Bojić, 2015.).

Indukcija citokroma predstavlja pojačanje aktivnosti ili sinteze enzima pri čemu se lijek supstrat brže metabolizira, što može rezultirati subdoziranošću i neuspješnom terapijom. Brojni su lijekovi inhibitori i induktori enzima CYP3A4. Tablica 2 prikazuje neke od njih (Pharmacy Times, 2010.).

**Tablica 2.** Inhibitori i induktori enzima CYP3A4.

<b>CYP3A4 inhibitori</b>	<b>CYP3A4 induktori</b>
amiodaron	karbamazepin
itakonazol	efavirenz
ketokonazol	fosfenitoin
diltiazem	rifampin
ritonavir	nevirapin
klaritromicin	pirimidon
ciklosporin	okskarbazepin

Istraživanja su pokazala da na aktivnost CYP3A4 inhibitorno djeluju i flavonoidi iz soka grejpa. Dokazan je takav učinak naringenina i naringina, ali još jačim inhibitorima su se pokazali bergapten i kvercetin. Najučinkovitiji u inhibiciji CYP3A4 su furanokumarini, upravo zbog furanskog prstena u strukturi. Flavonoidi s više fenolnih hidroksilnih skupina pokazali su jači učinak od onih koji ih imaju manje (Saville i sur., 2001.).

### **1.2.1.3. CITOKROM P450 2D6**

U superporodici CYP postoji veliki broj enzima, a jedan od značajnijih je citokrom P450 2D6. Ovaj protein nalazi se na membrani endoplazmatskog retikuluma i zaslužan je za metabolizam 25% lijekova. Gen *CYP2D6* izrazito je polimorfan, što rezultira time da pojedini ljudi imaju fenotip slabog, umjerenog, ekstenzivnog ili ultrabrzog metabolizatora. Slabi metabolizatori nemaju funkcionalnih alela, umjereni imaju jedan funkcionalan i jedan nefunkcionalan, ekstenzivni oba funkcionalna, dok ultrabrzi metabolizatori imaju više funkcionalnih alela. Posljedica polimorfizma gena je različita brzina metaboliziranja lijekova i potreba za prilagodbom doze.

Fenotipizacija CYP2D6 provodi se različitim supstratima, ali za *in vitro* ispitivanje najviše se preferiraju bufuralol i dekstrometorfan. U *in vivo* uvjetima se koristi dekstrometorfan koji se *O*-demetilira (Jurica i Sulcova, 2012.).

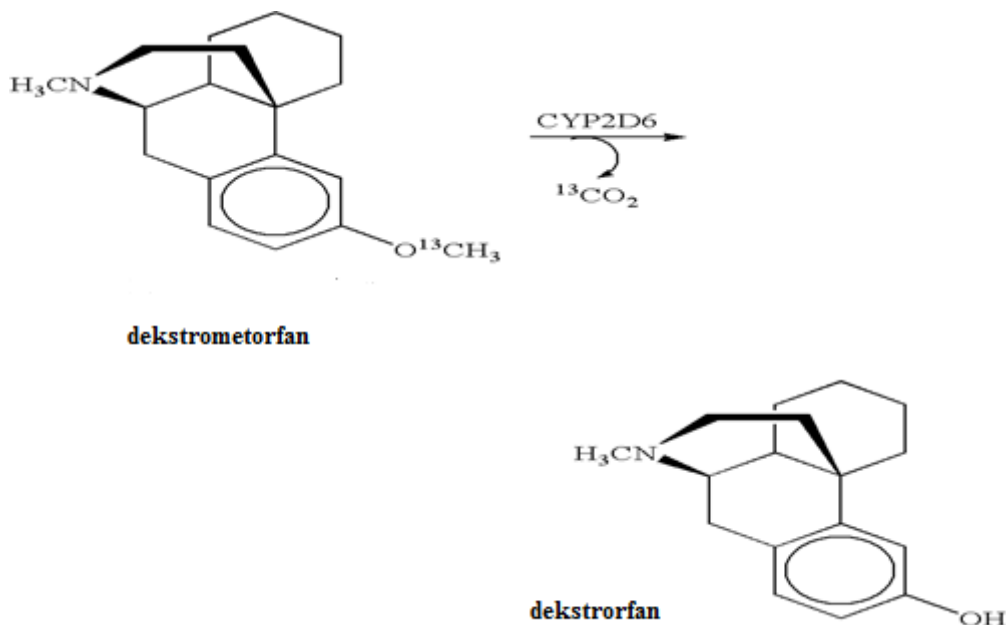
#### 1.2.1.4. SUPSTRATI I KARAKTERISTIČNE REAKCIJE

Lijekovi koji su supstrati CYP2D6 uključuju antidepresive, analgetike, antitusike, antipsihotike, beta blokatore... Tablica 3 prikazuje neke od supstrata CYP2D6 (Pharmacy Times, 2008.).

**Tablica 3.** Supstrati CYP2D6.

SUPSTRATI CYP2D6
amitriptilin
klorpromazin
duloksetin
metoprolol
kodein
haloperidol

Marker reakcija za CYP2D6 je već spomenuta *O*-demetilacija dekstrometorfana. Slika 3 prikazuje spomenutu reakciju (Modak i sur., 2007.).



**Slika 3.** Marker reakcija CYP2D6 enzima.

### 1.2.6. INTERAKCIJE

Kao i većina citokrom enzima, i CYP2D6 podložan je inhibiciji i indukciji koja rezultira promjenom metabolizma lijekova. Najčešći mehanizam inhibicije je također kompeticija, a inhibitore dijelimo na jake, srednje jake i slabe. Tablica 4 prikazuje podjelu inhibitora CYP2D6 (preuzeto <https://www.fda.gov/default.htm>).

**Tablica 4.** Inhibitori CYP2D6.

<b>JAKI INHIBITORI</b>	<b>SREDNJE JAKI INHIBITORI</b>	<b>SLABI INHIBITORI</b>
bupropion	cimetidin	abirateron
fluoksetin	duloksetin	amiodaron
paroksetin	mirabegron	celekoksib
kinidin	fluvoksamin	escitalopram
terbinafin	cinakalcet	labetalol

### 1.3. REAKCIJE *O*-DEMETILACIJE POSREDOVANE ENZIMIMA CYP

Oksidativne dealkilacije mogu se odvijati na atomima dušika, kisika i sumpora. *O*-demetilacije odvijaju se na atomu kisika, a supstrati ovih reakcija su aromatski i alifatski eteri i tioeteri. Reakcija se odvija uz katalitičko djelovanje enzima citokrom P450. Produkti *O*-dealkilacija obično zadržavaju terapijski učinak, a odvaja se manji alkilni dio (Rendić, Medić-Šarić, 2013.). U slučaju *O*-demetilacije aglikona flavonoida, to je metilna skupina.

Reakcija dealkilacije odvija se preko međuprodukta, karbinola. Kao produkti reakcije nastaju alkohol i aldehid:

[O]

↓



Metil eteri se brzo dealkiliraju, dok je preferirana metabolička reakcija etera s dugim alkilnim lancem hidroksilacija (Rendić, Medić-Šarić, 2013.).

## **2. OBRAZLOŽENJE TEME**

Ksenobiotici najčešće uz pozitivan pokazuju i brojne neželjene učinke, koji se raznim istraživanjima nastoje ispitati, predvidjeti i izbjeći. Isto vrijedi i za flavonoide. U uvodnom dijelu navedeni su korisni aspekti njihove uporabe, ali ipak postoje i istraživanja nekih učinaka koji su upravo suprotni. Tako je jedno istraživanje pokazalo prooksidativan učinak flavonoida, mutagenost i kovalentno vezanje kvercetina na proteine. Budući da zasad ne postoje snažni dokazi o mogućoj štetnosti flavonoida, potrebno je izvršiti još veliki broj ispitivanja kako bi ona bila dokazana ili kako bi sigurnost flavonoida bila potvrđena.

Citokromi P450 dokazano su uključeni u metabolizam flavonoida. Samim time, flavonoidi posjeduju potencijal ulaska u interakcije s ostalim ksenobioticima, posebice lijekovima koji se metaboliziraju istim enzimima. Interakcije mogu biti posljedica indukcije ili inhibicije djelovanja CYP-ova od strane polifenola, što rezultira preniskom ili previsokom dozom lijeka u plazmi. Kako bi se to izbjeglo, potrebno je ispitati učinak pojedinih flavonoida na citokrome P450 (Hodek, 2001.).

Budući da se veliki broj lijekova metabolizira preko CYP3A4, jasno je zašto je od velike važnosti znati koji se flavonoid metabolizira preko istog enzima i kakav učinak ima na njegovu aktivnost. Već je poznat inhibitorski učinak soka od grejpa na CYP3A4 i ozbiljnost mogućih interakcija. Zbog tog saznanja u mogućnosti smo upozoriti pacijente i izbjeći promjenu farmakokinetike lijeka. Polimorfizam CYP-ova se dodatno treba uzeti u obzir pa se zato ispituje i metabolizam flavonoida preko CYP2D6 koji je također uključen u biotransformaciju brojnih lijekova (Hodek, 2001.).

Cilj ovog rada je ispitati metabolizam odabranih flavonoida posredovan enzimima CYP3A4 i 2D6 sa naglaskom na reakcije demetilacije aglikona i njihovu kinetiku. Za određivanje kinetike reakcije koristili smo osam različitih koncentracija supstrata. U ispitivanje su uključena tri flavonoida od kojih je tangeretin podvrgnut metabolizmu preko oba enzima, sakuranetin je inkubiran samo s CYP3A4, a akacetin s CYP2D6. Metoda koja se koristila u identifikaciji metabolita je tekućinska kromatografija spregnuta sa spektrometrijom masa (LC-MS) s Q-TOF i UV-Vis detektorima. Iz dobivenih podataka moglo se zaključiti o kojem je metabolitu riječ i je li došlo do reakcije demetilacije flavonoida. Metaboliti su kvantificirani pomoći njihovog UV spektra, a kvantitativni rezultat izražen je u odnosu na kvercetin. Za prikaz kinetike reakcije korišten je Michaelis-Mentenčin model.

Ova i slična ispitivanja su potrebna jer su flavonoidi vrlo često prisutni u ljudskoj prehrani, a kao i ostale strane tvari koje se unesu u organizam, mogu izazvati brojne željene, ali i neželjene učinke.

### **3. MATERIJALI I METODE**



### 3.1. MATERIJALI

Metabolizam flavonoida ispitan je na enzimima CYP3A4 i CYP2D6. U obzir su uzeta tri flavonoida za koje je utvrđeno da podliježu reakciji demetilacije s ciljem određivanja kinetike iste. Odabrani flavonoidi su:

- tangeretin
- sakuranetin
- akacetin

Tangeretin je podvrgnut djelovanju oba enzima, sakuranetin enzima CYP3A4, a akacetin CYP2D6. Metaboliti navedenih flavonoida identificirani su LC-MS tehnikom. Kinetika reakcija prikazana je Michaelis-Mentenčinim modelom.

#### *Inkubacije*

- Bakulosomi koji sadržavaju P450 (10 pmol), NADPH-P450 reduktazu, citokrom b<sub>5</sub> volumen po inkubaciji: 10 µL
- Kalijev fosfat (pH=7,4, volumen po inkubaciji: 5µL, 50 mmol)
- Voda (do ukupnog volumena inkubacije od 100 µL: 69 µL)
- Generirajući sustav (volumen po inkubaciji: 15 µL):
  - glukoza-6-fosfat
  - glukoza-6-fosfat dehidrogenaza
  - NADP<sup>+</sup> u omjeru 100:2:50
- Acetonitril (volumen po inkubaciji: 100 µL)
- Smjesa flavonoida u metanolu (volumen po inkubaciji: 1 µL)

#### *Oprema*

- Mikropipeta
- Epruvete

## 3.2. METODE

### *Provođenje inkubacija - procedura*

- U epruvetu dodamo fosfatni pufer, vodu, enzim, supstrat
- Reakciju pokrećemo dodatkom generirajućeg sustava
- Inkubacija se provodi tijekom 30 min na 37°C u vodenoj kupelji uz miješanje
- Reakciju zaustavljamo dodatkom ledenog acetonitrila i centrifugiramo
- Bistri sloj podvrgne se LC-MS analizi

Metoda koja je omogućila potvrdu metabolita pojedinih flavonoida jest tekućinska kromatografija spregnuta sa spektrometrijom masa (LC/MS), povezana s detektorom UV-Vis. Tekućinska kromatografija omogućava razdvajanje komponenti iz smjese, a spektrometrija masa njihovu pouzdanu identifikaciju. Sprezanje ovih dviju tehnika omogućava brzu analizu aktivnosti CYP enzima (Guengerich i sur., 2009.).

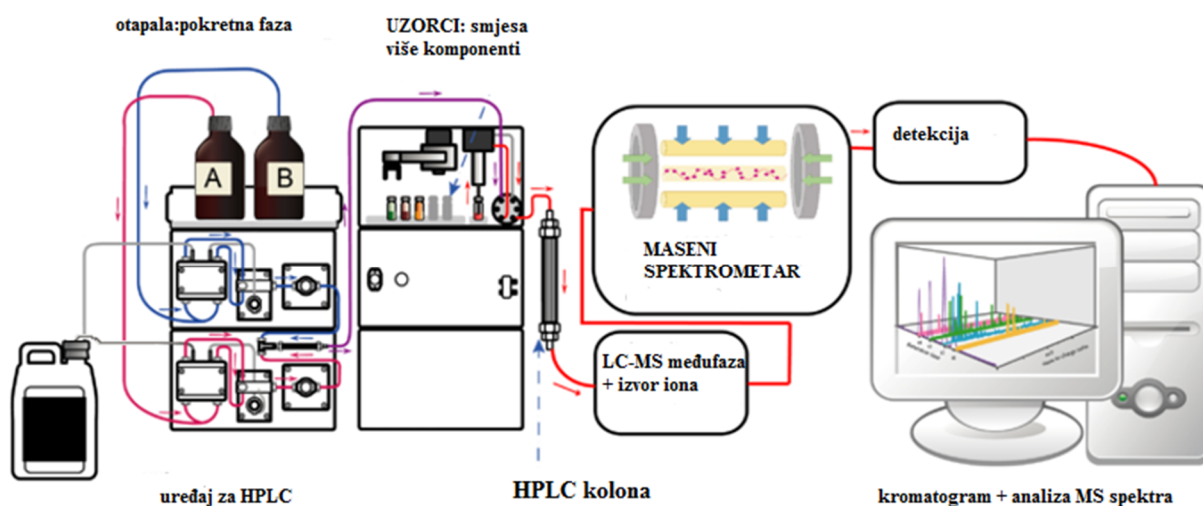
### *Princip metode*

Spregnuta tehnika LC-MS moćna je analitička tehnika koja koristi tekućinsku kromatografiju za odvajanje komponenti smjese, koje se onda uvode u spektrometar masa. Spektrometar potom identificira nabijene ione. LC-MS koristi se za identifikaciju, kvantifikaciju, strukturnu analizu i utvrđivanje molekulske mase spojeva u smjesi. LC-MS je dodatno proširila broj potencijalnih analita i omogućila ispitivanje velikog broja organskih molekula. Ovom tehnikom mogu se analizirati velike, polarne, nabijene, nehlapljive i termički nestabilne tvari.

Masena spektrometrija mjeri omjer mase i naboja ( $m/z$ ) iona i stoga zahtijeva ionizaciju analita. Postoji više načina na koje ionizacija može biti izvedena. Danas se najčešće koriste ionizacija elektroraspršenjem (engl. *electrospray ionisation*, ESI) i ionizacija potpomognuta matriksom uz desorpciju laserskim zračenjem (engl. *matrix-assisted laser desorption ionization*, MALDI), koje su omogućile ionizaciju i velikih molekula koju prijašnje tehnike nisu mogle izvesti. Za potrebe ovog rada korištena je ESI tehnika u kojoj se elektroraspršenje stvara uporabom visokog napona na tekućinu pri atmosferskom tlaku.

Kao što postoji više različitih metoda ionizacije spojeva, tako postoji i više različitih analizatora iona. TOF analizator (engl. *time of flight*) korišten je za izradu ovog rada, a riječ je o relativno jednostavnom uređaju koji mjeri vrijeme potrebno ionu da prijeđe određenu udaljenost uz određenu kinetičku energiju. Onim ionima koji imaju veći omjer mase i naboja potrebno je više vremena da prijeđu istu udaljenost, koju prelaze i ioni s manjim  $m/z$  omjerom (<http://chemistry.emory.edu/msc/tutorial/analyzers.html>).

Osim TOF analizatora, korišten je i DAD (engl. *diode array detector*), UV- Vis detektor kojim se mjeri količina apsorbiranog svjetla pri različitim valnim duljinama, a rezultati se zatim uspoređuju sa standardom. On je korišten za kvantifikaciju jer ima široko područje linearnosti.



Slika 4. Shema LC-MS tehnike (preuzeto s wikipedia.org).

### Michaelis- Mentenčina kinetika

Nakon miješanja enzima i supstrata dolazi do stvaranja kompleksa ES, čija koncentracija raste dok reakcijski sustav ne uđe u ustaljeno stanje. U ustaljenom stanju produkt (P) nastaje stalnom brzinom, koju nazivamo početnom brzinom, a označava se  $V_0$ . Michaelis-Mentenčina kinetika odnosi se na brzine enzimskih reakcija u ustaljenom stanju. Ono će se uspostaviti kada je koncentracija enzima značajno manja od koncentracije supstrata, a trajat će dokle god

je koncentracija produkta zanemarivo mala u odnosu na koncentraciju supstrata. Shema enzimске reakcije u ustaljenom stanju zanemaruje povratnu reakciju.



Michaelis- Mentenčina jednadžba pobliže objašnjava odnos između početne brzine,  $V_0$ , i koncentracije supstrata, [S].

$$V_0 = \frac{v_{max} [S]}{K_m + [S]}$$

Povećanjem koncentracije supstrata početna brzina reakcije će također rasti, ali samo do dostizanja maksimalne brzine koja nastupa kada je enzim u potpunosti zasićen supstratom i kada je koncentracija kompleksa ES jednaka koncentraciji enzima.

Michaelis- Mentenčina konstanta,  $K_m$ , označava koncentraciju supstrata pri kojoj je početna brzina jednaka polovici maksimalne brzine ( $V_{max}$ ), pri određenoj koncentraciji enzima (Kenelly i Rodwell, 2015.).

Katalitička efikasnost, omjer  $V_{max}/K_m$ , koristan je parametar za određivanje ukupnog jetrenog klirensa tvari, usporedbu utjecaja promjene aminokiselinske strukture na funkciju enzima te doprinosa različitih enzima klirensu tvari (Kunze, 2013.).

*LC/MS analiza*

### **HPLC uvjeti:**

- Kolona: Poroshell 120 EC-C18, 100x3,0 mm, 2,7  $\mu$ m
- Protok: 0,4 ml/min
- Temperatura kolone: 40 °C
- Volumen injektiranja: 5  $\mu$ l
- Valna duljina (UV detektor): 350 nm
- Mobilna faza A: voda:metanol:mravlja kiselina = 93:5:2 (V/V/V)
- Mobilna faza B: voda:metanol:mravlja kiselina = 3:95:2 (V/V/V)
- Gradijent:

t (min)	0	14	15	16	20
udio B (%)	40	80	80	40	40

**MS (Q-TOF) uvjeti:**

- Instrument Mode: Low (1700  $m/z$ ), High Resolution (4 GHz, HiRes)
- Ion Polarity: Positive

**Izvor (Source): Dual AJS ESI**

- Gas Temperature: 200 °C
- Drying Gas: 8 L/min
- Nebulizer: 40 psi
- Sheath Gas Temperature: 300 °C
- Sheath Gas Flow: 11 L/min

**MS TOF**

- Fragmentor: 175 V
- Skimmer: 65 V
- OCT 1RF  $V_{pp}$ : 750 V
- Collision Energy: 0 V

**Acquisition mode:**

MS

**TOF Spectra:**

Mass range: 100-1000  $m/z$

**Acquisition rate:**

1 scan/s

**Referent mass:**

$m/z = 121,050873$

$m/z = 922,009798$

### *Interpretacija rezultata*

Identitet metabolita potvrđen je i UV-Vis i Q-TOF detektorom. Na temelju tih podataka može se zaključiti do koje je reakcije došlo, s primarnim interesom na reakcije demetilacije. S obzirom na više različitih koncentracija supstrata, kako bi se odredila kinetika reakcija, kvantificiranje metabolita provedeno je temeljem UV-Vis mjerenja.

## **4.REZULTATI I RASPRAVA**

## 4.1. CYP3A4

Djelovanju enzima CYP3A4 podvrgnuti su sakuranetin i tangeretin.

### 4.1.1. SAKURANETIN

Iako sadrži metilnu skupinu, pokazalo se da sakuranetin ne podliježe reakciji demetilacije te nije detektiran demetilirani produkt.

### 4.1.2. TANGERETIN

Metodom LC-MS detektirani su demetilirani produkti tangeretina i pomoću kalibracijskih krivulja standarda, kvercetina, izvršena je njihova kvantifikacija. Michaelis-Mentenčinom jednadžbom izračunate su vrijednosti  $K_m$  i  $V_{max}$ .

Dobivene vrijednosti dane su u tablici 5. Brzina reakcije izražena je u pmol(produkt)/pmol(enzim)/min. Katalitička efikasnost enzima izražena je kao  $V_{max}/K_m$ . Ona je najveća u slučaju nastanka X-demetiltangeretina, što znači da će enzim CYP3A4 reakcijom demetilacije stvoriti najviše tog produkta.

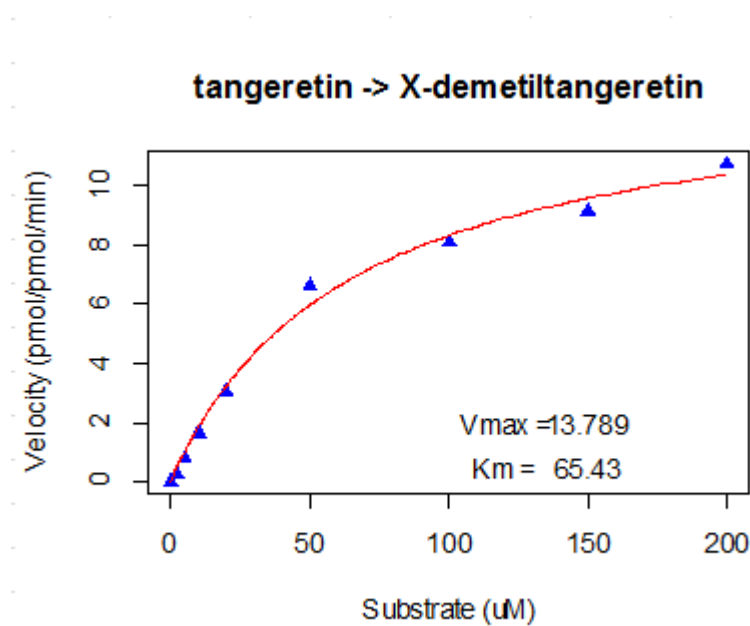
**Tablica 5.** Rezultati izračuna za tangeretin nakon demetilacija sa CYP3A4.

<b>tangeretin → X- + Y- +X, Y - demetiltangeretin</b>			
c (μM)	vP <sub>1</sub> [pmol/pmol/min]	vP <sub>2</sub> [pmol/pmol/min]	vP <sub>3</sub> [pmol/pmol/min]
2	0,216	0,058	0,045
5	0,775	0,288	0,185
10	1,634	0,746	0,421
20	3,026	1,491	0,932
50	6,655	3,247	1,929
100	8,089	4,034	2,193
150	9,151	4,434	2,176
200	10,735	4,908	1,671

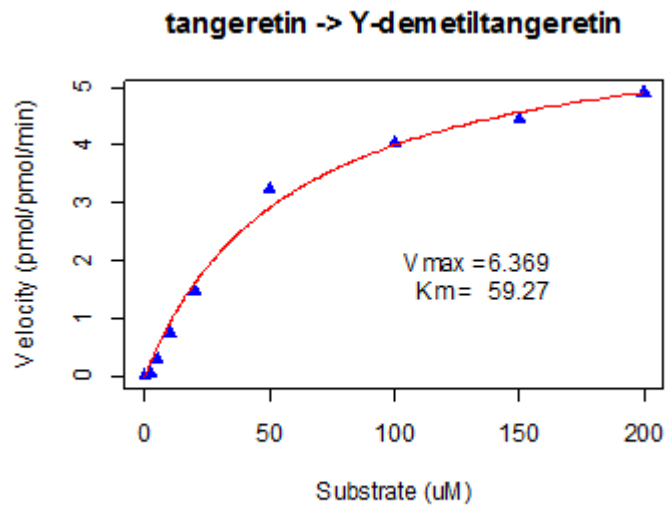


	Procjena	Std.pogreška	Procjena	Std.pogreška	Procjena	Std.pogreška
$V_{max}$	13,789	0,802	6,369	0,356	2,448	0,306
$K_m$	65.432	9,923	59,268	8,968	28,055	12,222
$V_{max}/K_m$	0,211	0,034	0,107	0,017	0,087	0,041

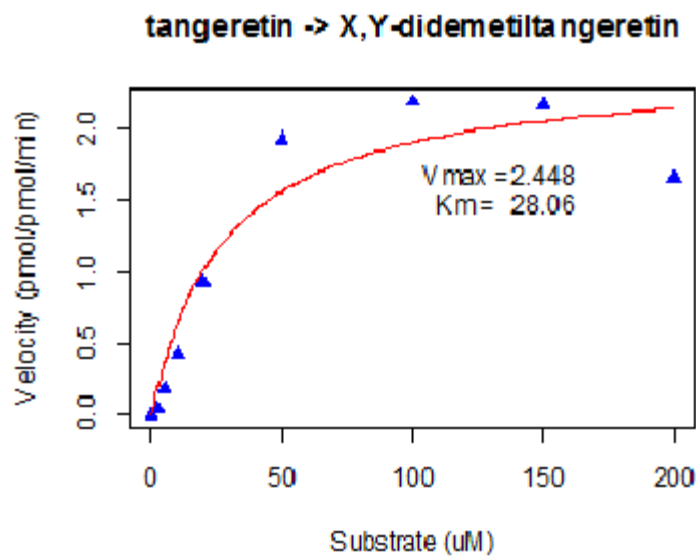
Prvi stupac predstavlja različite koncentracije supstrata, izražene  $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ . Ostala tri stupca daju vrijednost za brzine reakcije nastanka pojedinih produkata reakcija demetilacije. Standardna pogreška izračunata je u statističkom programu R. Na temelju dobivenih podataka napravljeni su grafovi za svaki pojedini metabolit. Plavi trokuti predstavljaju eksperimentom dobivene vrijednosti, a crvene krivulje vrijednosti po Michaelis-Mentenčinoj jednadžbi.



**Slika 5.** Graf kinetike reakcije nastanka X-demetiliranog metabolita tangeretina.



**Slika 6.** Graf kinetike nastanka Y-demetiliranog metabolita tangeretina.



**Slika 7.** Graf kinetike nastanka X,Y- didemetiliranog metabolita tangeretina.

## 4.2. CYP2D6

Enzim CYP2D6 inkubiran je s dva supstrata: akacetinom i tangeretinom.

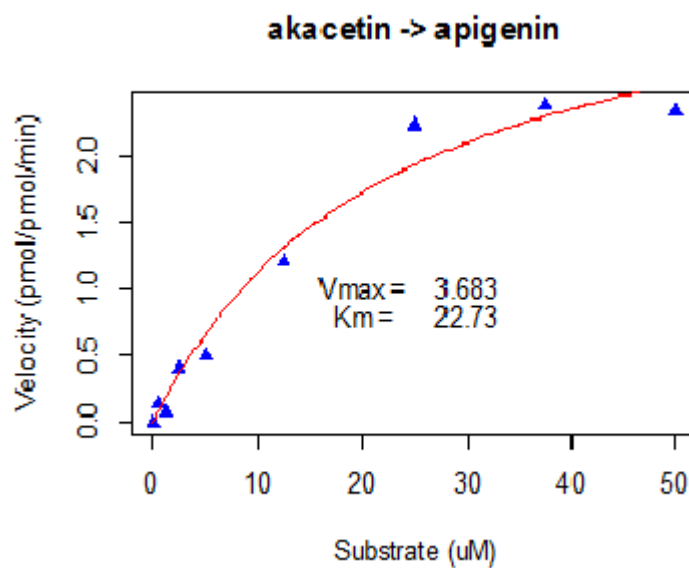
### 4.2.1. AKACETIN

Za akacetin je identificiran jedan produkt demetilacije s CYP2D6, apigenin. Tablica 6 prikazuje vrijednosti za kinetiku reakcije.

**Tablica 6.** Kinetika demetilacije akacetina s CYP2D6.

akacetin → apigenin		
c (μM)	vP <sub>1</sub> [pmol/pmol/min]	
0,5	0,139	
1,25	0,072	
2,5	0,401	
5	0,497	
12,5	1,200	
25	2,229	
37,5	2,370	
50	2,334	
	Procjena	Std.pogreška
$V_{\max}$	3,683	0,492
$K_m$	22,732	6,954
$V_{\max}/K_m$	0,162	0,054

Iz navedenih vrijednosti također je izveden graf, kao i za supstrate CYP3A4 enzima.



**Slika 8.** Kinetika demetilacije akacetina sa CYP2D6.

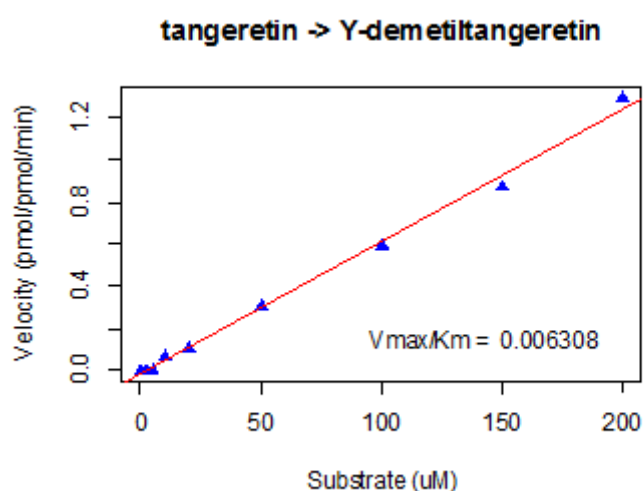
#### 4.2.2. TANGERETIN

Identificirani su metaboliti nastali demetilacijom tangeretina i s CYP2D6 enzimom.

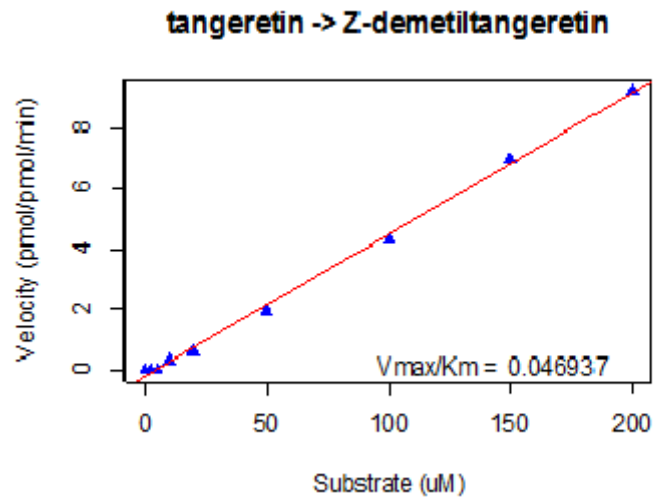
Zbog ograničene topljivosti tangeretina nisu se mogle analizirati visoke koncentracije reaktanta, a posljedično se nije mogla predvidjeti  $V_{max}$  i  $K_m$  za nastanak Y- i Z-demetiltangeretin pa se u tom slučaju može samo predvidjeti nagib pravca u njegovom linearnom dijelu, odnosno  $V_{max}/K_m$ .

**Tablica 7.** Kinetika reakcija CYP2D6 enzima sa tangeretinom.

tangeretin → X- metilirani i oksidirani tangeretin + Y- + Z- demetiltangeretin									
c(μM)	vP <sub>1</sub> [pmol/pmol/min]	vP <sub>2</sub> [pmol/pmol/min]	vP <sub>3</sub> [pmol/pmol/min]	vΣP[pmol/pmol/min]					
2	0,122	0	0	0,122					
5	0,347	0	0	0,347					
10	0,534	0,606	0,312	0,906					
20	0,890	0,103	0,578	1,571					
50	1,457	0,305	1,953	3,715					
100	1,896	0,594	4,286	6,775					
150	1,904	0,871	6,992	9,767					
200	4,875	1,295	9,222	15,392					
	Procjena	Std.pogreška	Procjena	Std.pogreška	Procjena	Std.pogreška	Procjena	Std.pogreška	
$V_{max}$	2,406	0,077	Odsječak na osi y	0,014	-0,207	0,071	-0,028	0,251	
$K_m$	32,869	3,036							
$V_{max}/K_m$	0,073	0,007	S	0,0002	0,047	0,0008	0,072	0,003	



**Slika 9.** Kinetika nastanka Y-demetiltangeretina s CYP2D6.



**Slika 10.** Kinetika nastanka Z-demethyltangeretina s CYP2D6.

## **5. ZAKLJUČAK**

Sprezanje tekućinske kromatografije sa spektrometrijom masa omogućuje pouzdanu identifikaciju produkata reakcija demetilacije aglikona flavonoida CYP enzimima, posebice uz istovremeno povezivanje s DAD i Q-TOF detektorima. Ovakav sustav, osim što daje identitet metabolita, kvantificira svaki pojedini spoj.

Dodatak generirajućeg sustava u reakcijski sustav osigurava dovoljnu količinu koenzima potrebnog za reakcije oksigenacije katalizirane citokromom P450. Generirajući sustav čine glukoza-6-fosfat, glukoza-6-fosfat dehidrogenaza i NADP<sup>+</sup>. Usporedbom strukture standarda flavonoida i metabolita te uz analizu vremena zadržavanja i molekulske mase, može se zaključiti koji je spoj produkt reakcije demetilacije s CYP2D6 i 3A4. Metaboliti se kvantificiraju na temelju UV-Vis spektra i usporedbe s kalibracijskom krivuljom kvercetina. Korištene su različite koncentracije supstrata kako bi se dobile farmakokinetičke značajke reakcije, a brzina reakcije izražena je u pmol produkt/pmol enzim/ min.

Michaelis-Mentenčinom jednadžbom izrazili su se parametri  $K_m$  i  $V_{max}$ .

Za potrebe ovog rada u ispitivanje su uključena tri flavonoida kod kojih se očekivala reakcija demetilacije CYP enzimima. Sakuranetin, koji je bio podvrgnut djelovanju CYP3A4 nije pokazao da podliježe reakciji demetilacije. Tangeretin je dao demetilirane produkte koji su kvantificirani. S CYP2D6 inkubirani su tangeretin i akacetin te su oba flavonoida dala demetilirane produkte te je određena kinetika reakcije. Primjer tangeretina je pokazao da više različitih CYP enzima može utjecati na metabolizam jednog flavonoida.

Flavonoidi su jako velika skupina spojeva te je ispitivanje njihovog metabolizma, zbog mogućih korisnih ili neželjenih učinaka, od iznimne važnosti. Ovi rezultati daju uvid u dio tog metabolizma. Uključivanje CYP2D6 i 3A4 u istraživanje bitno je za predviđanje mogućih interakcija, kojima su spojevi koji se metaboliziraju preko ova dva enzima, skloni. Ispitivanje kinetike tih reakcija pomaže u procjeni vjerojatnosti ozbiljne interakcije flavonoida s lijekovima.



## **6. LITERATURA**

Basic of LC/MS. Hewlett Packard, 1998, 23, 5968-2543E

Rendić S, Medić-Šarić M. Metabolizam lijekova i odabranih ksenobiotika. Zagreb, Medicinska naklada, 2013, str. 82.

Rendić S. Uloga i značaj metaboličkih reakcija kataliziranih enzimima citokrom P450 (CYP) kod bioloških djelovanja lijekova. *Medicus*, 1995, 4:49-66.

Bojić M. Predklinička ispitivanja inhibicijskog i interakcijskog potencijala novih lijekova na razini citokroma P450. *Farmaceutski glasnik*, 2015, 71:229-242.

Kumar S, Pandey AK. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *Scientific World Journal*, 2013, Article ID 162750.

Krauser JA, Guengerich FP Cytochrome P450 3A4-catalyzed Testosterone 6-Hydroxylation Stereochemistry, Kinetic Deuterium Isotope Effects. and Rate-limiting Steps. *The Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280:19496-19506.

Panche A, Diwan A, Chandra S. Flavonoids: An overview. *Journal of Nutritional Science*, 2016; 5: E47.

Ye H, Ng HW, Sakkiah S, Ge W, Perkins R, Tong W, Hong H. Pathway Analysis Revealed Potential Diverse Health Impacts of Flavonoids that Bind Estrogen Receptors. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2016, 13:373

Phenol explorer Database on polyphenol content in food, <http://phenol-explorer.eu>, pristupljeno 28.1.2018.

Li YR, Li S, Ho CT, Chang YH, Tan KT, Chung KW, Wang BY, Chen YK, Lin CC. Tangeretin derivative, 5-acetyloxy-6,7,8,4'-tetramethoxyflavone induces G2/M arrest, apoptosis and autophagy in human non-small cell lung cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Biology and Therapy*, 2016, 17:48-64.

Drug Development and Drug Interactions: Table of Substrates, Inhibitors and Inducers, <https://www.fda.gov/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/DevelopmentResources/DrugInteractionsLabeling/ucm093664.htm>, pristupljeno 28.01.2018.

Stedman C, Robertson G, Coulter S, Liddle C. Feed-Forward Regulation of Bile Acid Detoxification by CYP3A4: Studies in Humanized Transgenic Mice. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 279:11336-11343.

Ho PC, Saville DJ, Wanwimolruk S. Inhibition of human CYP3A4 activity by grapefruit flavonoids, furanocoumarins and related compounds. *Canadian Society for Pharmaceutical Sciences* 2001, 4:217-227.

CYP2D6 GENE, <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/CYP2D6>, pristupljeno 29.01.2018.

Kunze K. Enzyme Kinetics and Reversible Inhibition. *Medical Chemistry*, 2013, 527

Jurica J, Sulcova A. Determination of Cytochrome P450 Metabolic Activity Using Selective Markers. *Topics on Drug Metabolism*, InTech 2012, str. 192-208.

Get to know an enzyme, <http://www.pharmacytimes.com/publications/issue/2008/2008-07/2008-07-8624>, pristupljeno 29.01.2018.

Method and composition to evaluate cytochrome P450 2D6 isoenzyme activity using a breath test, <https://patents.google.com/patent/US20070026480> , pristupljeno 29.01.2018.

Sohl CD, Cheng Q, Guengerich FP. Chromatographic assays of drug oxidation by human cytochrome P450 3A4. *Nature protocols*. 2009, 4:1252-1257.

Hodek P, Trefil P, Striborova M. Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chemico-biological interactions*, 2002, 139:1-21.

Rodwell V, Bender D, Botham K, Kenelly P, Weil A. *Harper's biochemistry*, McGraw-Hill Medical, 2015, str. 79.

Mass spectrometry center <http://chemistry.emory.edu/msc/index.html>, pristupljeno 31.1.2018.

Vaiyapuri S, Ali MS, Moraes LA, Sage T, Lewis KR, Jones CI, Gibbins JM. Tangeretin Regulates Platelet Function Through Inhibition of Phosphoinositide 3-Kinase and Cyclic Nucleotide Signaling. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2013, 33:2740-2749.

Singh RP, Agrawal P, Yim D, Agarwal C, Agarwal R. Acacetin inhibits cell growth and cell cycle progression, and induces apoptosis in human prostate cancer cells: structure–activity relationship with linarin and linarin acetate. *Carcinogenesis*, 2005, 26:845-854.

Diagram of an LC-MS system,

[https://en.wikipedia.org/wiki/File:Liquid\\_chromatography\\_tandem\\_Mass\\_spectrometry\\_diagram.png](https://en.wikipedia.org/wiki/File:Liquid_chromatography_tandem_Mass_spectrometry_diagram.png), pristupljeno 2.2.2018.

Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2004, 79:727-747.

Polya G. Biochemical targets of plant bioactive compounds. CRC Press, 2003, str. 306.

Katsumata S, Hamana K, Horie K, Toshima H, Hasegawa M. Identification of Sternbin and Naringenin as Detoxified Metabolites from the Rice Flavanone Phytoalexin Sakuranetin by *Pyricularia oryzae*. Chemistry and Biodiversity, 2017, 14: e1600240

## **7. SAŽETAK**

## SAŽETAK

Flavonoidi su velika skupina spojeva, čiji su glavni izvori voće i povrće. Osnovu strukture čine dva benzenska prstena povezana piranskim prstenom. Dalje se flavonoidi dijele u različite podskupine, ovisno o položaju vezanja prstenova i o supstituentima. Flavonoidi su otkriveni puno prije negoli je interes za njihova istraživanja porastao, a to se dogodilo zbog saznanja da imaju jako antioksidativno djelovanje. Danas se istražuju njihov metabolizam, učinak na prevenciju nekih bolesti kao što su različite vrste raka, srčane bolesti i dijabetes. Metabolizam flavonoida odvija se preko CYP enzima, što ispitivanja na tom području čini bitnima za prevenciju interakcija, budući da se pokazalo da flavonoidi mogu inhibirati i inducirati ovu superporodicu enzima.

Za potrebe ovog rada ispitane su reakcije demetilacije flavonoida enzimima CYP2D6 i 3A4. Izabrani flavonoidi su sakuranetin, akacetin i tangeretin. Za identifikaciju metabolita korištena je spregnuta tehnika, LC-MS s DAD i Q-TOF detektorom, jer daje pouzdane podatke o molekulskoj masi i strukturi metabolita. U svrhu kvantifikacije produkata korištene su kalibracijske krivulje kvercetina. Kinetika reakcije određena je Michaelis-Mentenčinom jednačinom te su iskazane vrijednosti  $V_{\max}$  i  $K_m$ . Pokazalo se da tangeretin daje produkte demetilacije s oba enzima, a veću katalitičku efikasnost ima CYP3A4. Sakuranetin se ne demetilira s CYP3A4, a akacetin se metabolizira enzimom CYP2D6 do apigenina.

Ispitani flavonoidi imaju potencijal interakcija preko citokroma P450 3A4 i 2D6. Uzimajući u obzir i polimorfizam enzima CYP2D6, ovi rezultati bitni su za bolje razumijevanje metabolizma flavonoida, predviđanje i sprječavanje međudjelovanja s drugim spojevima.

## SUMMARY

Flavonoids are a large group of compounds, that people ingest through fruit and vegetables. The basic structure of flavonoids consists of two benzene rings which are connected by a pyran. These compounds are divided in many subgroups, depending on the position of ring connection and substituents. Flavonoids were discovered years before the interest in their research intensified because of the discovery of their strong antioxidant activity. Most of researches are focused on their metabolism and prevention of cancer, diabetes and heart diseases. Flavonoids are metabolised by cytochrome P450 enzymes. Metabolism mediated by CYP enzymes indicates a strong possibility of interactions and thorough studies are important in order to prevent them, considering the fact that inhibitory and inductive CYP activity of flavonoids persists.

Three flavonoids were selected in order to study demethylation kinetics by enzymes CYP2D6 and 3A4. Selected flavonoids were sakuranetin, tangeretin and acacetin. Because of the possibility to give precise molecular mass and structure of metabolites, the chosen method of identification was LC-MS connected to DAD and Q-TOF detector. For quantification calibration curves of quercetin were used. Reaction kinetic was determined by Michaelis-Menten equation. The study has shown that tangeretin gives demethylation products when incubated with both, CYP3A4 and 2D6 enzymes, but greater efficacy of catalysis is related to CYP3A4. Sakuranetin is not demethylated by CYP3A4 and acacetin has one demethylation by CYP2D6 metabolite, apigenin.

Flavonoids that have been studied have potential to interact via cytochrome P450 metabolism. Taking the polymorphism of CYP2D6 in consideration, these results are important for predicting and preventing flavonoid-drug interactions.





**TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA**  
**BASIC DOCUMENTATION CARD**

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Zavod za farmaceutsku kemiju  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### KINETIKA REAKCIJE DEMETILACIJE AGLIKONA FLAVONOIDA POSREDOVANA CITOKROMIMA P450 3A4 I 2D6

Josipa Vučenović

#### SAŽETAK

Flavonoidi su velika skupina spojeva, čiji su glavni izvori voće i povrće. Osnovu strukture čine dva benzenska prstena povezana piranskim prstenom. Dalje se flavonoidi dijele u različite podskupine, ovisno o položaju vezanja prstenova i o supstituentima. Flavonoidi su otkriveni puno prije negoli je interes za njihova istraživanja porastao, a to se dogodilo zbog saznanja da imaju jako antioksidativno djelovanje. Danas se istražuju njihov metabolizam, učinak na prevenciju nekih bolesti kao što su različite vrste raka, srčane bolesti i dijabetes. Metabolizam flavonoida odvija se preko CYP enzima, što ispitivanja na tom području čini bitnima za prevenciju interakcija, budući da se pokazalo da flavonoidi mogu inhibirati i inducirati ovu superporodicu enzima.

Za potrebe ovog rada ispitane su reakcije demetilacije flavonoida enzimima CYP2D6 i 3A4. Izabrani flavonoidi su sakuranetin, akacetin i tangeretin. Za identifikaciju metabolita korištena je spregnuta tehnika, LC-MS s DAD i Q-TOF detektorom, jer daje pouzdane podatke o molekulskoj masi i strukturi metabolita. U svrhu kvantifikacije produkata korištene su kalibracijske krivulje kvercetina. Kinetika reakcije određena je Michaelis-Mentenčinom jednačbom te su iskazane vrijednosti  $V_{\max}$  i  $K_m$ . Pokazalo se da tangeretin daje produkte demetilacije s oba enzima, a veću katalitičku efikasnost ima CYP3A4. Sakuranetin se ne demetilira s CYP3A4, a akacetin se metabolizira enzimom CYP2D6 do apigenina.

Ispitani flavonoidi imaju potencijal interakcija preko citokroma P450 3A4 i 2D6. Uzimajući u obzir i polimorfizam enzima CYP2D6, ovi rezultati bitni su za bolje razumijevanje metabolizma flavonoida, predviđanje i sprječavanje međudjelovanja s drugim spojevima.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta  
Rad sadrži: 39 stranica, 10 grafičkih prikaza, 7 tablica i 25 literarnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.  
Ključne riječi: flavonoidi, CYP3A4, CYP 2D6

Mentor: **Dr.sc. Mirza Bojić**, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko- biokemijskog fakulteta

Ocjenjivači: **Dr.sc. Mirza Bojić**, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko- biokemijskog fakulteta  
**Dr.sc. Željko Maleš**, redoviti profesor u trajnom zvanju Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-  
biokemijskog fakulteta  
**Dr.sc. Hrvoje Rimac**, viši asistent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta

Rad prihvaćen: travanj 2018.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Department of Pharmaceutical Chemistry  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### KINETICS OF DEMETHYLATION REACTIONS OF FLAVONOID AGLYCONES MEDIATED BY CYTOCHROMES P450 3A4 AND 2D6

Josipa Vučenović

#### SUMMARY

Flavonoids are a large group of compounds, that people ingest through fruit and vegetables. The basic structure of flavonoids consists of two benzene rings which are connected by a pyran. These compounds are divided in many subgroups, depending on the position of ring connection and substituents. Flavonoids were discovered years before the interest in their research intensified because of the discovery of their strong antioxidant activity. Most of researches are focused on their metabolism and prevention of cancer, diabetes and heart diseases. Flavonoids are metabolised by cytochrome P450 enzymes. Metabolism mediated by CYP enzymes indicates a strong possibility of interactions and thorough studies are important in order to prevent them, considering the fact that inhibitory and inductive CYP activity of flavonoids persists.

Three flavonoids were selected in order to study demethylation kinetics by enzymes CYP2D6 and 3A4. Selected flavonoids were sakuranetin, tangeretin and acacetin. Because of the possibility to give precise molecular mass and structure of metabolites, the chosen metode of identification was LC-MS connected to DAD and Q-TOF detector. For quantification calibration curves of quercetin were used. Reaction kinetic was determined by Michaelis- Menten equation. The study has shown that tangeretin gives demethylation products when incubated with both, CYP3A4 and 2D6 enzymes, but greater efficacy of catalysis is related to CYP3A4. Sakuranetin is not demethylated by CYP3A4 and acacetin has one demethylation by CYP2D6 metabolite, apigenin.

Flavonoids that have been studied have potential to interact via cytochrome P450 metabolism. Taking the polymorfism of CYP2D6 in consideration, these results are important for predicting and preventing flavonoid-drug interactions.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 39 pages, 10 figures, 7 tables, 25 references. Original is in Croatian language

Key words: flavonoids, CYP3A4, CYP2D6

Mentor: **Mirza Bojić, Ph.D.**, *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Mirza Bojić, Ph.D.**, *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

**Željko Maleš, Ph.D.**, *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

**Hrvoje Rimac, Ph.D.**, *Senior Instructor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: April 2018