

Baikalin-transzporter kölcsönhatások

Doktori tézisek

Kalaposné Kovács Bernadett

Semmelweis Egyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Klebovich Imre, D.Sc., egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Szökő Éva, DSc., egyetemi tanár
Dr. Horváth Györgyi, PhD., egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Török Tamás, DSc., egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Tóthfalusi László, PhD., egyetemi docens
Dr. Halmos Gábor, PhD., egyetemi tanár

Budapest
2016

Bevezetés

A Kínai Gyógyszerkönyvben megtalálható *Radix Scutellariae* ban, a baikáli csukóka szárított gyökerében eddig több mint 50 flavonoidot azonosítottak, legnagyobb mennyiségben a baikalint (baikalein-7-glükuronid, BG) és aglikonját a baikaleint (5, 6, 7-trihidroxifavon, B). Relatív alacsony toxicitásuknak és a *Radix Scutellariae* ban nagy koncentrációjú jelenlétüknek köszönhetően ezen flavonoidok az egyik legszélesebb körben kutatott fitomedicinák közé tartoznak. Számos in vivo és in vitro kísérlet bizonyította, hogy a baikalin és aglikonja rendkívül fontos hatóanyagok, melyek jelentős daganatellenes, -májvédő,- gyulladásgátló,- antioxidáns,- antivirális, neuroprotektív- és antiallergén hatással rendelkeznek.

A baikalin a felső béltraktusban azonnal felszívódik, vagy baikaleinné hidrolizálódik, utóbbi passzív diffúzióval jól abszorbeál a bélhámsejtekbe.

Ezzel megegyezően a baikalein orális bevitele után a baikalein passzív diffúzióval bejut a bélhámsejtekbe. Az enterocitákban a baikalein több, mint 90%-a baikalinná alakul extenzív "first-pass" intesztinális fázis II metabolizmus (főként glükuronizáció) révén. Jó lipofil tulajdonságának köszönhetően a baikalein jó permeabilitású molekula, de az epitél bélhámsejtekben kialakult glükuronid származéka, a baikalin túl poláros ahhoz, hogy passzív diffúzióval átjusson a kettős lipidrétegen. Számos állatkísérlet kimutatta, hogy baikalein, vagy baikalin orális bevitele után a molekula predominantan baikalin formában van jelen a vérkeringésben.

Az utóbbi évtizedekben számos in vitro és in vivo kísérlet bizonyította, hogy a baikalin a transzportfehérjékkel extenzíven kölcsön hat és kritikus szerepet játszhat a multidrog rezisztencia módosításában, valamint a gyógyszerek eloszlásában. Egy újabb patkánybél perfúziós modellen és Caco-2 monolayeren végzett vizsgálat feltárta, hogy a bélhámsejtekben baikaleinnek több, mint 90%-a gyorsan baikalinná alakul, mielőtt a mezenteriális keringésbe kerül. Ráadásul a baikalin szignifikáns biliáris és szinuszoidális transzportja volt megfigyelhető a hepatocitákból. Mrp2-deficiens patkányokban csökkent a szinuszoidális transzport. Így feltételezhető, hogy az intracellulárisan kialakult baikalin enterohepatikus transzportjában fontos szerepet játszanak a transzporterek.

AZ ATP kötő transzporterek (ATP-binding cassette, ABC) és a szerves anion transzportáló polipeptidek (OATP) olyan fehérjemolekulákként váltak ismertté, melyek számos szubsztrátot, köztük metabolitot képesek a sejtbe felvenni. Az MRP-k (Multidrug resistance associated proteins) családjába tartozó MRP2 (ABCC2) és MRP3(ABCC3) hasonló szubsztrát specificitással rendelkeznek és organikus anionok és fázis II metabolitokat transzportálnak, mint például glutation, glükuronid és szulfát konjugátumokat.

Valószínűsíthető, hogy MRP2 és/vagy BCRP (Breast cancer resistance protein, ABCG2) a flavonoid konjugátumok apikális oldali, intesztinális effluxáért felelnek. Több kísérlet eredményei bizonyították, hogy a BCRP-, MRP2- és MRP3-mediált vezikuláris transzportot a baicalin nagyon hatékonyan gátolta, ugyanakkor a BCRP, MRP2 és MRP3 ATPáz aktivitását pedig aktiválta.

Ebből arra lehet következtetni, hogy az MRP3 fontos szerepet játszhat a baicalin intesztinális sejtekből történő bazolaterális transzportjában, míg MRP2 és BCRP az enterociták apikális oldalán pumpálják ki a baicalint. Ráadásul a baicalin kölcsönhatásba lépett OATP2B1 és OATP1B3 transzporterekkel gátlás esszékben. Ezzel ellentétben a baicalin nem gátolta a két másik hepatikus és/vagy intesztinális uptake transzportert, OATP1B1-t és OATP1A2-t.

Fontos megemlíteni, hogy az ABC transzporterek gátlásával a baicalin modulálhatja a gyógyszerek felszívódását és eloszlását, így növelve a módosított hatás és toxicitás kockázatát. Miután a baicalin és a baikalein jelentős terápiás potenciállal rendelkeznek, farmakológiai hatásuk megértéséhez, a gyógyszeres kezelés megtervezéséhez, illetve a potenciális gyógyszerkölcsönhatások vizsgálatához farmakokinetikai tulajdonságaik pontos megismerése szükséges.

Célkitűzés

Az utóbbi évtizedben in vitro és in vivo vizsgálatok bizonyították, hogy a baicalin extenzíven kölcsönhatásba lép a transzporterekkel és kritikus szerepet játszik a multidrogr rezisztencia modulálásában, valamint a gyógyszerek felszívódásában és eloszlásában. Farmakokinetikai kölcsönhatások révén, a gyógyszer ADME tulajdonságainak, hatékonyságának vagy toxicitásának modulálásával változhat a gyógyszerek eloszlása, melynek klinikai fontosságú következményei lehetnek.

Munkám célkitűzései az alábbiak voltak:

- A baicalin ABC transzporterekkel való kölcsönhatásának, gátló hatásának vizsgálata
- Beazonosítani azokat az ABC transzportereket, melyek a baicalin enterocitákból és hepatocitákból történő kipumpálásában játszanak fontos szerepet,
- Beazonosítani azokat az uptake transzportereket, melyek a baicalin enterocitákba és hepatocitákba történő felvételében játszanak fontos szerepet.

Módszerek

Efflux transzport

Bizonyított, hogy a vezikuláris transzport módszer alkalmazható a transzporterek flavonoidok permeabilitására való hatásának vizsgálatára. Az IC₅₀ a maximálisan felaktivált fehérje 50%-os gátlásához tartozó baicalin koncentrációt jelenti. A transzporter kölcsönhatások vizsgálatára vonatkozó aktuális FDA és EMA irányelvek az IC₅₀ értékek meghatározásától függenek, miután ezen adatokat használják arra, hogy megállapítsák, szükséges-e egy klinikai kölcsönhatás vizsgálatot elvégezni.

Ezen irányelvek döntési fákat tartalmaznak, melyekben az IC₅₀ értékek klinikai hatóanyag koncentráció összefüggéséből megállapítható, hogy szükséges-e a klinikai kölcsönhatás vizsgálatot elvégezni.

Vezikuláris transzport gátlás kísérletek

Vizsgálataim során először gátlás, majd direkt vezikuláris transzport tesztet végeztem kiválasztott efflux transzporterekkel overexpresszált sejtekből kinyert membrán vezikulumokon. A membránvezikulák egy része kifordított, ún. “inside-out” orientáltságú. Ezen kifordított vezikulák esetében az efflux transzporter a molekulákat a vezikula belsejébe pumpálja. A vezikulák a bepumpált molekulákkal együtt megfelelő szűrési technikával elválaszthatók és ezt követően a szubsztrát mennyisége detektálható.

Baicalin gátlását vizsgáltam az alábbi radioaktívan jelölt, transzporter-specifikus szubsztrátok transzportjára, ATP jelenlétében és hiányában (AMP hozzáadásával):

- N-metil-kinidin transzportja multidrog rezisztens fehérje 1 (MDR1)-et túlexpresszálo mielogén leukemia (K562) sejtekből,
- Bimán glutation konjugátum transzportja multidrog rezisztens fehérje 1 (MRP1)-et túlexpresszálo *Spodoptera frugiperda* petefészek (Sf9) sejtekből,
- Ösztradiol-17-β-D-glükuronid transzportja MRP2-t túlexpresszálo Sf9, illetve human embrió vese sejtekből,
- Ösztradiol-17-β-D-glükuronid transzportja MRP3-t túlexpresszálo Sf9, illetve HEK293 sejtekből,

- Dehidroepiandroszteron szulfát transzportja MRP4-t túlexpresszálo HEK293 sejtekből
- Ösztron-3-szulfát transzportja BCRP-t túlexpresszálo Michigan Cancer Foundation-7 (MCF7) sejtekből kinyert membrán vezikulumokon, növekvő koncentrációjú baikalin hozzáadásával, gyors filtrációs módszerrel.

A vezikulákat tartalmazó elegyet preinkubáltam. A ^3H jelölt transzporter specifikus szubtrátot hozzáadtam az elegyhez. A 75 μl reakció térfogatú well-ek, 50 μg fehérjét/well, illetve 0.75 μl növekvő koncentrációjú baikalint tartalmaztak. A hígítási sor 150 szeresre hígult a well ekbe történő adagolás után. A transzportot a megfelelő well be 4 mM ATP vagy AMP hozzáadásával indítottam. A transzportot specifikus inkubációs ideig és hőmérsékleten végeztem.

A transzportot hideg mosó pufferrel állítottam le, a specifikus inkubációs idő letelte után. A mintákat B besorolású, 1- μm pórusméretű, üvegszálas filterekre átmértem (Millipore, Billerica, MA, USA). A filtereket 5 x 200 μL hideg pufferrel mostam, majd szárítottam. 100 μL szcintillációs koktél hozzáadása után mértem a filteren maradt radioaktivitást folyadék szcintilláció méréssel (Perkin Elmer 1450 LSC, Luminescence counter, Microbeta Trilux).

Az eredményeket cpm ben kaptam.

A jelölt szubsztrát ATP függő transzportjának, illetve a maximális transzporthoz viszonyított relatív aktivitás számolása után meghatároztam az IC_{50} értékeket GraphPad (San Diego, CA, USA) Prism 5-ös verziójával (egy kötő hely, dózis-válasz görbe illesztéssel). A méréseket 2 párhuzamossal, 3-szor ismételttem meg.

Számolások:

ATP függő transzport: ATP jelenlétében mért értékek átlagából kivont ATP hiányában (AMP) mért értékek átlaga.

ATP függő transzport (pmol/mg/perc): Az adott lyukban mért cpm ek szorzata a *totál aktivitást* adja (cpm). A transzport sebességét pmol/mg membrán fehérje/perc az alábbi képlettel számoltam:

$$\frac{\text{ATP függő transzport (cpm)}}{\text{Teljesaktívítás (cpm)}} * \frac{\text{Szubsztrát koncentráció (nM)} * \text{Térfogat (ml)}}{\text{membránfehérje (mg)} * \text{idő (perc)}}$$

ATP függő transzport (%): 100% nak vettem a baicalin hozzáadás nélküli ATP függő transzportot és ehhez viszonyított transzport értékek, baicalin jelenlétében.

Vezikuláris szubsztrát transzport kísérletek

Direkt vezikuláris transzport tesztet végeztem a baicalin ATP-függő felhalmozódásának vizsgálatához, ATP jelenlétében, illetve hiányában (AMP hozzáadásával):

- MDR1-et túlexpresszázó K562,
- MRP1-et túlexpresszázó Sf9,
- MRP2-t túlexpresszázó HEK293,
- MRP3-t túlexpresszázó HEK293,
- MRP4-t túlexpresszázó HEK293 és
- BCRP-t túlexpresszázó MC7 sejtekből kinyert vezikulákban, gyors filtrációs módszerrel.

Minden esetben elvégeztem a méréseket a megfelelő kontroll sejteken is (HEK293 kontroll, M kontroll és K kontroll). A membránok hatékonyságát működését ismert jelölt szubsztrátok transzportjának vizsgálatával végeztem

A reakciókat az előző IC₅₀ adatokhoz igazított 2 baicalin koncentrációnál (magas és alacsony) végeztem, 2 időpontban. A kísérleteket kétszer megismételtem azokkal a paraméterekkel ahol maximális volt a felhalmozódás sebessége.

A vezikulákat tartalmazó elegyet preinkubáltam. A különböző koncentrációjú baikalint bemértem a megfelelő wellbe, hozzáadtam az elegyet. A 75 µl reakció térfogatú well-ek, 50 µg fehérjét/well, illetve 0.75 µl növekvő koncentrációjú baikalint tartalmaztak. A hígítási sor 150 szerezre hígult a well ekbe történő adagolás után. A transzportot a megfelelő well be 4 mM ATP vagy AMP indítottam. A transzportot specifikus inkubációs idővel és hőmérsékleten végeztem.

A transzportot hideg mosó pufferrel állítottam le, a specifikus inkubációs idő letelte után. A mintákat B besorolású, 1-µm pórusméretű, üvegszálas filterekre átmértem (Millipore, Billerica, MA, USA). A filtereket 5 x 200 µL hideg pufferrel mostam, majd szárítottam.

A vezikulákat 2 x 150 µl metanollal feltártam, a baikalint tartalmazó eluált oldatot speedvac koncentrátorral szárítottam (Thermo DNA 120) és bioanalízissel mértem.

A transzportált baikalin mennyiséget LC-MS/MS analízissel határoztam meg.

Az MTA-TTK Szerves kémiai intézetének Metabolomika kutatócsoportjával egy LC-MS/MS módszer fejlesztése történt a vezikulákba bezáródott baikalin meghatározásához. A kromatográfiás elválasztás inverz gradiens elúcióval történt, reverz fázisú oszlopon. A baikalin kvantifikálása többszörös termékion figyeléssel történt, electrospray ionizációval.

A bezáródott baikalin mennyiségekből számoltam ATP függő transzportot.

A méréseket 3 párhuzamossal, 3-szor ismételttem meg.

Uptake transzport

Uptake transzport kísérletek

Végezetül uptake transzporterekkel overexpresszált sejteken vizsgáltam, hogy mely uptake transzporter felel a baikalin a sejtekbe történő felvételéért.

- OATP2B1-MDCKII
- vad típusú MDCKII
- OATP1B3-HEK293
- HEK293 mock sejteken.

Először megvalósíthatósági szkrínélést végeztem két eltérő koncentrációjú baikalin oldat hozzáadásával. A sejteket 37°C-on, 2 választott inkubációs ideig inkubáltam. A méréseket 3 párhuzamos ponttal, 3-szor ismételttem meg.

Ezután 8 időpontban, (0-45 perc) időfüggést végeztem 5 µM baikalin hozzáadásával, az ideális inkubációs idő megállapításához. A méréseket 3 párhuzamos ponttal, 2-szer ismételttem meg.

Végezetül telítési mérések során transzfektált és kontroll sejtekhez 8 különböző koncentrációjú (1 µM - 100 µM) baikalin hozzáadásával vizsgáltam a baikalin uptake transzport koncentráció függését, az előzőleg meghatározott inkubációs időtartam alatt.

Minden esetben végeztem ismert szubsztrátokkal kontroll méréseket, illetve fehérje meghatározást, a sejtek és transzporterek megfelelő működésének ellenőrzéséhez. A kinetikai paraméterek GraphPad Prism-el határoztam meg. A méréseket 3 párhuzamossal, 3-szor ismételttem meg.

„Bicinchoninic acid kit”-et használtam a teljes fehérje meghatározásához. Pozitív kontroll méréseket végeztem a transzporterek specifikus szubsztrátjaival a sejtek aktivitásának ellenőrzéséhez.

Új tudományos eredmények

- BCRP-, MDR1-, MRP2-, MRP3- és MRP4-mediált transzport farmakológiailag releváns baicalin koncentráció függő gátlását figyeltem meg. BCRP mediált transzportot a baicalin $3,41 \pm 1,83 \mu\text{M}$ -os IC_{50} értékkel gátolta. MRP3 és MRP4 gátlása egyaránt hatékony volt (MRP3: $14,01 \pm 2,51 \mu\text{M}$ és MRP4: $14,39 \pm 5,69 \mu\text{M}$ IC_{50} értékkel). MDR1 és MRP2 gátlása kevésbé bizonyult hatékonynak (MDR1: $\text{IC}_{50} = 94,84 \pm 31,10 \mu\text{M}$ és MRP2: $\text{IC}_{50} = 210,13 \pm 110,49 \mu\text{M}$).
- A direkt vezikuláris transzport kísérletek egyértelműen meghatározták, hogy MRP3 és MRP4 baicalin bazolaterális effluxában, míg MRP2 és BCRP baicalin apikális effluxában játszhatnak fontos szerepet.
- Az uptake megvalósíthatósági mérések adatai kimutatták, hogy baicalin az OATP2B1-et expresszált sejtekben 7,89 – 21,51 –folddal nagyobb uptake-et mutatott a vad típusú MDCKII kontroll sejtekhez képest, azonos körülmények között. Ezzel szemben baicalin az OATP1B3-at expresszáló sejtekben 1.08 – 1.91 –folddal nagyobb uptake volt mérhető a HEK293 mock sejtekhez képest. Az általánosan elfogadott szabályozási irányelvek alapján a transzfektált sejtekben egy 2-fold uptake a kontroll sejtekhez képest tekinthető farmakológiailag szignifikánsnak. Ezért kizárólag az OATP2B1- baicalin kölcsönhatást vizsgáltuk tovább.
- A baicalin OATP2B1 általi transzport időfüggését állapítottam meg. 10 percre lineáris kinetikát tapasztaltam. Egyenes illesztésével 3 percnél határoztam meg az optimális inkubálási időt.
- A baicalin OATP2B1 koncentráció-függő felvételének inkubációs idejét 3 percre becsültük. A baicalin OATP2B1-mediált transzportja telíthető volt, specifikus K_m ($9,71 \pm 3,56 \mu\text{M}$), V_{max} ($1575 \pm 674,58 \text{ pmol/mg fehérje min}$) és intrinzik klírens ($162,13 \mu\text{l/min mg fehérje}$) értékekkel.

Következtetések

Miután a baikalin és baikalein számos terápiás potenciállal rendelkezik, farmakokinetikájuk és biohasznosulások megismerése szükséges a klinikai hatások részletezéséhez, a gyógykezelések megtervezéséhez és a potenciális gyógyszer kölcsönhatások megértéséhez.

Potenciális baikalin efflux transzporter kölcsönhatást vizsgáltam gátlás, illetve direkt vezikuláris transzport teszttel, efflux transzporterekkel overexpresszált sejtekből kinyert membrán vezikulumokon. Továbbá uptake transzporterekkel overexpresszált sejteken vizsgáltam, hogy mely uptake transzporter felel a baikalin májba és enterocitákba történő felvételéért.

A baikalein enterocitákba történő passzív diffúziója után a bélhámsejtben baikalinná intenzíven glükuronizálódik. Eredményeim alapján valószínűsíthető, hogy a bélhámsejtben kialakuló baikalin kiáramlásáért a bél lumenbe az apikális oldalon az MRP2 és BCRP felel. A bazolaterális oldalon az MRP3 és MRP4 a vérbe történő effluxában játszhatnak fontos szerepet. Az OATP2B1 együttműködik az MRP3 és MRP4 el a baikalin vérbe történő felszívódásában. A vérbe felszívódott baikalint az OATP2B1 juttathatja be a májba, az MRP2 és BCRP pedig az epe felé üríti, miközben az MRP3 és MRP4 visszapumpálják a baikalint a véráramba. Feltételezhető, hogy a biliáris exkrécióval a véráramba abszorbeált baikalin visszajut a gasztrointesztinális traktusba.

A baikalin efflux, illetve uptake folyamatainak ismerete kulcsfontosságú a baikalin terápiás alkalmazásához. Fontos megemlíteni, hogy a baikalint gyakran alkalmazzák egyéb gyógyszerekkel együtt is, amely esetekben a transzportereknél kölcsönhatás léphet fel a flavonoid és a gyógyszermolekula között, modulálva ez utóbbi ADME (abszorpció, disztribúció, metabolizmus és exkréció) tulajdonságait. Ezeket a hatásokat fontos figyelembe venni a gyógyszeres kezelés megtervezésénél.

Publikációk

1. **Kalapos-Kovács Bernadett**, Magda Balázs, Jani Márton, Fekete Zsolt, Szabó Pál, Antal István, Krajcsi Péter, Klebovich Imre. (2015) Multiple ABC Transporters Efflux Baicalin. *Phytother Res*, 12: 1987-1990.
2. Magda Balázs, Márta Zoltán, Imre Tímea, **Kalapos-Kovács Bernadett**, Klebovich Imre, Fekete Jenő, Szabó Pál.(2015) Unexpected retention behavior of baicalin: Hydrophilic interaction like properties of a reversed-phase column. *J Pharm Biomed Anal*, 111: 119-125
3. Laki Szilvia, **Kalapos-Kovács Bernadett**, Antal István, Klebovich Imre. (2013) Importance of drug interactions with smoking in modern drug research. *Acta Pharm Hun*, 4: 107-120.
4. Zhang Li, Lin Ge, **Kovács Bernadett**, Jani Márton, Krajcsi Péter, Zuo Zhong. (2007) Mechanistic study on the intestinal absorption and disposition of baicalein. *Eur J Pharm Sci*, 3-4: 221-231.