

Biszfenolok metabolizmusának *in silico* és *in vitro* vizsgálata

Szakmai beszámoló rövid tanulmányútról

Készítette:

Miczán Vivien

Pázmány Péter Katolikus Egyetem Információs Technológiai Kar
molekuláris bionika BSc

Témavezető:

Dr. Lucija Peterlin-Mašič

A tanulmányút helyszíne:

University of Ljubljana Faculty of Pharmacy

Molekuláris bionika alapszakos szakdolgozatom keretén belül gyógyszervegyületek metabolizmusának számítógépes előrejelzésével foglalkoztam. [1] A tanulmányút során pedig lehetőségem nyílt egy az iparban jelentős vegyületcsoport, a biszfenolok metabolizmusának *in silico* és *in vitro* tanulmányozására.

Ismert, hogy egy gyógyszer terápiás hatását és értékét a hatóanyag ún. ADME tulajdonságai (abszorpciója, disztribúciója, metabolizmusa és exkréciója) döntően befolyásolják, hasonlóan van ez a szervezetbe kerülő egyéb idegen anyagokkal, ezek esetleges toxikus hatását is befolyásolják az ADME tulajdonságaik.

Jelen vizsgálatunk ezen tulajdonságok közül a metabolizmus becslésével foglalkozott, azon belül is a citokróm P450 enzimcsalád néhány tagjával végbemenő reakciók regioszelektivitási vonatkozásaival.

A metabolizmus a szervezetbe került xenobiotikumok biokémiai módosítását, lebontását foglalja magában, amelynek elsődleges helyei a máj, a gyomor-bél rendszer, a tüdő, a bőr és a nyálkahártya; de ezen kívül a vese, az agy, a hasnyálmirigy, a lép, a mellékvese, a here, a petefészek illetve a méhlepény szintén tartalmaznak lebontó enzimeket.

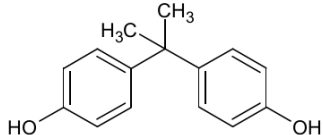
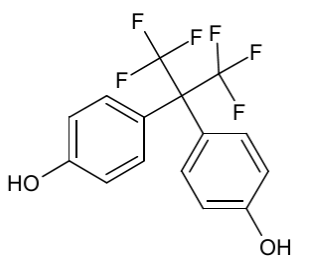
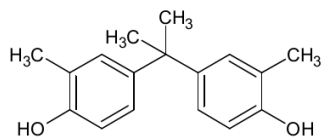
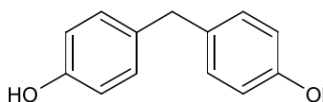
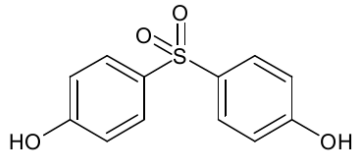
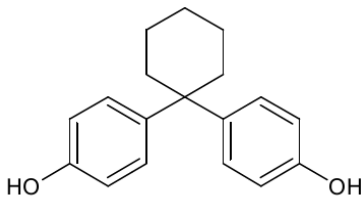
A metabolizmusban az egyik legnagyobb szerepet játszó enzimrendszer a citokróm P450 enzimcsalád, amely több mint 200 membránhoz kötött hemoproteint foglal magába, melyeket homológia alapján különítettek el különböző alosztályokba.

A mi vizsgálatunk, hasonlóan a gyógyszeripari gyakorlathoz, annak a néhány altípusnak a tanulmányozására összpontosított, melyek a jelenleg ismert xenobiotikumok biotranszformációjában a legjelentősebb szerepet játsszák. Így a számítógépes vizsgálatokhoz a három leggyakrabban előforduló izoenzimet, a CYP2C9-es, 2D6-os és 3A4-s változatokat választottuk, míg az *in vitro* vizsgálatokat a CYP1A2-es, 2C8-as, 2C9-es, 2C19-es, 2E1-es és 3A4-es változatokon végeztük el.

Az *in silico* vizsgálatok iránti igény egyre inkább nő, a számítási kapacitás és a szükséges algoritmusk fejlődésével párhuzamosan, hiszen főleg a kutatások kezdeti fázisában jó kiindulási pontot jelenthetnek. Különös öröm számomra, hogy a tanulmányút keretében lehetőségem nyílt *in vitro* vizsgálatok végzésére is, hiszen ezek első kézből származó információt szolgáltatnak az adott számítógépes módszerek hatékonyságára vonatkozólag.

A vizsgált vegyületcsalád a biszfenolok voltak, ezek közül is hat gyakran előforduló változat, a biszfenol-A, biszfenol-AF, biszfenol-C, biszfenol-F, biszfenol-Z és a biszfenol-S. Ezek szerkezetei megtalálhatóak az 1. táblázatban.

1. táblázat A vizsgált biszfenolok neve és szerkezeti képletei

Rövid név	IUPAC név	Szerkezet
BPA	4,4'-(propane-2,2-diyl)diphenol	
BPAF	4-[1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-(4-hydroxyphenyl)propan-2-yl]phenol	
BPC	4,4'-propane-2,2-diylbis(2-methylphenol)	
BPF	2-[(2-hydroxyphenyl)methyl]phenol	
BPS	4,4'-Sulfonyldiphenol	
BPZ	4,4'-cyclohexane-1,1-diyl diphenol	

Ezek a molekulák főleg polikarbonát műanyagok illetve epoxigyanták alapanyagaiként jelennek meg, így pl. edények, konzervdobozok, használati tárgyak, vízvezetékcsövek, egyes fogtömések tartalmazzák ezeket. A biszfenol-A különösen nagy mennyiségben gyártott alapanyag, így az emberi szervezetre gyakorolt hatásának vizsgálata esszenciális. Különböző vizsgálatok különbözőképpen vélekednek a toxikus hatását illetően, de felmerült a neve a

hormonháztartást befolyásoló tényzőként, kapcsolatba hozták az elhízással, a cukbetegséggel illetve különböző rákfajták kialakulásával is. Fontos tehát a szervezetben végbemenő útjának, ezek belül metabolizmusának a vizsgálata.

Ehhez a tanulmányutam során kétféle megközelítést alkalmaztunk.

I. *In silico* vizsgálatok

A vegyületek szerkezeteinek berajzolása után optimalizáltam azokat a Schrödinger Maestro programjának LigPrep modulja segítségével OPLS2005 erőteret használva. Ezután a három dimenziós optimalizált szerkezetből kiindulva a Maestro új, Site of Metabolism modulja segítségével tettem előrejelzéseket a metabolizmus valószínűsíthető helyére vonatkozóan. [2]

A flexibilis, könnyen megközelíthető kötőhellyel rendelkező CYP3A4 változat esetében egyszerű a Hammett és Taft egyenleteken (1. egyenlet) alapuló ligandum alapú reaktivitás modellt alkalmaz, míg a merevebb szerkezetű 2C9 és 2D6 formák esetében dokkolásos számításokat is végez a program.

1. egyenlet Taft-egyenlet: egy adott atomra vonatkozó reaktivitás érték az alap reaktivitás arány és a konnektivitás alapján meghatározott perturbációk összege. Azt írja le, hogyan befolyásolják a reakció rátákat a téri, induktív és rezonancia effektusok valamint a szubsztituens sztérikus hatása. [3, 4]

$$\log \left(\frac{k_s}{k_{\text{CH}_3}} \right) = \rho^* \sigma^* + \delta E_s$$

$\log(k_s/k_{\text{CH}_3})$: a szubsztitúciós reakció rátája a referencia reakcióhoz képest

Empirikus konstansok:

σ^* : poláris szubsztituens konstans, ami a téri és induktív effektusokat írja le

E_s : sztérikus szubsztituens konstans

ρ^* : a reakció poláris hatásokra való érzékenységet jellemzi

δ : a reakció sztérikus hatásokra való érzékenységet jellemzi

Az indukált illesztésű dokkolás (IFD) magában foglalja több kezdő konformáció generálását, van der Waals alapú kölcsönhatások számolását és a legflexibilisebb oldalláncok alanin mutációját (az oldalláncok flexibilitásának megváltoztatását). Ezután kiválasztásra kerülnek azon oldalláncok, melyeknek közelében 5Å távolságon belül található a szubsztrát valamelyik atomja, majd a szerkezet minimalizálása után a szubsztrátot visszadokkoljuk az alacsony energiájú konformációkba. Ezt követően a hem vas 5Å sugarú környezetében tartózkodó atomok számítanak a legvalószínűbb metabolizmus célpontnak.

A program kimenetei a következő adatok [2]:

- **Intrinsic reaktivitás:** a Hammett—Taft módszerrel számolt érték számszerűsítése. Pozitív értékek nagyobb reaktivitást jelentenek.
- **Vas-hozzáférhetőség:** a dokkolásból számolja a program, azon helyzetek számának természetes logaritmusát, amelynél az adott atom 5 Å távolságon belül van a Fe^{3+} ion környezetében. Nagyobb értékek jobb hozzáférhetőséget jelentenek.
- **Összesített SOM érték:** a vashoz való hozzáférhetőség és az intrinsic reaktivitás lineáris kombinációja. Az eredményeket zöld körökként jeleníti meg, melyek nagysága arányos a becsült reaktivitással.

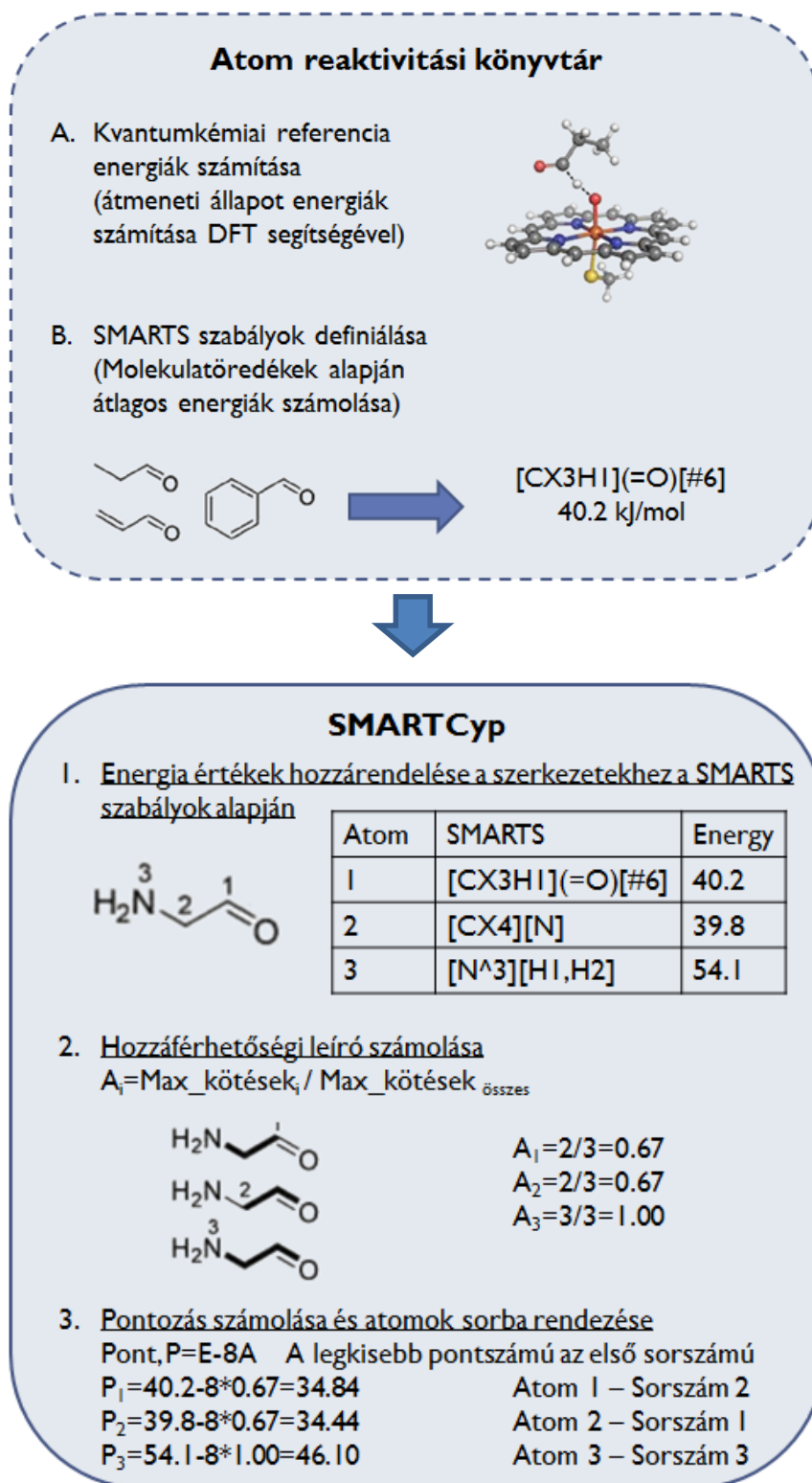
A lehetséges metabolizmus helyek jóslására egy másik módszert is felhasználtam, a SmartCyp szoftvert. Ez egy Java alapú, nyílt forráskódú program illetve online szerver. Bár voltak kezdeményezések korábban is a metabolizmus helyének a szubsztrát szemiempirikus számítások alapján nyert leíróinak felhasználásával való becslésére, de ez az első, amely egyesíti magában a kvantumkémiai leírás pontosságát és a rövid futási időt.

Ligandum töredékek előre kiszámított kvantumkémiai leíróinak (DFT aktivációs energiák) alapján összeállított szabályadatbázisban keresi meg a betáplált szubsztrát szerkezeti elemeit, és ez alapján ad egy pontszámot minden egyes atomra annak függvényében, hogy mennyire találja valószínűnek az ott történő metabolizálódást.

A DFT (sűrűségfüggvény-elméleti) leírókat egy az adott atom hozzáférhetőségére vonatkozó leíróval is kiegészíti, ez a molekula központjától való kötésekben számolt távolsággal arányos (1. ábra).

Mivel a futási időben csak a keresés történik meg, a kvantumkémiai leírók pedig előre tároltak, ezért nagyon gyors módszer. Egy általános (1A2, 2A6, 2B6, 2C8, 2C19, 2E1 és 3A4 változatokra alkalmazható) és két specifikus (2C9 ill. 2D6) modellt tartalmaz. [5-7]

A program kimenetként egy általános és a két specifikus modell által becsült értékeket adja atomonként táblázatban illetve ábra formájában.



1. ábra A SMARTCyp program működésének vázlatja. A felső szaggatott téglalaphban az előre elkészített könyvtár, az alsó téglalaphban az aktuális működés látható [8]

A vizsgálatainkat kiegészítettük a Schrödinger Maestro QikProp moduljával végzett egyszerű metabolizmus predikcióval is. [9]

Ez a modul az ADME tulajdonságok előrejelzésére képes (abszorpció, disztribúció, metabolizmus, exkrécio), ezen kívül az általa számolt tulajdonságok QSAR modelleknek, hasonlósági problémák megoldásának szolgálhatnak alapul.

A QikPropot úgy fejlesztették ki, hogy különböző szimulációkat hajtottak végre különböző oldószerekben és erőterekben, majd ezeket összehasonlították a kísérleti adatokkal. Így a QikProp pl. töltések, felszín és térfogat paraméterek hasonlósága alapján határozza meg az általa jósolt adatokat, méghozzá figyelemre méltó pontossággal.

Mi a több mint ötven számolt tulajdonság közül csak az egyetlen közvetlenül metabolizmusra vonatkozót vettük figyelembe, mégpedig azt, amelyik a molekula konnektivitási viszonyaiból előrejelzéseket tesz arra vonatkozólag, hogy milyen típusú metabolitok fognak keletkezni.

Ez persze egyáltalán nem CYP-specifikus, ezért kritikusan kell kezelni.

2. táblázat A QikProp előrejelzései a metabolikus reakciókra vonatkozóan

Molekula	metabolitok várható száma	Várható metabolikus reakciók
BPA	2	aromatic OH oxidation, aromatic OH oxidation
BPAF	2	aromatic OH oxidation, aromatic OH oxidation
BPC	4	aromatic OH oxidation, aromatic OH oxidation, benzylic-like H -> alcohol, benzylic-like H -> alcohol
BPF	3	aromatic OH oxidation, benzylic-like H -> alcohol, aromatic OH oxidation
BPS	2	aromatic OH oxidation, aromatic OH oxidation
BPZ	2	aromatic OH oxidation, aromatic OH oxidation

II. *In vitro* vizsgálatok

A tanulmányút másik célja a biszfenolok metabolizmusának vizsgálata volt *in vitro* módszerek segítségével. Ennek során a fent említett biszfenolokat előbb emberi májból származó mikroszómákkal inkubáltuk, hiszen ebben megtalálható a metabolizmus első fázisának legtöbb enzime, illetve kisebb mértékben a II. fázis aktivitása is megfigyelhető, így általános képet kaphattunk a lebontásukról. Ezután specifikus rekombináns citokróm p450 enzimváltozatokkal is elvégeztük a kísérletet, hogy finomítsuk a képet, ezek a CYP1A2-es, 2C8-as, 2C9-es, 2C19-es, 2E1-es és 3A4-es izoenzimek voltak. Az aktív metabolitok megkötéséhez glutationt használtunk fel.

A minták megfelelő előkészítése után kombinált folyadékkromatográfiás – tömegspektroszkópiás vizsgálatokat végeztünk a keletkezett metabolitok szerkezetének meghatározására.

Magukat az eredményeket nem közlöm, hiszen a kutatócsoport még nem publikálta őket.

Összefoglalás

Összességében a rövid tanulmányút nagyon hasznos tapasztalatokat nyújtott, hiszen kiterjeszthettem a szakdolgozatommal kapcsolatos kutatásomat más típusú vegyületekre, illetve megismerkedhettem az ehhez a területhez tartozó in vitro módszerekkel. Témavezetőm és munkatársai sokat segítettek a szükséges ismeretek elsajátításában, és jó kapcsolatot sikerült kiépíteni velük, nagyon hálás vagyok mind nekik mind a lehetőségért, hogy kiutazhattam.

Felhasznált irodalom

- [1] V. Miczán, "In silico módszerek gyógyszermetabolizmus vizsgálatára," molekuláris bionika BSc, Információs Technológiai Kar, Pázmány Péter Katolikus Egyetem, 2012.
- [2] "CYP 450 Site of Metabolism," ed. New York, NY.: Schrödinger, LLC, 2012.
- [3] E. Anslyn and D. A. Dougherty, *Modern Physical Organic Chemistry*: University Science Books, 2006.
- [4] R. W. Taft, *J Am Chem Soc*, vol. 75, p. 4538, 1953.
- [5] P. Rydberg, D. E. Gloriam, and L. Olsen, "The SMARTCyp cytochrome P450 metabolism prediction server," *Bioinformatics*, vol. 26, pp. 2988-9, Dec 1 2010.
- [6] P. Rydberg and L. Olsen, "Ligand-based site of metabolism prediction for cytochrome P450 2D6," *ACS Med Chem Lett*, vol. 3, pp. 69-73, 2012.
- [7] J. Kirchmair, M. J. Williamson, J. D. Tyzack, L. Tan, P. J. Bond, A. Bender, *et al.*, "Computational prediction of metabolism: sites, products, SAR, P450 enzyme dynamics, and mechanisms," *J Chem Inf Model*, vol. 52, pp. 617-48, Mar 26 2012.
- [8] P. Rydberg, D. Gloriam, and L. Olsen. (2012). *About SMARTCyp*. Available: <http://www.farma.ku.dk/smartcyp/about.php>
- [9] "QikProp," version 3.5 ed. New York, N.Y.: Schrödinger, LLC., 2012.