Thesis Title Cellular and Molecular Mechanisms of Quercetin and Its Glycoside Derivatives: the Inhibition of P-glycoprotein- and MRP1-mediated Efflux of Pirarubicin

Author Mr. Winit Choiprasert

Degree Doctor of Philosophy (Biomedical Science)

Thesis Advisory Committee

Assoc.Prof. Dr. Samlee Mankhetkorn	Chairperson
Asst. Prof. Dr. Wilart Pompimon	Member
Asst. Prof. Dr. Suchart Kothan	Member
Dr. Nathupakorn Dechsupa	Member

ABSTRACT

Quercetin and its glycoside derivatives are potential anticancer and anti-carcinogenesis, can be considered as therapeutic agents. This thesis aimed to study (1) the interaction of quercetin derivatives with bovine serum albumin and (2) the mechanism of interaction with P-glycoprotein and MRP1 protein in living multidrug resistant cells. Quercetin derivatives has high affinity to BSA. The macroscopic binding constant (K_D) values reflex the stability of complexes was in the order of rutin > quercetrin > quercetin. In cytotoxic assay conditions, BSA is a suitable carrier of quercetin (K_D = 1.68 x 10^5 M^{-2}) which spontaneously release the molecule into solutions and cells. The quercetin similarly inhibited proliferation of drug-sensitive and drug resistant cells. IC_{50} was equal to 23.0 ± 3.0 μM for K562 and K562/adr and 18.0 ± 8.5 μM for GLC4 and GLC4/adr cells. The substitution of rhamnoside and rutinoside at C3 caused an increase in stability of complexes (K_D = 1.37 x 10^5 M^{-2} for rhamnoside and K_D = 5.0 x 10^4 M^{-2} for rutinoside) and enhanced the anticancer activity by 2 and 7 fold higher than those of quercetin. Contrary these substitutions caused lowering their anticancer efficiency in MDR cells; for rhamnoside substitution RF was equal to 2 and 5 for K562/adr and GLC4/adr cell; for rutinoside substitution RF was equal to 12 and 15 for K562/adr and GLC4/adr cell, respectively. Of relevance to their use as anticancer agents alone or in combination with other agents,

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

this study analyzed the interaction of the compounds with the MDR transporters including P-glycoprotein and MRP1 protein in living multidrug resistant cells. The potential MDR reversing action of the compounds was assessed by using the co-treatment of anticancer drug, pirarubicin or daunorubicin and quercetin, quercetrin or rutin compared with the series of co-treatment of pirarubicin or daunorubicin and the known inhibitor such as cyclosporine A and verapamil. The evidence of direct interaction of molecules with MDR protein was investigated by measuring the ability of inhibition of the rate of P-glycoprotein- and MRP1-mediated efflux of pirarubicin out of cells. Quercetin and its glycoside derivatives efficiently resensitized the MDR cells to pirarubicin but not for daunorubicin. Our results clearly show that quercetin, quercetrin except rutin non-competitively inhibited the function of P-glycoprotein in K562/adr and MRP1 in GLC4/adr cells. The determined KI value of P-glycoprotein was equal to 0.33 μM for quercetin and 1 μM for quercetrin and KI value of MRP1 was equal to 0.45 μM for quercetin and 0.5 μM for quercetrin.

The overall results demonstrated that quercetin, quercetrin and rutin should be considered as both anticancer and MDR inhibitors. Rutin was tightly bound to BSA resulting in the changes in mode of action; probably mediated its cytotoxic via an interaction with the extrinsic pathway, activated by pro-apoptotic receptor signals at the cellular surface.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ กระบวนการออกฤทธิ์ระดับเซลล์และโมเลกุลของควอซิตินและสารอนุพันธ์ที่มีน้ำตาลมาต่อ: การยับยั้งการขับยาพีรารูบิซีนของพี-ไกลโคโปรตีนและเอ็มอาร์พีวัน

ผู้เขียน นายวินิจ ช้อยประเสริฐ

ปริญญา วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (วิทยาศาสตร์ชีวการแพทย์)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รศ . ดร.สำรี มั่นเขตต์กรน์ ประธานกรรมการ

ผศ. ดร.วิลาศ พุ่มพิมล กรรมการ

ผศ . ดร.สุชาติ โกทันย์ กรรมการ

ดร .ณจุปกรน์ เดชสุภา กรรมการ

บทคัดย่อ

ควอซิตินและสารอนุพันธ์ที่มีน้ำตาลมาต่อ มีศักยภาพเป็นสารต้านและยับยั้งการเกิดมะเร็งที่สามารถพิจารณาเป็นยาเพื่อการรักษาโรคได้ วิทยานิพนธ์นี้มีเป้าหมายเพื่อศึกษา (1) อันตรกิริยาสารอนุพันธ์ที่มีน้ำตาลมาต่อของควอซิติน กับโบวายซีรัมอัลบูมิน และ (2) กลไกการเกิดอันตรกิริยากับ พีไกลโคโปรตีน และ เอ็มอาร์พี วัน ในเซลล์มีชีวิตชนิดดื้อต่อยาแบบหลายขนาน อนุพันธ์ของ ควอซิติน มีค่าสัมภักคภาพสูงกับโบไวซีรัมอัลบูมิน โดยแสดงได้จากค่าคงที่(แมคโครสโคปิค,K_D) ของการจับกันที่สะท้อนให้เห็นถึงความคงตัวของสารประกอบมีค่าเรียงตามลำดับกัน คือ รูติน > ควอซิตริน > ควอซิติน ในระบบการทดสอบการเป็นพิษต่อเซลล์นั้นบีแอสเอทำหน้าที่เป็นตัวขนส่งควอซิติ (K_D= 1.68 x10^5 M^{-2}) ได้อย่างเหมาะสม แล้วปลดปล่อยโมเลกุลนี้ออกมาอย่างต่อเนื่องลงในสารละลายและในเซลล์ ควอซิตินมีการยับยั้งการแบ่งตัวในเซลล์ที่ไวต่อยาและเซลล์ดื้อยาได้ใกล้เคียงกันโดยให้ค่า IC_{50} ในเซลล์ K562 และในเซลล์ K562/adr เท่ากันคือ 23.0 ± 3.0 μM สำหรับเซลล์ GLC4 และ GLC4/adr มีค่าเท่ากันคือ18.0 ± 8.5 μM น้ำตาลแรมโนไซด์และรูติโนไซด์ที่จับอยู่ณ.ตำแหน่งC3 เป็นสาเหตุให้สารประกอบเชิงซ้อนมีค่าคงตัว (น้ำตาลแรมโนไซด์มี K_D = 1.37 x 10^5 M^{-2} และน้ำตาลรูติโนไซด์มี K_D = 5.0 x 10^4 M^{-2}) และมีประสิทธิภาพในการกระต้านมะเร็งสูงขึ้นกว่า ควอซิตินถึง 2 เท่าและ 7 เท่า ตามลำดับ ในทางกลับกันน้ำตาลที่ตำแหน่งนี้มีผลทำให้ ประสิทธิภาพของโมเลกุลในการต้านเซลล์มะเร็งที่ดื้อยาแบบหลายขนานได้ต่ำลงสำหรับแรมโนไซด์มีค่า RF เท่ากับ 2 เท่าและ 5 เท่าในเซล K562/adr และ GLC4/adr ตามลำดับ สำหรับน้ำตาลรูติโนไซด์ RF มีค่าเท่ากับ 12 เท่าและ 15 เท่าในเซล

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

K562/adr และ GLC4/adr ตามลำดับ เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้โมเลกุลเป็นยาต้านมะเร็งเชิงเดียว และการใช้ร่วมกับยาชนิดอื่นๆนั้น ในการศึกษาครั้งนี้ได้วิเคราะห์อันตรกิริยาของสารประกอบกับตัวขนส่งชนิดดื้อยาแบบหลายขนานได้แก่ พีไกลโคโปรตีนและเอ็มอาร์พีวัน การยับยั้งการดื้อยาแบบหลายขนานของสารประกอบนี้ ได้ถูกประเมินโดยการใช้ยาต้านมะเร็งพีรารูบีซีนหรือโดนอร์รูบิซีน ร่วมรักษากับควอซิติน ควอซิตริน หรือ รูติน แล้วเปรียบเทียบชุดการร่วมรักษานี้กับตัวยับยั้งมาตรฐาน เช่น ไซโคลสปอริ เอ และ เวราพามิล สิ่งที่ปรากฏให้เห็นโดยตรงจากอันตรกิริยานี้คือความสามารถการยับยั้งอัตราการขับยาพีรารูบิซินออกนอกเซลล์ของไกลโคโปรตีนและเอ็มดีอาร์ โดย ควอซิติน และ อนุพันธ์ไกลโคไซด์ มีความไวต่อปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างเซลล์ดื้อยากับ พีรารูบิซิน ได้ดีกว่า แต่ไม่เกิดกับโดนอร์รูบิซิน ผลการศึกษายังพบอีกว่านอกจากรูตินแล้ว ควอซิตินและควอซิตรินมีการยับยั้งพีไกลโคโปรตีนในเซลล์ K562/adr และเอ็มอาร์พีวันในเซลล์ GLC4/adr ได้ดี และหาค่า K_I ของพีไกลโคโปรตีนเท่ากับ 0.33 ไมโครโมลาร์ สำหรับควอซิติน และเท่ากับ 1ไมโครโมลาร์สำหรับควอซิตริน ค่า K_I ของเอ็มอาร์พีวันเท่ากับ0.45ไมโครโมลาร์สำหรับควอซิตินและ0.5ไมโครโมลาร์สำหรับควอซิตริน ผลทั้งหมดนี้แสดงให้เห็นว่า ควอซิติน ควอซิตรินและรูตินควรได้รับการพิจารณามาใช้เป็นยาต้านมะเร็ง และยายับยั้งการดื้อยาแบบหลายขนานได้ ส่วนรูตินมีการจับกันกับบีแอสเอค่อนข้างแน่นหนา ทำให้รูปแบบการเกิดปฏิกิริยามีการเปลี่ยนแปลงไป คือ อาจแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์จากอันตรกิริยาของขบวนการอื่น ในเซลล์ K562/adr และ GLC4/adr cell ตามลำดับ โดยอาจจะไปกระตุ้นโปรตีนรับสัญญาณบางตัวที่สื่อให้มีการตายแบบอะป็อปโตซิท(Pro-apoptosis receptor)บนผนังเซลขึ้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved