

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Kandidát: Mgr. Tomáš Smutný

Školitel: prof. PharmDr. Petr Pávek, Ph.D.

Název dizertační práce: Nové přístupy ve vývoji *in vitro* jaterních buněčných modelů

Játra jsou hlavním metabolickým orgánem v lidském těle. Odhad jaterního metabolismu je tak důležitým krokem při vývoji léčiv. Neméně důležité je také vyhodnocení rizika jaterního poškození navozeného potencionálními léčivy. Některé parametry spojené s metabolismem a toxicitou vyvíjených léčiv mohou být predikovány pomocí *in vitro* jaterních buněčných modelů. Dnes jsou za jejich zlatý standard považovány primární lidské hepatocyty. Vedle nich se uplatňují další jaterní modelové systémy, jako jsou jaterní tkáňové řezy, subcelulární frakce, jaterní nádorové buněčné linie a hepatocyty odvozené od kmenových buněk. Soudobé *in vitro* modely mají stále řadu nevýhod, a to i navzdory pokrokům v jejich vývoji. Ty směřují k lepšímu odhadu farmakokinetických a toxikologických parametrů testovaných kandidátních léčiv. Jednou z nevýhod jaterních modelů je jejich nedostatečná podobnost s *in vivo* fenotypem spojená s nízkou metabolickou kapacitou. V posledních několika letech jsme byli svědky ohromujícího postupu nových technologií zaměřujících se na zlepšení stávajících jaterních buněčných modelů (například zavedení 3D modelů, kultivace buněk několika typů v jednom systému nebo využití perfúzních kultur).

Cíle této dizertační práce můžeme rozdělit do tří částí. Nejdříve jsme se pokusili zesílit metabolickou kapacitu *in vitro* jaterních buněčných modelů za použití malých molekul, které jsou aktivátory důležitých jaderných receptorů zapojených v regulaci enzymů metabolizujících léčiva (drug-metabolizing enzymes (DMEs)). Převážně jsme využili jaterní nádorové buněčné linie, protože mají rychlý a neomezený růst, dobrou dostupnost a snadno se s nimi pracuje. Na druhé straně postrádají mnoho DMEs. Posledně jmenovaná skutečnost nás vedla k tomu, abychom se také zabývali vlivem posttranskripčních a posttranslačních modifikací klíčových regulátorů DMEs. Tyto modifikace by mohly vnést více světla do fenoménu nízké exprese DMEs v buněčných jaterních liniích. Nakonec jsme se zaměřili na využití *in vitro* jaterních modelů (včetně

hepatocytů dovozených od kmenových buněk) pro hodnocení hepatotoxicity nově vyvíjených kandidátních léčiv a suspektních hepatotoxinů odvozených od léčivých rostlin.

V naší první studii jsme identifikovali inhibitory MEK1/2 jako silné aktivátory genů podrodiny CYP3A v běžně používané hepatocelulární nádorové buněčné linii HepG2. Tyto výsledky jsou důležité, neboť izoforma CYP3A4, která metabolizuje více než 30 % všech klinicky používaných léčiv, je omezeně exprimována v této buněčné linii a dalších jaterních buněčných modelech. V této práci jsme se navíc pokusili dešifrovat mechanismus stojící za tímto fenoménem.

V druhé práci jsme identifikovali několik nových látek fungujících jako ligandy významných xenosenzorů (např. jaderných receptorů PXR a CAR a transkripčního faktoru AhR). Xenosenzory jsou zapojené do genové regulace DMEs. Můžeme proto předpokládat, že tyto malé molekuly mohou být využity k zesílení exprese významných genů DMEs v jaterních *in vitro* modelech.

V další práci jsme se zaměřili na *in silico* predikci microRNAs (miRNAs), které mají potenciál ovlivnit expresi jaderných receptorů zapojených do regulace CYP3A4. Předpokládá se, že účinek miRNAs na regulaci jaderných receptorů by se mohl podílet na interindividuální variabilitě v expresi CYP3A4. Můžeme vyslovit hypotézu, že námi predikované miRNAs by mohly mít dopad na expresi DMEs v jaterních *in vitro* buněčných modelech.

Lepší znalosti o regulační síti kontrolující funkce PXR a dalších jaderných receptorů mohou vést k modifikacím *in vitro* jaterních modelů a umožnit optimalizaci jejich vlastností blíže směrem k *in vivo* fenotypu.

V naší další studii jsme se pokusili odhadnout toxicitu nově připravených látek s potenciální antituberkulotickou aktivitou. Pro tento účel jsme použili primární lidské hepatocyty a čtyři odlišné savčí buněčné linie zahrnující jaterní linie HuH-7 a HepG2. Mitochondriální aktivitu (měřenou pomocí MTS testu) jsme zvolili jako znak buněčné viability. Ze studie vyplývá, že námi testované molekuly vykazovaly až na několik výjimek nízkou buněčnou toxicitu.

V současné době vyhodnocujeme uplatnění indukovaných hepatocytům podobných buněk (induced hepatocyte-like cells (iHep cells)) pro toxikologický

screening (připravovaná publikace). Pro validaci modelu jsme v této analýze použili několik hepatotoxických fytochemikálií s rozdílným mechanismem toxicity. Dále jsme porovnali iHep buňky s HepG2 buňkami a primárními hepatocyty. Věříme, že naše připravovaná studie může přinést informace o pozici komerčně dostupných iHep buněk v toxikologických aplikacích.

Náš výzkum přinesl některé nové malé molekuly použitelné pro úpravu metabolické kapacity současných *in vitro* jaterních modelů. Dále jsme popsali některé aspekty post-transkripční a post-translační modifikace stojící za regulací enzymů metabolizujících léčiva. V neposlední řadě jsme využili *in vitro* buněčných modelů pro odhad hepatotoxicity nově syntetizovaných kandidátních léčiv s potenciální antituberkulotickou aktivitou a suspektních hepatotoxinů odvozených z léčivých rostlin.