

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie



**EXPERIMENTÁLNÍ PŘÍSTUPY PRO STUDIUM
JATERNÍ ENZYMATICKÉ INDUKCE
ZPROSTŘEDKOVANÉ
PREGNANOVÝM X RECEPTOREM**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Tomáš Smutný, Ph.D.

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

Hradec Králové 2021

Kryštof Dobečka

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Tato práce nebyla použita k získání jiného či stejného titulu.

V Hradci Králové dne 12. 5. 2021

Kryštof Dobečka

Na tomto místě bych rád poděkoval PharmDr. Tomáši Smutnému, Ph.D., za cenné rady a připomínky, které mi poskytl během konzultací a kterými mě nasměroval k dosažení obsahové i formální správnosti předkládané práce. Poděkování patří též prof. PharmDr. Petru Pávkovi, Ph.D., za námět tematického zaměření této práce a za poskytnutí příležitosti prakticky se seznámit s některými z diskutovaných experimentálních metod.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Student: Kryštof Dobečka

Školitel: PharmDr. Tomáš Smutný, Ph.D.

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

Název diplomové práce: Experimentální přístupy pro studium jaterní enzymatické indukce zprostředkované pregnanovým X receptorem

Práce se zabývá indukcí exprese biotransformačních enzymů prostřednictvím aktivace pregnanového X receptoru (PXR) v játrech, a to především z hlediska modelů a metod, které jsou při studiu enzymové indukce experimentálně využívány. V předkládaném textu jsou shrnuty znalosti o PXR, který je představen nejen jako zásadní xenosenzor, ale také jako transkripční faktor s důležitým významem pro endogenní pochody. Dále jsou v práci diskutovány buněčné a zvířecí modely, které jsou hodnoceny z hlediska exprese a funkce PXR a jeho cílových biotransformačních enzymů. Primární lidské hepatocyty ve 2D uspořádání jsou zlatým standardem jaterních *in vitro* modelů. V budoucnu můžeme očekávat širší využití 3D technologií. Zvířecí modely vykazují zásadní mezidruhové rozdíly v aktivaci PXR. Vývoj humanizovaných zvířat pomáhá překonávat tyto nevýhody. Jsou také představeny screeningové metody popisující interakci kandidátních léčiv s PXR. Dále je popsána polymerázová řetězová reakce (PCR) a její modifikace pro stanovení indukce biotransformačních enzymů. Rešeršní práce přináší přehled experimentálních modelů a shrnutí aktuálních metodických trendů v oblasti studia PXR.

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology & Toxicology

Student: Kryštof Dobečka

Supervisor: PharmDr. Tomáš Smutný, Ph.D.

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

Title of diploma thesis: Experimental approaches for studying hepatic enzyme induction mediated by pregnane X receptor

The thesis focuses on hepatic pregnane X receptor (PXR)-mediated induction of biotransformation enzymes. Emphasis is placed on experimental models and methods which are used for the assessment of enzyme induction. In addition to summarizing its well-established role as a xenobiotic-sensing receptor, PXR is also presented as a transcription factor with an important role in endogenous pathways. Furthermore, cell and animal models are evaluated in terms of expression and function of PXR and its target xenobiotic-metabolising enzymes. Primary human hepatocytes in 2D cultures are considered to be the gold standard of *in vitro* hepatic models. However, 3D technologies are expected to be increasingly used in the future. The use of animal models is limited due to pronounced interspecies differences in PXR activation. Thus, humanized models have been established to overcome these limitations. Next, this thesis comments screening methods for an assessment of interaction between PXR and candidate drugs. Moreover, the polymerase chain reaction (PCR) and its modifications are described as methods which allow to quantify the induction of biotransformation enzymes. Altogether, this thesis brings an overview of experimental models and current methodical trends in the field of PXR studies.

OBSAH

1 SEZNAM ZKRATEK.....	1
2 ÚVOD A CÍL.....	5
3 TEORETICKÁ ČÁST.....	8
3.1 Pregnanový X receptor.....	8
3.1.1 Základní charakteristika PXR.....	8
3.1.2 Mechanismus indukce exprese genů regulovaných PXR.....	10
3.1.3 Metabolismus léčiv.....	12
3.1.4 Biotransformační enzymy a transportéry podléhající regulaci PXR.....	14
3.1.5 Klinické důsledky indukce exprese biotransformačních enzymů pomocí PXR.....	15
3.1.6 Další funkce PXR.....	17
3.2 Jaterní buněčné modely pro studium enzymové indukce.....	20
3.2.1 Lidské primární hepatocyty.....	20
3.2.2 Buněčné linie odvozené od nádorové tkáně.....	24
3.2.3 Další typy buněk pro studium enzymové indukce.....	28
3.2.4 <i>In vitro-in vivo</i> extrapolace.....	30
3.3 Zvířecí modely.....	34
3.3.1 Myši humanizované metodami genetického inženýrství.....	35
3.3.2 Myši humanizované transplantací lidských hepatocytů.....	37
3.4 Metody pro studium enzymové indukce zprostředkované PXR.....	43
3.5 Polymerázová řetězová reakce.....	48
3.5.1 Princip polymerázové řetězové reakce.....	48
3.5.2 Kvantitativní polymerázová řetězová reakce.....	50
3.5.3 Kvantitativní reverzně transkriptázová polymerázová řetězová reakce.....	53
3.5.4 Digitální polymerázová řetězová reakce.....	56
3.5.5 Droplet digital PCR.....	59

4 DISKUSE.....	62
5 ZÁVĚR.....	67
6 LITERATURA.....	68

1 SEZNAM ZKRATEK

ABC	ATP-binding cassette
<i>ACTB</i>	gen pro β -aktin
ADME	absorpce, distribuce, metabolismus, exkrece
AhR	receptor pro aromatické uhlovodíky (aryl hydrocarbon receptor)
AMV	virus ptačí myeloblastózy (avian myeloblastosis virus)
AOP	adverse outcome pathway
BCRP	protein rezistence karcinomu prsu (breast cancer resistance protein)
CAR	konstitutivní androstanový receptor (constitutive androstane receptor)
CDK	cyklin-dependentní kináza
cdPCR	chamber-based digital polymerase chain reaction
CNV	variace počtu kopií (copy number variations)
CPT1	karnitinpalmitoyltransferáza 1
CRISPR	clustered regularly interspaced short palindromic repeats
<i>CYCI</i>	gen pro cytochrom c1
CYP	systém cytochromu P450 a jeho jednotlivé izoformy
dATP	deoxyadenosintrifosfát
DBD	DNA vázající doména (DNA-binding domain)
dCTP	deoxycytidintrifosfát
ddPCR	droplet digital polymerase chain reaction
dGTP	deoxyguanosintrifosfát
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA-PKcs	katalytická podjednotka DNA-dependentní proteinkinázy (DNA-dependent protein kinase catalytic subunit)
dNTPs	deoxynukleosidtrifosfáty
dPCR	digitální polymerázová řetězová reakce (digital polymerase chain reaction)
dTTP	deoxythymidintrifosfát
ELOVL6	elongation of very-long-chain fatty acids protein 6
EMA	Evropská léková agentura (European Medicines Agency)
ERK	kináza regulovaná mimobuněčným signálem (extracellular signal-regulated kinase)
FAH	fumarylacetoacetáthydrolyáza
FOXA2	forkhead box A 2 transcription factor

FOXO1	forkhead box O 1 transcription factor
FRET	fluorescenční rezonanční přenos energie (fluorescence resonance energy transfer)
<i>GAPDH</i>	gen pro glycerinaldehyd-3-fosfátdehydrogenázu
GST	glutathion-S-transferáza
<i>HDCC2</i>	gen pro HD domain containing protein 2
HSVtk	thymidinkináza herpes simplex viru typu 1 (herpes simplex virus 1 thymidine kinase)
hTERT	lidská telomerázová reverzní transkriptáza (human telomerase reverse transcriptase)
<i>Il2rg</i>	gen pro gamma řetězec receptoru pro interleukin-2 (interleukin-2 receptor gamma chain)
LBD	ligand vázající doména (ligand-binding domain)
LETFs	liver enriched transcription factors
MATE	multidrug and toxin extrusion protein
<i>MDH1</i>	gen pro malátdehydrogenázu 1
MDR1	multidrug resistance protein 1, též P-glykoprotein
MIQE	minimální informace pro publikaci kvantitativních real-time PCR experimentů (minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments)
MMLV	virus Moloneyho myší leukémie (Moloney murine leukemia virus)
MRP	multidrug resistance associated protein
NAPQI	N-acetyl-p-benzochinonimin
NAT	N-acetyltransferáza
NcoR1	nuclear receptor corepressor 1
NF-κB	nukleární faktor kappa B
NOD	non-obese diabetic
<i>NR1I2</i>	gen pro pregnanový X receptor
NR1I2	pregnanový X receptor
OAT	transportér organických aniontů (organic anion transporter)
OATP	transportní peptid organických aniontů (organic anion transporting polypeptide)
OCT	transportér organických kationtů (organic cation transporter)
OCTN	organic cation transporter novel

OECD	Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj (Organisation for Economic Co-operation and Development)
PARP1	poly(ADP-ribóza)polymeráza 1
PBP	phosphatidylethanolamine binding protein
PCN	pregnenolon-16 α -karbonitril
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
PEPCK1	fosfoenolpyruvátkarboxykináza 1
PGC-1 α	PPAR gamma coactivator 1 α
<i>PPIA</i>	gen pro peptidylprolylizomerázu A
<i>Prkdc</i>	gen pro katalytickou podjednotku DNA-dependentní proteinkinázy (DNA-dependent protein kinase catalytic subunit)
PRMT	protein arginine methyl transferase
<i>PSMB6</i>	gen pro β 6 podjednotku proteazomu
PXR	pregnanový X receptor
PXRRE	responzivní element pregnanového X receptoru
qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce (quantitative polymerase chain reaction), též real-time PCR
qRT-PCR	kvantitativní reverzně transkriptázová polymerázová řetězová reakce
<i>Rag2</i>	gen pro recombination activating gene 2
RIS	relativní indukční skóre (relative induction score)
<i>RPS18</i>	gen pro ribozomální protein S18
RT-qPCR	kvantitativní reverzně transkriptázová polymerázová řetězová reakce
RXR	retinoidní X receptor
SCID	severe combined immunodeficiency
<i>SDHA</i>	gen pro podjednotku A sukcinátdehydrogenázy
SHP	small heterodimer partner
SLC	solute carrier
SMRT	silencing mediator of retinoid and thyroid receptors
SNP	jednonukleotidový polymorfismus (single-nucleotide polymorphism)
SPA	scintillation proximity assay
SRCs	koaktivátory steroidních receptorů (steroid receptor coactivators)
SREBP-1	sterol regulatory element binding protein 1
SULT	sulfotransferáza
SUMO	small ubiquitin-related modifier

<i>TBP</i>	gen pro TATA vazebný protein
TPMT	thiopurin-S-methyltransferáza
TR-FRET	time-resolved fluorescence resonance energy transfer
<i>UBC</i>	gen pro ubikvitin C
UGT	UDP-glukuronosyltransferáza
ULA	ultralow attachment
uPA	urokinázový aktivátor plazminogenu (urokinase-type plasminogen activator)

2 ÚVOD A CÍL

Člověk je neustále v kontaktu s cizorodými látkami (xenobiotiky), které nemohou být zapojeny do endogenních metabolických cest za účelem získání energie a/nebo syntézy funkčních biomolekul. Xenobiotika navíc mohou představovat potenciální zdravotní riziko. Evolučně je proto lidský organismus vybaven komplexním systémem biotransformačních enzymů a transportérů, pomocí nichž je schopen xenobiotika metabolizovat a vyloučit. Hlavním biotransformačním orgánem v těle jsou játra (Skálová et al. 2017).

Jaterní exprese biotransformačních enzymů podléhá regulaci, ve které hrají zásadní roli nukleární receptory – především pregnanový X receptor (PXR). Je-li člověk exponován látkám (včetně léčiv), které jsou schopny tento receptor aktivovat, dochází ke spuštění kaskády dějů. Ty vedou ke zvýšení míry exprese biotransformačních enzymů a k nárůstu biotransformační kapacity organismu (Tolson a Wang 2010, Ihunnah et al. 2011). Klinickým důsledkem enzymové indukce může být snížení účinku (či dokonce selhání) farmakoterapie nebo toxicita v důsledku zvýšené produkce nežádoucích metabolitů parentní látky. Z tohoto důvodu je žádoucí, aby byl případný indukční potenciál nového léčiva odhalen již během preklinického vývoje (Fahmi a Ripp 2010). V tomto ohledu je nutné, aby byly používány metody a modely, které mají potenciál predikovat, zda se dané léčivo jako enzymový induktor projeví i v klinické praxi.

Hlavním pilířem *in vitro* experimentů jaterní biotransformace jsou buněčné modely, jejichž výběr je zásadním aspektem, od něž se odvíjí úspěch zkoumání. Zlatým standardem jsou 2D kultury lidských primárních hepatocytů, jejichž fenotyp odráží znaky normální jaterní tkáně, a proto se jedná o cenný buněčný model. Hepatocytární fenotyp ovšem není v kultivačních podmínkách stabilní, což je spolu s omezenou dostupností těchto buněk hlavním limitujícím faktorem (Zeilinger et al. 2016). Proto jsou vyvíjeny postupy, které by umožnily zachovat vlastnosti lidských primárních hepatocytů po delší dobu kultivace (zejména se jedná o 3D modely) (Fraczek et al. 2013). Stejně tak jsou studovány další *in vitro* modely, které by mohly lidské hepatocyty doplnit nebo nahradit (Donato et al. 2013).

Relativně spolehlivou metodou, pomocí níž lze vyhodnotit, zda u buněčného modelu došlo ke zvýšení exprese sledovaného enzymu, je stanovení změn na úrovni mRNA. Právě tento způsob vyhodnocení *in vitro* experimentů doporučuje využívat i Evropská léková agentura (European Medicines Agency 2015). Klíčovou laboratorní metodou pro stanovení mRNA je kvantitativní polymerázová řetězová reakce, jíž předchází proces reverzní transkripce (RT-qPCR) (Jensen

2012). Polymerázová řetězová reakce, která je pro stanovování nukleových kyselin využívána již řadu let, prošla vývojem, jenž přinesl sofistikované modifikace této metody. Příkladem inovací je droplet digital PCR (ddPCR), která umožňuje kvantifikovat mRNA s vysokou mírou přesnosti a citlivosti (Cao et al. 2017).

Kromě buněčných *in vitro* modelů mohou být využívány také modely *in vivo*. Většinou se však nejedná o běžně používaná laboratorní zvířata, neboť ta jsou pro studium PXR dependentní indukce z důvodu mezidruhových rozdílů nevhodná (Jaiswal et al. 2014). Namísto toho jsou používány tzv. humanizované modely – geneticky upravená zvířata či zvířata, do nichž jsou transplantovány lidské hepatocyty. Tyto modely mohou vytvářet pomyslný most mezi *in vitro* experimenty a následnými klinickými studiemi s lidskými subjekty (Scheer a Wilson 2016).

Lékové interakce na podkladě enzymové indukce mohou mít zásadní klinický význam. Pochopení molekulárních mechanismů, které jsou zapojeny do regulace exprese biotransformačních enzymů, je základním předpokladem pro úspěšné preklinické testování indukčního potenciálu nově vyvíjených léčiv. Výběr vhodných *in vitro* a *in vivo* modelů, znalost jejich předností a respektování jejich limitů jsou v tomto ohledu klíčové aspekty. Kromě modelů je nutné znát také metody, které jsou za účelem studia enzymové indukce využívány. Neméně důležité je také sledování nových trendů a směrů, kterými se vývoj metod a modelů pro studium modulace genové exprese ubírá.

Od výše zmíněných skutečností se obsahově odvíjí zaměření této rešeršní práce, která si klade za cíl:

1. Shrnout základní znalosti o PXR. Definovat jeho roli při regulaci exprese biotransformačních enzymů a vysvětlit klinické důsledky jeho aktivace.
2. Představit PXR také v širším kontextu, a to se zaměřením na aktuální poznatky o jeho roli v endogenním metabolismu a patofyziologických procesech.
3. Sestavit přehled jaterních buněčných modelů využívaných při studiu PXR dependentní enzymové indukce.
4. Definovat žádoucí vlastnosti, kterými by využívané buněčné modely měly disponovat, a zhodnotit jednotlivé modely z hlediska jejich prediktivní schopnosti při studiu enzymatické indukce.
5. Objasnit využitelnost laboratorních zvířat při studiu enzymové indukce a shrnout poznatky o humanizovaných zvířecích modelech.
6. Sestavit přehled experimentálních metod využívaných při studiu enzymové indukce pomocí PXR.

7. Představit PCR jako molekulárně biologickou metodu se zásadním významem pro diskutovanou problematiku. Shrnout poznatky o jejím principu a vysvětlit aplikaci této metody pro kvantifikaci mRNA.
8. Představit droplet digital PCR jako aktuální trend v oblasti PCR metod, vysvětlit její princip a možnosti využití.

3 TEORETICKÁ ČÁST

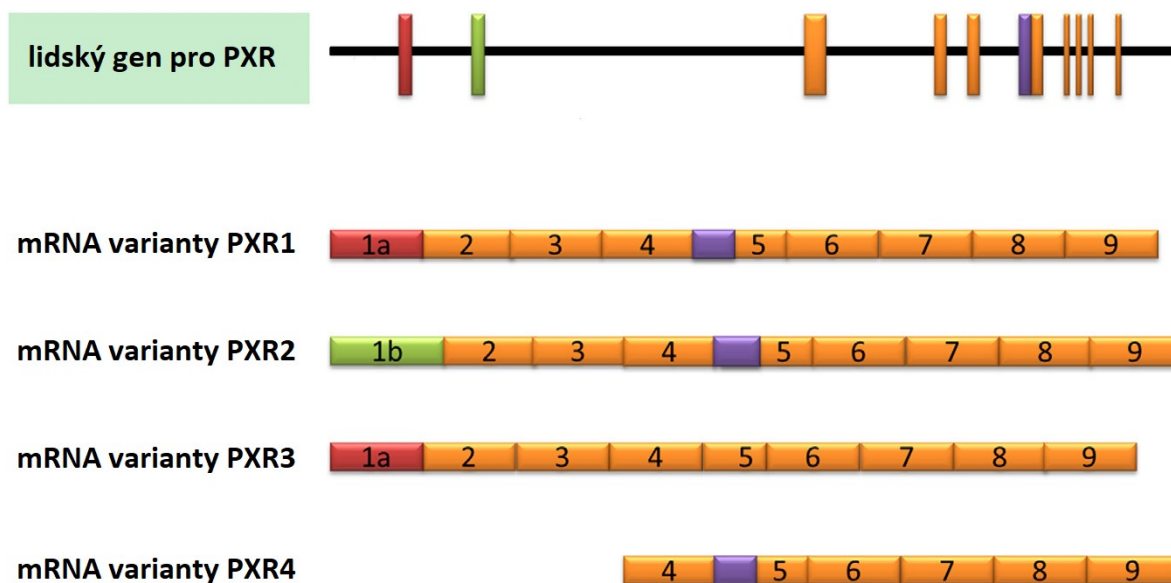
3.1 Pregnanový X receptor

Pregnanový X receptor (PXR) je protein patřící do nadrodiny nukleárních receptorů. Konkrétně je řazen do podrodiny 1, skupiny I, v níž tento receptor získal číslo 2, a lze jej tedy v literatuře nalézt též pod označením NR1I2 (Pávek 2016). Objeven byl v roce 1998 (Blumberg et al. 1998, Kliewer et al. 1998, Lehmann et al. 1998). Jedná se o ligandem aktivovaný transkripční faktor, který hraje důležitou roli při regulaci genové exprese mnoha enzymů a transportérů, které se účastní všech fází biotransformace xenobiotik (di Masi et al. 2009, Pávek 2016, Mackowiak et al. 2018). PXR je v největší míře exprimován v játrech a střevech. Jeho funkcí je ochrana organismu před škodlivými látkami exogenního, ale i endogenního původu (di Masi et al. 2009). Kromě regulace transkripce klíčových biotransformačních enzymů a transportérů se také uplatňuje v dalších rolích, a to například při energetické homeostáze, při imunitních a zánětlivých reakcích nebo při rozvoji některých onemocnění (Mackowiak et al. 2018).

3.1.1 Základní charakteristika PXR

Pregnanový X receptor vzniká expresí genu *NR1I2*, který je lokalizován na chromozomu 3 a obsahuje 10 exonů a 9 intronů (di Masi et al. 2009). Alternativní sestřih primárního transkriptu dává vzniknout několika variantám (izoformám) PXR, viz Obr. 1. Ty se vzájemně liší strukturou i funkcí, především co se týče schopnosti indukovat transkripci cílových genů (Brewer a Chen 2016). Varianta PXR1, která je považována za wild-type formu tohoto receptoru (di Masi et al. 2009), spolu s variantou PXR2 indukují expresi regulovaných genů, zatímco varianty PXR3 a PXR4 nikoliv. Podíl exprese jednotlivých variant PXR spolu s výskytem jednonukleotidového polymorfismu (single-nucleotide polymorphism, SNP) může přispívat k interindividuální variabilitě v odpovědi na farmakoterapii (Brewer a Chen 2016).

Podobně jako ostatní nukleární receptory obsahuje i molekula PXR několik domén, viz Obr. 2. Na C-konci proteinu se nachází ligand vázající doména (ligand-binding domain, LBD), která zajišťuje interakci s ligandy. Na N-konci se nachází DNA vázající doména (DNA-binding domain, DBD), jež se váže na specifický responzivní element (PXRRE), který je přítomen v příslušných promotorových oblastech regulovaných genů. LBD a DBD jsou spojeny doménou, která je v anglicky psané literatuře označována jako „H (hinge) region“ (Buchman et al. 2018, Pávek 2016).



Obr. 1 Transkripční varianty PXR

Na obrázku je znázorněn lidský gen pro PXR (obsahující přibližně 38 000 párů bází) a mRNA jednotlivých transkripčních variant PXR. Obdélníky představují exony. Část exonu 5, která není přítomna u varianty PXR3, je znázorněna fialově; části exonu 1 pak červeně a zeleně.

Modifikováno dle: Brewer a Chen (2016), přeloženo.

Ligand vázající doména PXR se skládá ze tří vrstev alfa-helixů a pěti antiparalelních beta-skládaných listů. Vazebné místo, které s ligandy interaguje prostřednictvím 28 převážně hydrofobních aminokyselinových zbytků, je větší, než je obvyklé u jiných nukleárních receptorů (di Masi et al. 2009, Pávek 2016). LBD je zakončena alfa-helixem označovaným jako α AF, který tvoří doménu AF-2, jež zabezpečuje interakci PXR s dalšími koregulátory transkripce. Těmi jsou příslušné koaktivátory a korepresory, s jejichž specifickými motivy v aminokyselinové sekvenci se AF-2 váže (Pávek 2016).

PXR je prostřednictvím svého dostatečně velkého a flexibilního vazebného místa schopen vázat mnohé strukturně odlišné látky (Wu a Dong 2013). Z léčiv lze zmínit například antiepileptika (fenobarbital, karbamazepin, topiramát), antivirotika (ritonavir, efavirenz), cytostatika (paklitaxel, etoposid, topotekan, tamoxifen), lovastatin, nifedipin, rifampicin, klotrimazol, dexametazon nebo spironolakton (Chang a Waxman 2006). Mezi další PXR ligandy patří hyperforin nebo některé pesticidy. Ligandy mohou být specifické k PXR (rifampicin, hyperforin), některé jsou také aktivátory dalších xenosenzorů, např. CAR (constitutive androstane receptor, konstitutivní androstanový receptor), čímž je ochrana před potenciálně škodlivými xenobiotiky zvýšena (Wu a Dong 2013).



Obr. 2 Schéma struktury PXR

DBD – DNA vázající doména (DNA-binding domain), H – hinge region, LBD – ligand vázající doména (ligand-binding domain)

Modifikováno dle: Smutný et al. (2013).

V minulosti byly některé nukleární receptory včetně PXR označovány jako tzv. orphan receptors („sirotčí receptory“), a to z toho důvodu, že u nich nebyl znám žádný endogenní ligand. Receptory, jejichž endogenní ligandy byly posléze objeveny, pak můžeme v literatuře nalézt pod označením adopted orphan receptors, tedy „adoptované sirotčí receptory“ (di Masi et al. 2009). V případě PXR se jedná o identifikaci endogenního 5β -pregnan-3,20-dionu jako ligandu tohoto receptoru (Lehmann et al. 1998).

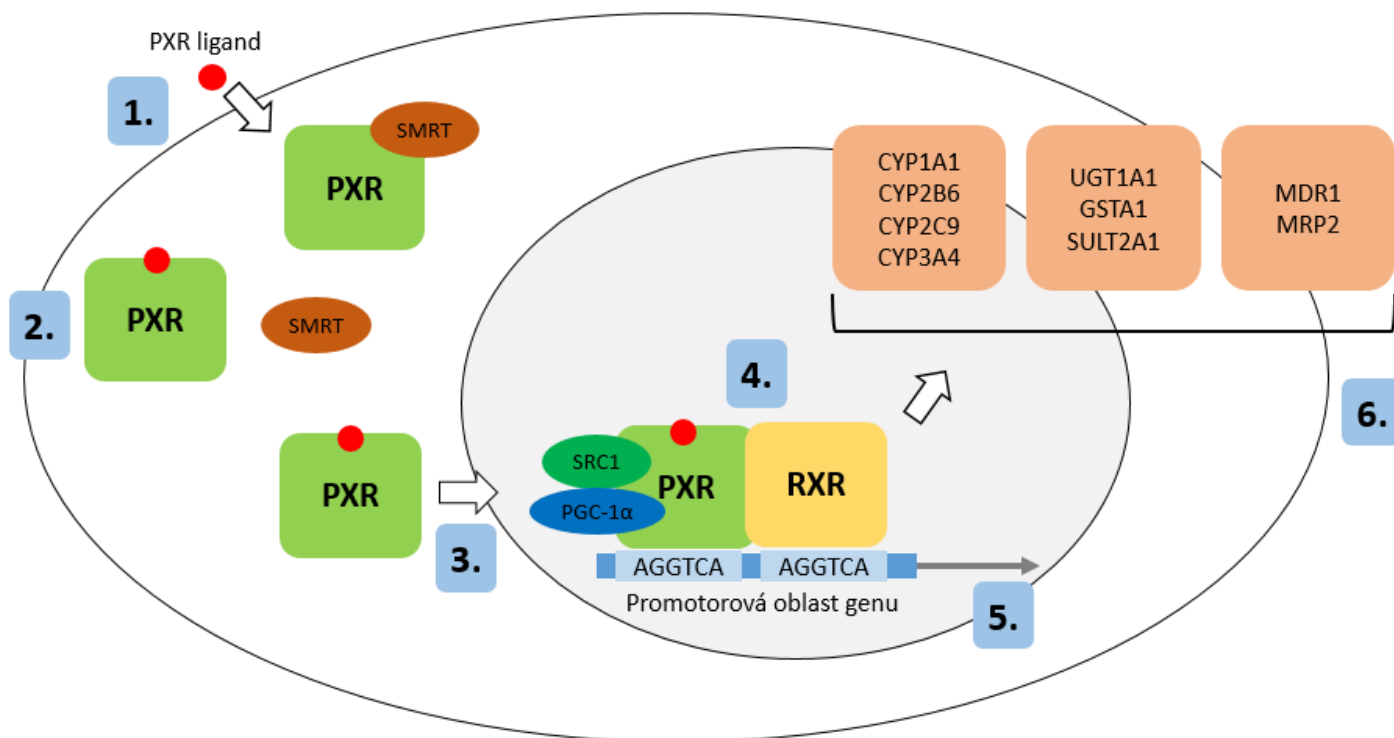
3.1.2 Mechanismus indukce exprese genů regulovaných PXR

Aby pregnanový X receptor mohl plnit svou funkci, musí dojít k jeho aktivaci a k následné kaskádě dějů, jejichž výsledkem je změna exprese cílových genů. PXR může být aktivován svými ligandy (přímá aktivace) nebo může být jeho aktivita ovlivňována posttranslačními modifikacemi, tedy nepřímo (Mackowiak a Wang 2016).

V neaktivním stavu se PXR nachází ve vazbě s korepresory, kterými jsou například SMRT (silencing mediator of retinoid and thyroid receptors), NcoR1 (nuclear receptor corepressor 1), SHP (small heterodimer partner), SREBP-1 (sterol regulatory element binding protein 1) nebo FOXA2 (forkhead box A 2 transcription factor) (Mackowiak a Wang 2016, Xing et al. 2020). Tyto molekuly, které potlačují aktivitu PXR, mají ve své primární struktuře společný motiv Ile/Leu-Xxx-Xxx-Ile/Val-Ile a k jejich vazbě na receptor dochází prostřednictvím AF-2 domény (Xing et al. 2020, Pávek 2016). Vazba ligandu k PXR v cytoplazmě způsobí vyvázání korepresorů, translokaci PXR do buněčného jádra, formaci heterodimeru s retinoidním X receptorem (RXR) a jeho vazbu na responzivní element v promotorové oblasti cílového genu. Vazba na promotor probíhá po rozpoznání dvou přímých repetitivních AGGTCA oddělených třemi (DR3), čtyřmi (DR4) nebo pěti (DR5) bázemi nebo po rozpoznání dvou evertovaných repetitivních oddělených šesti (ER6) nebo osmi (ER8) bázemi (Hariparsad et al. 2009, Mackowiak a Wang 2016). Po uvolnění korepresorů je PXR schopen vázat koaktivátory, které se vyznačují společným motivem Leu-Xxx-Xxx-Leu-Leu a které podporují transkripční aktivitu PXR. Mezi

tyto koaktivátory patří SRCs (steroid receptor coactivators, koaktivátory steroidních receptorů), FOXO1 (forkhead box O 1 transcription factor), PGC-1 α (PPAR gamma coactivator 1 α), PBP (phosphatidylethanolamine binding protein) nebo PRMT (protein arginine methyl transferase) (Xing et al. 2020, Pávek 2016). Komplex koaktivátorů a PXR způsobí změnu v uspořádání chromatinu v dané oblasti DNA, atrakci transkripčního komplexu RNA-polymerázy II a zahájení přepisu genetické informace (Pávek 2016).

Výše zmíněný mechanismus aktivace je aktivací přímou a je znázorněn na Obr. 3. Aktivita PXR však může být ovlivňována též řadou dalších faktorů, kterými jsou posttranslační modifikace. Ty mají vliv na dimerizaci, interakce s koregulátory či na míru degradace receptoru, a mohou tak modulovat aktivitu receptoru bez přítomnosti příslušných ligandů. PXR je v tomto smyslu cílem fosforylace, ubikvitinace, SUMOylace, acetylace a poly-ADP-ribosylace (Smutný et al. 2013, Xing et al. 2020).



Obr. 3 Schéma aktivace PXR příslušným ligandem

1. Navázání ligandu na receptor 2. Vyvázání korepresorů 3. Translokace do jádra 4. Navázání koaktivátorů, vazba ve formě heterodimeru s RXR na responzivní element 5. Transkripce 6. Zvýšená biotransformační kapacita

Vytvořeno s využitím informací: Hariparsad et al. (2009), di Masi et al. (2009), Tolson a Wang (2010), Mackowiak a Wang (2016), Pávek (2016), Xing et al. (2020).

Aktivita PXR může být modifikována buněčnými signálními drahami, které ovlivňují stav fosforylace tohoto receptoru či dalších koregulátorů. Zvýšená indukce CYP3A zprostředkovaná

PXR byla pozorována například po aktivaci proteinkinázy A. Aktivace proteinkinázy C měla naopak za následek snížení aktivity PXR. Aktivace proteinkinázy A pravděpodobně napomáhá vazbě koaktivátoru SRC-1 na PXR, aktivace proteinkinázy C pak nejspíše posiluje vazbu korepresoru NcoR1 k PXR. Vliv na aktivitu PXR byl pozorován též u cyklin-dependentních kináz (CDK) (Mackowiak a Wang 2016).

Ubikvitinace je proces, během kterého jsou na proteiny určené k degradaci enzymaticky navázány molekuly ubikvitinu, a tyto proteiny jsou následně rozloženy v proteazomech. Některé ligandy PXR mohou tuto dráhu ovlivňovat, a snižovat tak míru degradace PXR. SUMOylace spočívá v navázání ubikvitinu podobných proteinů ze skupiny SUMO (small ubiquitin-related modifier), což je u nukleárních receptorů většinou spojeno se snížením aktivity (Smutný et al. 2013). Acetylace PXR rovněž způsobuje snížení aktivity tohoto receptoru, a to z důvodu negativního ovlivnění možnosti dimerizovat s RXR a vázat se na DNA. Poly(ADP-ribóza)polymeráza 1 (PARP1) je enzym, který poly-ADP-ribosylací PXR usnadňuje vazbu PXR na DNA, a působí tak ve smyslu zvýšení jeho aktivity (Xing et al. 2020).

3.1.3 Metabolismus léčiv

Metabolismus xenobiotik (včetně léčiv) je tradičně rozdělován na dvě fáze: na první fázi, pro niž je charakteristická účast oxidačních, redukčních a hydrolytických enzymů, a fázi druhou, kdy dochází ke konjugaci xenobiotika s hydrofilní endogenní molekulou, čímž je umožněno snazší vyloučení takto vzniklého produktu. Xenobiotikum se může v závislosti na své struktuře účastnit obou nebo pouze některé z fází biotransformace, stejně tak jeho metabolity mohou být substrátem následných reakcí první i druhé fáze, což se často projevuje rozmanitým metabolickým profilem parentní molekuly. Při interakci xenobiotik s organismem hrají důležitou úlohu též transportní proteiny (což je možné označit jako další fázi metabolismu xenobiotik) (Skálová et al. 2017).

Pro první fázi biotransformace je zásadní systém cytochromu P450 (CYP). Jedná se o enzymy ze skupiny oxygenáz, které katalyzují hydroxylace (včetně hydroxylace aromatických kruhů), N- a O-dealkylace, N- a S-oxidace a deaminace. Napříč celým spektrem živých organismů byly identifikovány tisíce různých izoform CYP, které se od sebe různou měrou liší v primární struktuře (Omiecinski et al. 2011).

U člověka je nejvýznamnější exprese CYP v játrech, kde jsou tyto enzymy ukotveny v membráně endoplazmatického retikula, případně v membráně mitochondrií. Kromě jater jsou přítomny i v dalších orgánech, například v tenkém střevě nebo plicích (Waring 2020). Míra

exprese CYP je závislá na řadě faktorů, mezi něž patří pohlaví, věk, změny v průběhu patologických stavů a v neposlední řadě též indukce, při níž hrají roli nukleární receptory. Znalost těchto faktorů má svůj význam při predikci individuální farmakokinetiky a odpovědi na farmakoterapii u jednotlivých pacientů (Zanger a Schwab 2013).

Enzymy cytochromu P450 se účastní metabolismu až 80 % veškerých v současnosti používaných léčiv (Waring 2020). V tomto ohledu jsou klíčové především izoformy CYP3A4/5 (více než 50 % všech léčiv, včetně atorvastatinu, erythromycinu, midazolamu aj.), CYP2D6 (15–25 % všech léčiv, včetně kodeinu, mirtazapinu, paroxetinu aj.) a CYP2C9 (včetně nesteroidních antiflogistik, warfarinu, irbesartanu aj.). Dalšími izoformami zapojenými do metabolismu léčiv jsou CYP1A2, CYP2B6, CYP2C19, CYP2E1 a další (Zanger a Schwab 2013).

Druhá fáze biotransformace xenobiotik je katalyzována transferázami, z nichž pro metabolismus léčiv jsou nejdůležitější UDP-glukuronosyltransferázy (UGT), sulfotransferázy (SULT), glutathion-S-transferázy (GST), N-acetyltransferázy (NAT) a další enzymy zajišťující konjugaci s aminokyselinami, metylaci (např. thiopurin-S-methyltransferáza, TPMT) aj. Vzniklé konjugáty jsou oproti původním molekulám více hydrofilní a lze je snadněji vyloučit z organismu renální či biliární cestou (Jancová et al. 2010).

Důležitým farmakokinetickým faktorem je interakce léčiv s transportními proteiny, které se uplatňují při absorpci, distribuci, metabolismu a exkreci (ADME). Přenašeče hrající úlohu při transportu léčiv lze rozdělit do dvou rodin, kterými jsou ABC transportéry (ATP-binding cassette) a SLC transportéry (solute carrier). ABC transportéry zajišťují především aktivní eflux, k čemuž využívají energii vzniklou při hydrolýze ATP. Mezi zástupce této rodiny patří například přenašeče BCRP (breast cancer resistance protein, protein rezistence karcinomu prsu), MDR1 (multidrug resistance protein 1, P-glykoprotein) či MRP (multidrug resistance associated protein). SLC transportéry naopak zprostředkovávají influx (uptake) látek dovnitř buněk, a to mechanismem facilitované difuze či kotransportem s endogenními organickými ionty. Zástupci této skupiny jsou kupříkladu OAT transportéry (organic anion transporter, transportér organických aniontů), OCT transportéry (organic cation transporter, transportér organických kationtů), OCTN transportéry (organic cation transporter novel), MATE transportéry (multidrug and toxin extrusion protein) nebo OATP transportéry (organic anion transporting polypeptide, transportní peptid organických aniontů) (Nigam 2015, Han 2011).

3.1.4 Biotransformační enzymy a transportéry podléhající regulaci PXR

Pregnanový X receptor je označován jako xenosenzor. Je-li organismus exponován exogenním ligandům receptoru, dochází ke spuštění kaskády, jejímž výsledkem je zvýšení exprese cílových genů PXR. V případě biotransformačních enzymů tak dochází ke zvýšení jejich syntézy a k nárůstu metabolizační kapacity, čímž je organismus lépe chráněn vůči toxickému působení xenobiotik. Obdobným způsobem může být exprese genů ovlivněna také aktivací PXR endogenními ligandy (Tolson a Wang 2010, Ihunnah et al. 2011). Proces enzymové indukce má určitou časovou dynamiku a zvýšení exprese biotransformačních enzymů může být známkou dřívější expozice induktoru (který v dané chvíli již nemusí být v organismu přítomen). Míra indukce závisí na dávce induktoru a na délce jeho expozice (Skálová et al. 2017).

Příklady biotransformačních enzymů a transportérů, jejichž exprese podléhá regulaci PXR, jsou uvedeny v Tab. 1. Z této tabulky je patrné, že PXR reguluje expresi mnoha genů zásadních pro metabolismus léčiv. Evans (2005) ve své práci uvádí, že nežádoucí aktivace PXR může být příčinou až 60 % veškerých lékových interakcí. Nakolik je tato hodnota platná pro současnou klinickou praxi, není snadné určit. Z výčtu regulovaných genů je nicméně zcela zřejmý význam PXR pro farmaceutické vědy. Z tohoto důvodu není překvapením, že je v rámci vývoje léčiv sledován jejich potenciál aktivovat nukleární receptory (včetně PXR) a že jsou v této souvislosti využívány a vyvíjeny *in vitro* a *in vivo* modely, které mají pomoci tento potenciál predikovat (Urquhart et al. 2007).

Ačkoliv je aktivace PXR většinou spojena se zvýšením exprese cílových genů, není bez zajímavosti, že aktivace tohoto receptoru může expresi i snižovat. Příkladem je regulace genu pro enzym CYP7A1, který katalyzuje syntézu žlučových kyselin (di Masi et al. 2009, Nguyen a Bouscarel 2008). Při poruchách odvodu žluči dochází ke kumulaci toxických žlučových kyselin (např. kyseliny lithocholové) a jiných toxických žlučí vylučovaných látek. V důsledku cholestázy je následně poškozována hepatální tkáň, což může vyústit až v nutnost transplantace jater (Staudinger et al. 2001, Gonzalez-Sanchez et al. 2015). PXR může působit protektivně u těchto stavů. Právě lithocholová kyselina je ligandem PXR, který po své aktivaci snižuje expresi CYP7A1, čímž inhibuje tvorbu dalších žlučových kyselin. Aktivací PXR je zároveň zvýšena exprese CYP3A4, čímž je podpořena detoxifikace žlučových kyselin (Nguyen a Bouscarel 2008). Pro příznivou úpravu exprese biotransformačních enzymů a transportních proteinů ve vztahu k metabolismu žlučových kyselin jsou agonisté PXR studováni jako potenciální kandidáti pro terapii patologických stavů spojených s cholestázou (Nguyen a Bouscarel 2008, Beuers et al. 2015).

Tab. 1 Příklady biotransformačních enzymů a transportérů podléhajících regulaci PXR

CYP1	Fáze I			Fáze II		Transportní proteiny
	CYP2	CYP3	Další	UGT	Další	
1A1	2A6	3A4	4F12	1A1	GSTA1	MDR1
1A2	2B6	3A7	7A1*	1A3	SULT2A1	MRP2
1A6	2B10	3A11	11A1	1A4		
	2C8		11B1	1A6		
	2C9		11B2			
	2C19					

* V případě CYP7A1 způsobuje PXR snížení exprese.

Vytvořeno s využitím informací: Tolson a Wang (2010), di Masi et al. (2009); vybrána data relevantní pro lidský organismus.

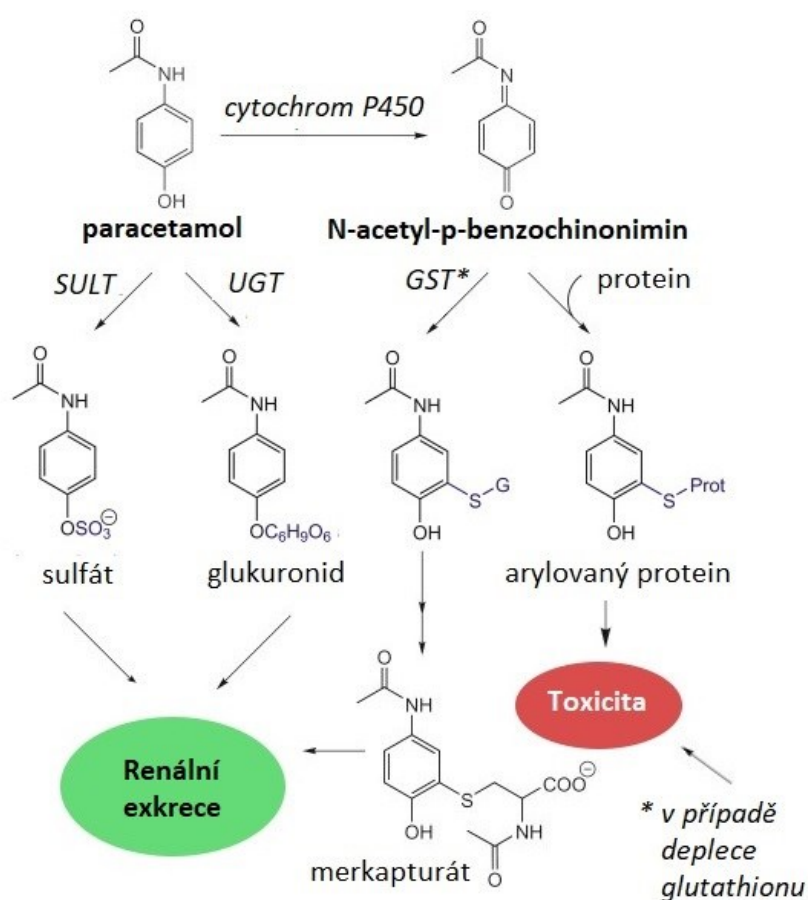
3.1.5 Klinické důsledky indukce exprese biotransformačních enzymů pomocí PXR

Změny v míře transkripce a zvýšení biotransformační kapacity jedince s sebou přinášejí potenciální nežádoucí klinické důsledky, jakými jsou snížení účinku (až selhání) farmakoterapie (A) či zvýraznění nežádoucích účinků podávaných léčiv (B).

(A) Aktivace PXR, která vede ke zvýšení exprese biotransformačních enzymů, může mít za následek zvýšenou biotransformaci podávaných léčiv a snížení jejich plazmatických koncentrací. Z tohoto důvodu může dojít ke snížení účinku až selhání farmakoterapie (Sinz 2013). Příkladem PXR dependentních lékových interakcí může být nutnost podávání vyšších dávek statinů u pacientů současně léčených indukujícími antiepileptiky (karbamazepin, fenytoin). Stejně tak jsou známy interakce orálních kontraceptiv s antiepileptiky, které mohou vést ke zvýšení rizika selhání kontracepce (Brodie et al. 2013).

Lékový problém spojený se změnou exprese biotransformačních enzymů může vzniknout též v důsledku fyziologických změn v organismu. U těhotných žen byla například popsána zvýšená clearance labetalolu, podávaného jako antihypertenzivum. Příčinou je indukce UGT1A1 v důsledku významně zvýšené hladiny progesteronu v období těhotenství, který je aktivátorem PXR (Jeong et al. 2008).

(B) Aktivací PXR a s ní spojeným zvýšením exprese biotransformačních enzymů může docházet ke zvýšené tvorbě toxických metabolitů léčiv (Wang et al. 2014). Jako příklad lze uvést paracetamol, který v organismu za normálních okolností majoritně podstupuje glukuronidaci či sulfataci. Alternativní cestu představuje metabolizace prostřednictvím CYP2E1 a v menší míře i CYP3A4 a CYP1A2. Produktem alternativní cesty je toxický metabolit N-acetyl-p-benzochinonimin (NAPQI) (Yoon et al. 2016). Podávání agonistů PXR spolu s paracetamolem a s tím spojená indukce jaterních CYP enzymů může zvyšovat podíl metabolizace paracetamolu zmíněnou sekundární cestou, a tak přispívat k hepatotoxickému působení tohoto léčiva (Wang et al. 2014). Mechanismus zvýšení toxicity paracetamolu je znázorněn na Obr. 4.



Obr. 4 Mechanismus zvýšení toxicity paracetamolu v důsledku enzymové indukce

Na uvedeném schématu jsou znázorněny metabolické cesty paracetamolu. Zvýšená míra metabolizace prostřednictvím enzymů cytochromu P450 v důsledku aktivace PXR může přispívat k hepatotoxickému působení tohoto léčiva.

Modifikováno dle: Macherey a Dansette (2015), přeloženo.

Podobně se může toxicita projevit také u proléčiv. V důsledku indukce biotransformačních enzymů může dojít k několikanásobnému zvýšení plazmatické koncentrace aktivního metabolitu, což může být spojeno s rizikem toxického působení (Skálová et al. 2017). V důsledku enzymové indukce může kromě zvýšení toxicity exogenních látek současně docházet i ke změnám v metabolismu endogenních sloučenin, kdy se mohou v organismu ve zvýšené míře kumulovat jejich toxické deriváty (Wang et al. 2014).

Negativní klinické konsekvence aktivace PXR, jakými jsou snížení účinku a zvýšení toxicity léčiv, by bylo možné korigovat, pokud bychom měli k dispozici účinné antagonisty tohoto receptoru. Ty by také bylo možné použít například u případů rezistence nádorových buněk k cytostatické terapii, kde je rovněž známa role PXR (Mani et al. 2013). Jako antagonistu PXR je studován například ketokonazol. Jako účinná byla představena také látka s označením SPA70 (Lin et al. 2017).

3.1.6 Další funkce PXR

Jako receptor chrání organismus před působením potenciálně toxických substancí je PXR znám a intenzivně studován již přes dvě desetiletí. V posledních letech však přibývají poznatky o roli tohoto receptoru též v odlišných procesech, jakými jsou například metabolismus glukózy a lipidů, buněčná proliferace či zánět a imunitní odpověď (Oladimeji a Chen 2018, Mackowiak et al. 2018).

PXR a regulace metabolismu glukózy

PXR se podílí na regulaci exprese glukóza-6-fosfatázy a fosfoenolpyruvátcarboxykinázy 1 (PEPCK1), klíčových enzymů pro glukoneogenezi. Při studiu vlivu aktivace PXR na expresi těchto enzymů však byly pozorovány výrazné odlišnosti v závislosti na použitém modelu. Při zkoumání vlivu PXR u lidských primárních hepatocytů došli vědci k protichůdným výsledkům, kdy bylo pozorováno jak zvýšení, tak snížení exprese glukóza-6-fosfatázy. Oproti tomu při studiu na myších a na buňkách HepG2 a Huh7 bylo pozorováno snížení exprese glukóza-6-fosfatázy i fosfoenolpyruvátcarboxykinázy. U myší a potkanů bylo navíc pozorováno snížení exprese přenašeče GLUT2, zabezpečujícího při vysoké koncentraci glukózy v krvi její transport do jater, a snížení exprese glukokinázy, enzymu zajišťujícího první krok utilizace glukózy, tedy fosforylaci glukózy na glukózu-6-fosfát (Hakkola et al. 2016).

Přibývá důkazů, že látky aktivující PXR mohou negativně ovlivňovat glukózovou toleranci a přispívat k rozvoji diabetu mellitu 2. typu – v tomto ohledu se však autoři shodují na potřebě dalšího zkoumání (Hakkola et al. 2016, Hassani-Nezhad-Gashti et al. 2018).

PXR a regulace metabolismu lipidů

Aktivace PXR v lidských primárních hepatocytech způsobuje snížení β -oxidace mastných kyselin a zvýšení lipogeneze, což vede ke kumulaci lipidů v buňkách a působí negativně ve smyslu rozvoje steatózy jater. PXR snižuje expresi karnitinpalmitoyltransferázy 1 (CPT1), enzymu potřebného pro transport mastných kyselin do mitochondrií, kde probíhá jejich β -oxidace. Indukována je naopak exprese enzymů podílejících se na lipogenezi, jakými jsou syntáza mastných kyselin, ATP-citrátlyáza, acetyl-CoA-karboxyláza 1, stearoyl-CoA-desaturáza 1, elongáza ELOVL6 (elongation of very-long-chain fatty acids protein 6) a další (Hakkola et al. 2016).

Di Masi et al. (2009) nicméně poukazují na skutečnost, že je k dispozici velice málo klinických zpráv o léky (agonisty PXR) navozené steatóze jater – v této souvislosti autoři článku zmiňují rifampicin, který je k léčbě tuberkulózy používán ve velké míře již od 70. let 20. století a u kterého neexistují o podobném nežádoucím účinku evidence. Přesto autoři článku doporučují u agonistů PXR v souvislosti s možným přispíváním k rozvoji hepatální steatózy bdělost a zmiňují potřebu dalšího bádání v této oblasti.

PXR v regulaci buněčné proliferace a v patogenezi nádorových onemocnění

PXR je schopen regulovat též geny spojené s buněčnou proliferací a apoptotickými ději, což tento receptor staví do pozice faktoru s významem pro rozvoj onkologických onemocnění. Co se týče role PXR v buněčné proliferaci, popsány byly mechanismy, kterými může PXR působit jak ve smyslu podpory, tak inhibice proliferace. Určující vliv má konkrétní typ buněk a tkání, kde PXR působí. Vliv tkáňové specifity se týká i role aktivace PXR při rozvoji či progresi onkologických onemocnění. Například při zkoumání buněčné linie ovariálního karcinomu SKOV-3 měla aktivace PXR rifampicinem za následek indukci proliferace těchto buněk, zatímco při zkoumání buněčných linií cervikálního karcinomu CaSki a HeLa měla aktivace PXR efekt opačný, tedy tumorsupresivní, a buněčná proliferace obou linií byla inhibována (Pondugula et al. 2016).

Význam PXR u nádorových onemocnění je kromě vlivu na buněčný cyklus dán také skutečností, že jsou mnohá protinádorová léčiva substráty biotransformačních enzymů a/nebo

transportérů podléhajících regulaci PXR. Aktivace PXR tak může přispívat k rezistenci nádorů k terapii (Mackowiak et al. 2018).

PXR v regulaci imunitní odpovědi a zánětu

PXR má také vliv na imunitní odpověď organismu. Hojně je studována role tohoto receptoru při patogenezi některých zánětlivých onemocnění, především zánětlivých onemocnění gastrointestinálního traktu, jakými jsou Crohnova choroba či ulcerózní kolitida. Aktivace PXR inhibuje kaskádu nukleárního faktoru kappa B (NF- κ B), čímž je snížena exprese genů pro prozánětlivé cytokiny, a PXR tedy tímto nepřímým způsobem inhibuje rozvoj zánětu (Oladimeji a Chen 2018, Rosette et al. 2019). Tato inhibice vysvětluje imunosupresivní efekt některých agonistů PXR, jakým je například rifampicin (Wahli 2008).

Aktivace PXR inhibuje NF- κ B, aktivace NF- κ B naopak inhibuje funkci PXR. Protože je aktivita NF- κ B při zánětlivých onemocněních či infekcích zvýšena, je u daných pacientů v souladu s touto vzájemnou inhibicí snížena exprese genů regulovaných PXR. Snížená je tedy i exprese biotransformačních enzymů a transportérů (Wahli 2008).

PXR a regulace endokrinní homeostázy

Vliv PXR je studován také v souvislosti s endokrinní homeostázou. Výzkumníci se zaměřují například na roli PXR jako možného endokrinního disruptoru, kdy bylo po aktivaci tohoto receptoru pozorováno zvýšení hladiny glukokortikoidů a mineralokortikoidů. Opačný efekt má aktivace PXR na hladinu androgenů. Prostřednictvím indukce PXR dependentních enzymů CYP3A a SULT2A1, které se účastní deaktivace androgenů, je snižována aktivita androgenních hormonů. To může otevřít prostor pro výzkum možností terapeutického zásahu u androgen-dependentních nádorů prostaty (Ihunnah et al. 2011).

3.2 Jaterní buněčné modely pro studium enzymové indukce

Základní postup, který umožňuje zhodnotit indukční potenciál vyvíjeného léčiva, zahrnuje expozici buněčné kultury této testované látky a následné vyhodnocení změn v expresi sledovaných genů na úrovni mRNA, proteinu či enzymové aktivity (viz Kap. 3.4). Při provádění těchto *in vitro* experimentů je zásadní výběr buněk, jež budou potenciálnímu induktoru vystaveny. Používané buňky by měly disponovat srovnatelnými funkcemi a metabolickými drahami, jako je tomu u jaterní tkáně *in vivo*, a aby bylo možné získat spolehlivá a reprodukovatelná data, měly by být tyto vlastnosti konstantní v čase. Jako zlatý standard *in vitro* jaterních modelů jsou označovány lidské primární hepatocyty. Jedná se o buňky, které byly získány z celých jater původně určených k transplantaci (kdy ovšem k jejich transplantaci z různých důvodů nemohlo dojít) nebo z resekované jaterní tkáně. Primární hepatocyty splňují požadavek srovnatelnosti s jaterní tkání *in vivo* a lze na nich provádět prediktivní experimenty s poměrně vysokou mírou spolehlivosti. Tyto buňky ovšem v laboratorních podmínkách neproliferují, jejich fenotyp není stabilní (dediferencují), vyznačují se interindividuální variabilitou (jsou získávány od různých dárců), a navíc nejsou optimálně dostupné (Zeilinger et al. 2016).

Z důvodu těchto limitů jsou dále používány také buněčné linie odvozené od nádorově změněných jaterních buněk. Ty se vyznačují dobrou dostupností, prakticky neomezenou životností a snadným zacházením. Jejich fenotyp je ovšem odlišný od původní zdravé hepatální tkáně, což je hlavní nevýhodou těchto buněčných linií (Donato et al. 2013).

O lidských primárních hepatocytech a o dalších typech buněk využívaných při studiu enzymové indukce (jejichž vlastnosti jsou na závěr shrnuty v Tab. 3) bude podrobněji pojednáno v následujících podkapitolách.

3.2.1 Lidské primární hepatocyty

Lidské primární hepatocyty jsou buňky získané z jater lidských dárců a svými vlastnostmi jsou srovnatelné s nativní jaterní tkání. Díky tomu jsou cenným *in vitro* modelem nejen pro výzkum metabolismu léčiv a enzymové indukce, ale také například léky navozené hepatotoxicity. Hepatocyty mohou být použity k experimentům okamžitě po jejich získání od dárce, což s sebou přináší i řadu logistických obtíží a vyžaduje dobře organizovanou spolupráci mezi výzkumníky, lékaři a dalším personálem. Pro usnadnění tohoto procesu a zajištění lepší dostupnosti mohou být hepatocyty kryoprezervovány a rozmrazeny až v čase potřeby (Zeilinger et al. 2016). Evropská léková agentura (European Medicines Agency, EMA) ve svých

doporučeníh pro studium lékových interakcí mezi čerstvě izolovanými a kryoprezervovanými hepatocyty nerozlišuje a pro testování enzymové indukce připouští obě varianty (European Medicines Agency 2015).

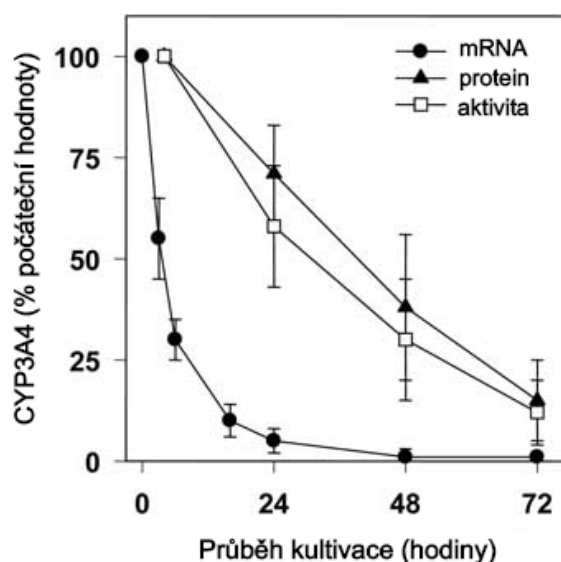
Hepatocyty kultivované v laboratorních podmínkách se vyznačují obdobnými fenotypovými znaky, jaké jsou přítomny v játrech *in vivo*. Ty zahrnují expresi enzymů 1. i 2. fáze metabolismu xenobiotik včetně významné exprese izoform CYP klíčových pro metabolismus léčiv (CYP3A4, CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 aj.) (Martínez-Jiménez et al. 2007, Hewitt et al. 2007). Kromě samotné exprese těchto enzymů je důležitá také jejich regulace, která probíhá podobným způsobem jako v původní jaterní tkáni. Zachovaná je i exprese transportních proteinů (Hewitt et al. 2007).

Variabilita fenotypu jednotlivých kultur, která je dána rozdíly mezi dárci, jakými jsou genotyp, věk, strava, životní styl nebo přítomnost patologických procesů, se výrazně projevuje i při expresi a aktivitě cytochromů a představuje určitou překážku pro standardizaci a reprodukovatelnost získávaných dat (Martínez-Jiménez et al. 2007). Z tohoto důvodu například Evropská léková agentura doporučuje vyřadit z prováděných experimentů buňky, které dostatečně nereagují na pozitivní kontrolu, a nahradit je buňkami jiného dárce (European Medicines Agency 2015).

Své fenotypové vlastnosti si ale primární hepatocyty mohou zachovat pouze relativně krátkou dobu. Již při izolaci jsou buňky vystaveny nepříznivým vlivům, které spouštějí zánětlivou odpověď a změny v buněčném cyklu – buňky přecházejí z fáze G0, v níž přetrvávají *in vivo*, do fáze G1. Tyto změny započínají proces dediferenciace, který se projevuje výrazným poklesem exprese genů spojených se specializovanými jaterními funkcemi, včetně genů pro biotransformační enzymy. Na úrovni mRNA lze tyto změny detekovat již po několika hodinách, nejvýraznější jsou pak po jednom až dvou dnech kultivace. Jako příklad je na Obr. 5 uveden pokles exprese CYP3A4 v průběhu kultivace. Z důvodu poklesu exprese a aktivity klíčových enzymů je patrné, že primární hepatocyty nelze používat jako model pro dlouhodobější experimenty (Fraczek et al. 2013).

Dediferenciace hepatocytů je nežádoucí, a proto jsou vyvíjeny postupy, kterými by bylo možné tento jev potlačit. Jednou z možností je přidání látek, které podporují diferenciaci buněk, do kultivačního média. Mezi takové látky patří například dexametazon, který je využíván k zachování odpovědi buněk na induktory CYP. Protože ale sám ovlivňuje expresi některých biotransformačních enzymů, je potřeba jej užívat rozvážně a při zkoumání enzymové indukce mít na paměti možnost případné interference s testovanými látkami. Pro podporu metabolické

aktivity mohou být použity také některé induktory, jako např. fenobarbital. Mezi další látky zabraňující dediferenciaci patří inzulin, dimethylsulfoxid (DMSO) nebo nikotinamid. Některé používané látky sice mohou v určitých aspektech podporovat požadované vlastnosti kultivovaných hepatocytů, působí však negativně na udržení exprese a aktivity biotransformačních enzymů, což je při studiu indukčního potenciálu nežádoucí. To platí kupříkladu pro epidermální růstový faktor nebo fetální bovinní sérum (Fraczek et al. 2013).



Obr. 5 Pokles exprese CYP3A4 v průběhu kultivace lidských primárních hepatocytů

Převzato z: Martínez-Jiménez et al. (2007), přeloženo.

Pokročilejší možností podpory hepatocytárního fenotypu je úprava kultivačního uspořádání. Standardem pro kultivaci hepatocytů v preklinickém výzkumu léčiv je v současné době 2D uspořádání. Buňky jsou nasazeny do plastových nádob, jejichž povrch je potažen vrstvou extracelulární matrix (nejběžněji kolagen). Zde pak hepatocyty vytvářejí monovrstvu. Taková kultivace je prakticky snadno proveditelná a nákladově efektivní, je ale spojena s významnou dediferenciací buněk, jak bylo popsáno výše (Zeilinger et al. 2016, Godoy et al. 2013). Kultivace v monovrstvě navíc nutí buňky uzpůsobit svůj cytoskelet tomuto 2D uspořádání, které je vzdálené od podmínek v živém organismu. Dochází k omezení vzájemného kontaktu buněk a k omezení jejich interakce s extracelulární matrix. Buňky tak postupně ztrácejí svou polaritu (za normálních okolností lze rozlišit apikální a bazolaterální části) a omezují tvorbu žlučových kapilár. Aby se *in vitro* modely více přiblížily trojrozměrnému uspořádání jaterních buněk v živém organismu, byly vyvinuty metody kultivace buněk ve 3D uspořádání, v nichž mají buňky předpoklad udržet si svůj diferenciovaný fenotyp po delší dobu (Godoy et al. 2013).

Jakýsi mezistupeň mezi 2D a 3D uspořádáním představuje tzv. sandwichová kultura. Hepatocyty jsou kultivovány mezi dvěma vrstvami extracelulární matrix, čímž jsou omezeny cytoskeletální změny a zploštění buněk a zároveň je ve větší míře zachována jejich polarita a tvorba sítě žlučových kapilár (Godoy et al. 2013). Polarita buněk také umožňuje správnou lokalizaci transportních proteinů, jejichž exprese je v tomto uspořádání zachována, a proto se kromě jiného jedná o vhodný model pro hodnocení hepatobiliárního transportu léčiv (Yang et al. 2016). Exprese biotransformačních enzymů stejně jako její regulace je v tomto uspořádání také zachována a model je vhodný pro studium enzymové indukce (Lauschke et al. 2016, Yang et al. 2016). S časem však exprese hepatocytárně specifických genů klesá a ani v tomto uspořádání není možné vyhnout se buněčně dediferenciaci – lze ji takto pouze zpomalit. Svůj fenotyp si buňky v sandwichových kulturách zachovávají po dobu přibližně 2 týdnů (Lauschke et al. 2016).

3D primární hepatocyty lze kultivovat ve formě buněčných agregátů – sféroidů. Tyto částice o velikosti 200 až 300 μm jsou nejčastěji generovány pomocí plat s povrchovou úpravou, která buňkám znemožňuje přilnutí a nutí je k agregaci – jedná se o tzv. ULA (ultralow attachment) plata. Dále je možné sféroidy generovat gravitací zprostředkovanou agregací pomocí metody visící kapky nebo vířením v bioreaktoru. Vznik trojrozměrné architektury pomáhá lépe napodobit vzájemnou interakci buněk stejně jako jejich interakci s extracelulární matrix, a umožňuje tak zachovat stabilní fenotyp hepatocytů po výrazně delší dobu (přibližně 5 týdnů). I zde je zachována polarita hepatocytů a tvorba žlučových kapilár (Lauschke et al. 2016, 2019).

Bell et al. (2017) zkoumali expresi farmakologicky důležitých genů u hepatocytárních sféroidů a zjistili, že exprese CYP3A4, CYP2D6, CYP2C8, CYP2C9, UGT1A1, GSTT1, exprese PXR a CAR i sledovaných transportérů je zachována a odpovídá míře exprese pozorované u příslušných čerstvě izolovaných hepatocytů. Tato zjištění jsou v souladu s dřívějšími experimenty Bell et al. (2016), kdy po dobu 5 týdnů kultivace sféroidů nebyly zjištěny významné rozdíly v aktivitě izoforem CYP3A4, CYP2D6 ani CYP1A2. Aktivita CYP2C8 během této doby ale postupně klesala, aktivita CYP2C9 se zvýšila. V souhrnu této studie autorský kolektiv popisuje specifické jaterní funkce jako stabilní v čase. Sféroidy lidských primárních hepatocytů odpovídajícím způsobem reagují na modelové induktory¹ na úrovni

¹ Mezi modelové induktory obecně používané při studiu enzymové indukce patří například rifampicin (aktivátor PXR, typický induktor CYP3A), fenobarbital (aktivátor CAR, typický induktor CYP2B) nebo 3-methylcholanthren (aktivátor AhR, typický induktor CYP1A1/2) (Williamson et al. 2011).

mRNA i enzymové aktivity, a představují tak vhodný *in vitro* model pro studium indukčního potenciálu léčiv (Xia et al. 2016).

Další ze strategií 3D uspořádání se zakládá na snaze věrohodněji napodobit podmínky přítomné v živém organismu, kde je extracelulární matrix (složená z lamininu, kolagenu, elastinu a dalších glykoproteinů a proteoglykanů) důležitým faktorem pro růst, diferenciaci a polarizaci hepatocytů (Calitz et al. 2018). Tyto podmínky lze imitovat použitím různých typů biokompatibilních hydrogelů (kolagen, polyethylenglykol) či tzv. „lešení“ (anglicky scaffolds; chitin, chitosan, želatina, polymléčná nebo polyglykolová kyselina), pomocí nichž lze vytvořit umělou trojrozměrnou extracelulární matrix a v ní buňky kultivovat (Bachmann et al. 2015, Calitz et al. 2018).

Stále většího významu nabývá kultivace hepatocytů v dynamickém 3D uspořádání. Jedná se o perfuzní systémy, jejichž cílem je lepší imitace *in vivo* prostředí, než je tomu u statických modelů (Zeilinger et al. 2016). První pokusy o vytvoření takového systému daly vzniknout větším bioreaktorům, pro jejichž používání bylo zapotřebí velké množství buněk i finančních prostředků, což znemožnilo jejich rutinní využití ve výzkumu a při vývoji léčiv. Proto následovala snaha o miniaturizaci těchto zařízení (Bachmann et al. 2015). V současné době jsou dostupné již i velmi malé bioreaktory, v nichž si jsou lidské primární hepatocyty schopny zachovat svůj fenotyp, a to včetně exprese biotransformačních enzymů, a jedná se tedy o vhodný model pro farmakologické studie (Zeilinger et al. 2016).

Játra jsou kromě hepatocytů tvořena též dalšími typy buněk, mezi které patří endotelové, Kupfferovy nebo Itovy buňky (Zeilinger et al. 2016). Interakce hepatocytů s těmito buňkami přispívá k podpoře životaschopnosti, funkčnosti a udržení fenotypu hepatocytů – proto byly vyvinuty modely (ve 2D i 3D uspořádání), kde jsou hepatocyty a tyto další buněčné typy jaterní tkáně kultivovány společně (Zeilinger et al. 2016, Ahmed et al. 2017).

3.2.2 Buněčné linie odvozené od nádorové tkáně

Lidské primární hepatocyty představují zlatý standard pro studium metabolismu léčiv a enzymové indukce. Mají však své limity, které spočívají v jejich nedostatečné dostupnosti, fenotypové nestabilitě, neschopnosti proliferovat v laboratorních podmínkách a v rozdílech daných interindividuální variabilitou jednotlivých dárců. Z tohoto důvodu byly s použitím různých strategií vytvořeny mnohé buněčné modely s cílem pokusit se tyto limity překonat (Zeilinger et al. 2016, Donato et al. 2013).

Jednou z těchto strategií bylo vytvoření buněčných linií odvozených od lidských nádorově změněných jaterních buněk. Buňky těchto linií oproti primárním hepatocytům disponují výhodami, jakými jsou lepší dostupnost, snadné zacházení, téměř neomezená životnost a stabilní fenotyp. Tento fenotyp ovšem neodpovídá fenotypu zdravé jaterní buňky a vyznačuje se velmi omezenou expresí klíčových biotransformačních enzymů (Donato et al. 2008).

HepG2

Nejběžněji používanou jaterní buněčnou linií je HepG2² (Donato et al. 2008, 2013). Tyto buňky disponují některými specifickými jaterními funkcemi, jako je například exprese enzymů 2. fáze biotransformace, která je s výjimkou UGT relativně vysoká (Westerink a Schoonen 2007). Exprese CYP je nicméně s výjimkou izofomy CYP1A1 velmi nízká (Donato et al. 2008, 2013). Srovnání míry exprese jednotlivých izoforem CYP u lidských primárních hepatocytů (2D) a buněčné linie HepG2 je uvedeno v Tab. 2.

Tab. 2 Srovnání míry exprese klíčových izoforem CYP u lidských primárních hepatocytů a linie HepG2

	1A1	1A2	2A6	2B6	2C9	2C19	2D6	2E1	3A4	3A5
Hepatocyty	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
HepG2	6,99	0,03	0,25	0,50	0,01	0,05	1,57	0,04	0,03	1,16

Tabulka uvádí relativní hodnoty exprese (mRNA) jednotlivých izoforem CYP u linie HepG2 vyjádřené v procentech a vztahené k expresi těchto izoforem u lidských primárních hepatocytů.

Modifikováno dle: Donato et al. (2008).

Snížená je také exprese mnoha specifických jaterních transkripčních faktorů, označovaných zkratkou LETFs (liver enriched transcription factors), které se vyskytují v játrech a zajišťují tkáňově specifickou regulaci. Kooperace těchto transkripčních faktorů je esenciální

² Buněčná linie HepG2 je v různých oblastech výzkumu používána již desítky let a už od roku 1979, kdy tato linie vznikla, je doprovázena chybnými informacemi o svém původu. Jednotlivé zdroje buňky HepG2 klasifikují buď jako linii odvozenou z buněk hepatocelulárního karcinomu (častěji), nebo z buněk hepatoblastomu. Při analýze odborné literatury publikované od roku 1979 do března roku 2009 bylo při zmínce o buňkách HepG2 nalezeno více než 7 000 označení hepatokarcinom či hepatom, zatímco označení hepatoblastom bylo nalezeno méně než 500. Tyto dva rozdílné typy nádorového onemocnění nemusí být vždy snadné rozlišit, zvláště pak u starších dětí, což je ostatně i případ linie HepG2, která byla získána po rozsáhlé jaterní lobektomii 15letého chlapce. Histopatologický i genetický rozbor a analýza signálních drah nicméně potvrzují, že linie HepG2 je odvozena od buněk hepatoblastomu, nikoliv hepatocelulárního karcinomu (López-Terrada et al. 2009).

pro zachování specifických jaterních funkcí. Fenotyp HepG2 buněk determinuje nejen snížená exprese LETFs, ale také epigenetické změny (Donato et al. 2013).

Inducibilita podrodin CYP3A a CYP2C je u buněk HepG2 omezená, pravděpodobně v souvislosti s nízkou expresí PXR a CAR. Indukční odpověď je naopak zachována u izoformy CYP1A2, která je regulována receptorem AhR (aryl hydrocarbon receptor, receptor pro aromatické uhlovodíky), jenž je v této buněčné linii exprimován významně (Berger et al. 2016).

Ke kompenzaci nedostatečné exprese CYP byly vyvinuty postupy zahrnující transfekci virových vektorů obsahujících geny pro požadované enzymy. Pomocí vektoru lze u buněk zvýšit expresi CYP přechodně nebo trvale (Gómez-Lechón et al. 2017). Obdobně lze kompenzovat nízkou expresi specifických transkripčních faktorů (Donato et al. 2013).

V souhrnu buněčná linie HepG2 nepředstavuje adekvátní ekvivalent lidských primárních hepatocytů a obecně není považována za vhodný model pro studium lékových interakcí (Donato et al. 2013). Využití nicméně může nalézt například při úzce zaměřeném zkoumání indukce CYP1A nebo enzymů 2. fáze biotransformace (Westerink a Schoonen 2007, Donato et al. 2013).

Huh7

Další buněčnou linií jsou buňky s označením Huh7. Tyto buňky exprimují pouze minimální množství biotransformačních enzymů. Choi et al. (2009) na základě stanovení mRNA zjistili, že míra exprese izoform CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4 i CYP3A5 představuje méně než 1 % exprese těchto enzymů u lidských primárních hepatocytů. Výjimku představuje, podobně jako tomu je u linie HepG2, izoforma CYP1A1, jejíž exprese je v porovnání s primárními hepatocyty přibližně 25%. Nízká je i míra exprese PXR a dalších nukleárních receptorů.

Bulutoglu et al. (2019) v souladu s výše uvedeným dokázali, že buňky Huh7 nereagují statisticky signifikantně na působení rifampicinu, typického induktoru PXR (sledovány byly změny exprese izoform CYP3A4, CYP2C9, CYP2C19 a CYP1A2). Zároveň však pozorovali výrazné zvýšení exprese PXR i CYP3A4, pokud byly buňky vystaveny dinaciclibu. Tyto exponované buňky také následně vykazovaly odpověď k indukci rifampicinem (CYP3A4, CYP2C9, CYP2C19 a CYP1A2). Dinaciclíb je látka inhibující signální dráhy několika cyklin-dependentních kináz, včetně CDK2, která fosforylací PXR snižuje jeho schopnost vázat ligandy. Je-li tato kináza inhibována, může dojít k aktivaci PXR a k transkripci příslušných

genů.³ Na základě svých zjištění považují zmínění autoři linii Huh7 po předchozí expozici dinaciclibu za vhodnou alternativu lidských primárních hepatocytů při studiu enzymové indukce pomocí PXR. Výzkumníci nicméně nesledovali, zda po působení dinaciclibu došlo i ke změnám v expresi CAR, který se na regulaci některých genů podílí společně s PXR.

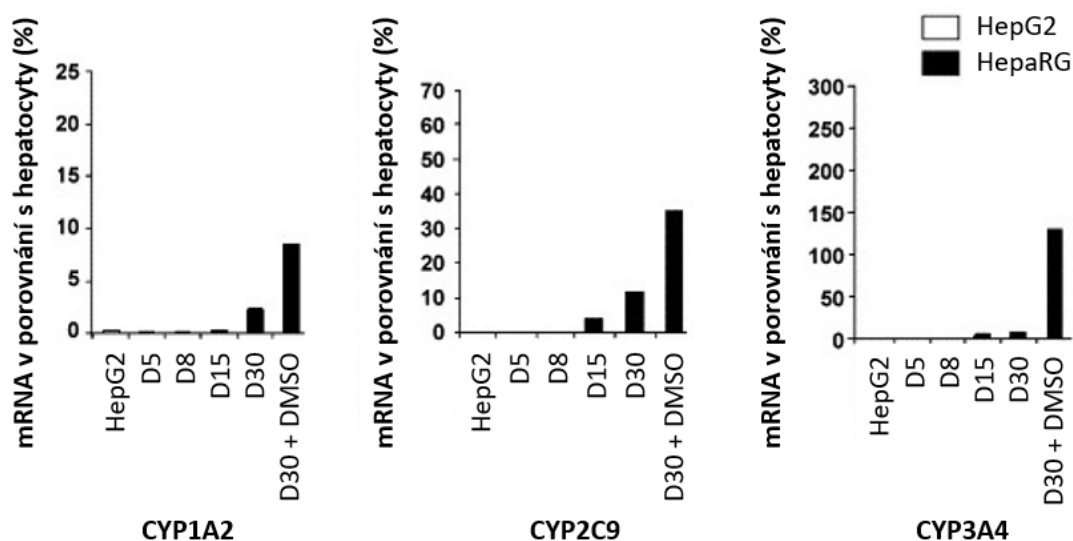
HepaRG

Za cenný *in vitro* model pro studium enzymové indukce je považována linie HepaRG. Jedná se o bipotentní progenitorové buňky schopné diferenciaci v tzv. hepatocytům a cholangiocytům podobné (anglicky hepatocyte-like a cholangiocyte-like) buňky, které spolu následně vytvářejí kokulturu (Jackson et al. 2016, Vlach et al. 2019). K získání těchto diferenciovaných buněk je nutné patřičným způsobem kultivovat progenitorové buňky po dobu přibližně 4 týdnů. Během prvních 8 až 10 dní kultivace buňky proliferují, přičemž jejich proliferační aktivita následně klesá a po 14 dnech se již většina buněk diferenciuje v jeden z výše uvedených buněčných typů. Rozvoj specifických jaterních funkcí hepatocytům podobných buněk je podpořen přidáváním dimethylsulfoxidu do kultivačního média během dalších 14 dnů kultivace – expozice DMSO zásadním způsobem zvyšuje například expresi CYP1A1, CYP1A2, CYP2B6, CYP2E1 nebo CYP3A4, jak je znázorněno na Obr. 6 (Vlach et al. 2019). Nutnost přibližně měsíční kultivace pro získání diferenciovaných buněk představuje určitou nevýhodu, a proto jsou v současnosti komerčně dostupné již i kryoprezervované diferenciované buňky (Jackson et al. 2016).

Získané hepatocytům podobné buňky exprimují biotransformační enzymy a transportéry v mnohem větší míře, než je tomu u ostatních linií odvozených od nádorové tkáně, a tato exprese je mnohem více srovnatelná s lidskými primárními hepatocyty. Exprimovány jsou izoformy CYP1A1, CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2E1 i CYP3A4 (Guillouzo et al. 2007, Ferreira et al. 2014), konjuguační enzymy UGT1A1, GSTA1 či GSTA4 (Hart et al. 2010) nebo transportní proteiny MRP2, MRP3 a P-glykoprotein (Guillouzo et al. 2007). Exprimovány jsou také xenosenzory PXR, CAR i AhR. Po expozici modelovým induktorem byla pozorována indukce u izoform CYP1A1, CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19 a CYP3A4. Linie HepaRG poskytuje podobnou odpověď na typické enzymové induktory, jakou lze pozorovat u lidských primárních hepatocytů, a představuje

³ Inhibice CDK2 je pravděpodobně jen částečným vysvětlením pozorovaných změn u linie Huh7. Například posttranskripční umlčení CDK2 pomocí siRNA se u těchto buněk projevilo pouze malým nárůstem exprese CYP3A4. Je tedy pravděpodobné, že změny v genové expresi po expozici dinaciclibu jsou výsledkem inhibice i dalších signálních drah buněčného cyklu, nikoliv pouze dráhy CDK2 (Bulutoglu et al. 2019).

jejich adekvátní alternativu v rozličných oblastech preklinického výzkumu (Hart et al. 2010, Ferreira et al. 2014).



Obr. 6 Míra exprese izoformem CYP1A2, CYP2C9 a CYP3A4 u linie HepaRG v závislosti na přítomnosti DMSO v kultivačním médiu

Pro vyhodnocení míry exprese byla stanovena mRNA u buněk HepaRG v průběhu kultivace (dny 5 až 30) a v závislosti na tom, zda tyto buňky byly od 15. dne kultivace exponovány 2% DMSO (D30 + DMSO), či nikoliv (D30). Uvedené hodnoty představují procentuální míru exprese vztáženou k hodnotám tří rozdílných populací čerstvě izolovaných lidských primárních hepatocytů, které určují 100 %. Pro srovnání jsou dále uvedeny i stanovené hodnoty mRNA u linie HepG2.

Modifikováno dle: Guillouzo et al. (2007), přeloženo.

3.2.3 Další typy buněk pro studium enzymové indukce

Hepatocyty odvozené od kmenových buněk

Kmenové buňky jsou schopny neomezeně se dělit a diferenciovat v prakticky libovolný buněčný typ lidského těla. Hepatocytům podobné buňky získávané pomocí současných diferenciačních protokolů však připomínají více fetální než plně maturované hepatocyty. Hladina exprese CYP je nízká ve srovnání s lidskými primárními hepatocyty a může se u jednotlivých získaných buněk lišit v závislosti na použitých postupech (Donato a Tolosa 2019). Plně funkční nejsou ani signální dráhy nukleárních receptorů, a omezená je tedy i schopnost enzymové indukce (Hannoun et al. 2016). Zlepšení diferenciačních postupů je předmětem vědeckého bádání s cílem připravit plnohodnotnou alternativu primárních hepatocytů (Donato a Tolosa 2019).

Imortalizované hepatocyty

Další strategií při snaze překonat nevýhody primárních hepatocytů bylo vytvoření tzv. imortalizovaných hepatocytů, tedy buněk se zachovalou schopností neomezeného dělení odvozených od primárních hepatocytů. Toho je možné dosáhnout metodami genetického inženýrství, a to nejčastěji použitím virových onkogenů, genu pro lidskou telomerázovou reverzní transkriptázu (human telomerase reverse transcriptase, hTERT) nebo kombinací obou postupů. Z hlediska studia enzymové indukce je v literatuře nejčastěji skloňovaným zástupcem skupiny imortalizovaných hepatocytů buněčná linie Fa2N-4. Tyto buňky sice zpočátku reagují na modelové induktory CYP, se zvyšujícím se počtem pasáží ale tuto schopnost ztrácejí (Ramboer et al. 2014).

Expresí PXR je srovnatelná s primárními hepatocyty, exprese CAR je ovšem výrazně nižší – to představuje riziko nesprávného určení (podhodnocení) indukčního potenciálu látek, jež aktivují CAR. Kromě CAR je snížena též exprese některých biotransformačních enzymů, včetně CYP2D6, CYP1A1, CYP1A2, CYP2E1, UGT1A1, UGT1A6, stejně jako transportérů zajišťujících uptake, mj. OATP1B1, OATP1B3 nebo OCT1. Zmíněné nedostatky jsou limitem pro používání linie Fa2N-4 jako prediktivního modelu při zkoumání enzymové indukce a lze konstatovat, že tato linie má pouze doplňkovou roli k lidským primárním hepatocytům (Hariparsad et al. 2008).

Upcyte hepatocyty

Relativně novou možností pro studium enzymové indukce je využití tzv. upcyte (z anglického upregulated hepatocytes) hepatocytů. Jedná se o buňky odvozené od lidských primárních hepatocytů, které jsou vložením vhodných genů upraveny tak, aby byly schopny proliferovat (Burkard et al. 2012). Jejich životní cyklus je ale omezen a nevyznačují se fenotypem imortalizovaných buněk (Tolosa et al. 2016). Indukovanou proliferací lze s výhodou využít pro přípravu miliard buněk z původní populace hepatocytů konkrétního dárce a jejich následnou kryoprezervaci je možné překonat problém s dostupností primárních buněk (Burkard et al. 2012, Tolosa et al. 2016). Buňky získané touto technologií poskytovaly na úrovni mRNA odpověď na expozici rifampicinu, fenobarbitalu a omeprazolu (izoformy CYP1A2, CYP2B6 a CYP3A4), avšak u izoformy CYP2B6 nebylo po expozici fenobarbitalu pozorováno statisticky významné zvýšení aktivity. Z tohoto důvodu došlo k optimalizaci a byla vyvinuta upcyte technologie druhé generace (Burkard et al. 2012, Ramachandran et al. 2015).

Tolosa et al. (2016) porovnávali upcyte hepatocyty odvozené optimalizovanou technologií s linií HepG2 a lidskými primárními hepatocyty. Zjistili, že upcyte hepatocyty exprimují klíčové izoformy CYP2B6, CYP2C9, CYP3A4, CYP2A6 či CYP2C19 ve větší míře, než je tomu u buněk HepG2 (exprese je však stále relativně nižší než u primárních hepatocytů). Exprese izoformy CYP1A2 byla nízká (podobná expresi u linie HepG2). Aktivita biotransformačních enzymů byla rovněž obecně vyšší než u buněk HepG2. Aktivita izoform CYP2A6, CYP2B6 a CYP3A4 byla v experimentech podobná jako u primárních hepatocytů, aktivita CYP2D6 a CYP2C9 byla nižší. Aktivita CYP1A2 a CYP2C19 nebyla měřitelná. PXR i CAR byly exprimovány významně ve srovnání s lidskými primárními hepatocyty. Upcyte hepatocyty reagovaly na modelové enzymové induktory srovnatelně jako primární hepatocyty. Indukce byla po expozici rifampicinu i fenobarbitalu pozorována u izoform CYP2B6 a CYP3A4, a to na úrovni mRNA a aktivity; u izoformy CYP2C9 byla oproti kontrole (neexponované upcyte hepatocyty) indukční odpověď méně výrazná. Autoři práce proto upcyte hepatocyty vyhodnotili jako zajímavý model pro studium enzymové indukce, který činí primární buňky různých dárců dostupnými pro rutinní experimenty, a to s fenotypem, který lidským primárním hepatocytům odpovídá lépe, než je tomu u linie HepG2.

3.2.4 *In vitro-in vivo* extrapolace

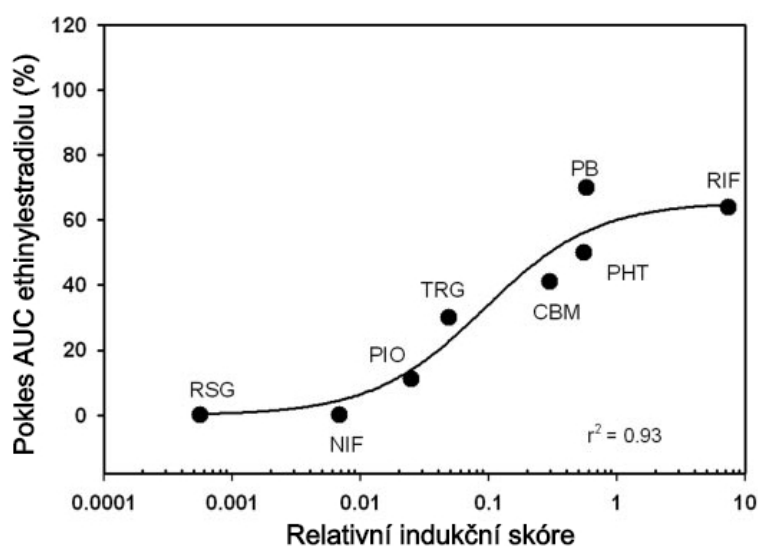
Data získaná s využitím jaterních *in vitro* modelů slouží jako podklad pro predikci indukčního potenciálu zkoumaných látek *in vivo*. Tato extrapolace dat umožňuje stanovit míru rizika lékových interakcí u nově vyvíjených léčiv a představuje důležitou součást preklinického testování. Existuje několik základních přístupů, pomocí nichž lze data extrapolovat. Ty se zakládají na srovnávání zkoumané látky se známými enzymovými induktory, na matematických výpočtech nebo na softwarovém modelování a simulacích (Fahmi a Ripp 2010).

Přístup založený na srovnání testované látky se známými induktory se provede například pomocí relativního indukčního skóre (relative induction score, RIS). Jeho výpočet vyžaduje znalost E_{max} (kolikrát maximálně daná látka indukovala CYP3A u hepatocytů), EC_{50} (koncentrace látky, při níž došlo k polovině maximální indukce) a I_u (koncentrace volné frakce induktoru při maximální koncentraci v plazmě dosažené po podání standardní terapeutické dávky). RIS je z těchto parametrů nejprve vypočítán dle Rov. 1 pro sadu známých induktorů (dle doporučení EMA nejméně u osmi látek v rámci celé šíře indukčního potenciálu včetně alespoň dvou slabých induktorů). Jednotlivé hodnoty RIS pro modelové induktory jsou dány do vztahu s hodnotami procentuálního poklesu AUC (plocha pod křivkou) současně

podávaného enzymatického substrátu (midazolamu nebo ethinylestradiolu pro CYP3A). Pokles AUC substrátu je měřen *in vivo* pro jednotlivé induktory v rámci klinických studií. Takto vznikne kalibrační křivka, pomocí níž je možné predikovat riziko lékových interakcí u kandidátního léčiva na základě jeho individuálního RIS (Ripp et al. 2006, Fahmi a Ripp 2010, European Medicines Agency 2015). Příklad korelace hodnot RIS a procentuálního poklesu AUC enzymatického substrátu (ethinylestradiolu) je znázorněn na Obr. 7.

$$RIS = (E_{max} \times I_u) / (EC_{50} + I_u) \quad \text{Rov. 1}$$

Na obdobném principu jako relativní indukční skóre je založen postup, který sleduje podíl AUC induktoru *in vivo* a F_2 (koncentrace testované látky, která způsobí dvojnásobnou indukci CYP3A4 na úrovni mRNA). Rovněž v tomto případě následuje vztažení hodnot AUC / F_2 k hodnotám procentuálního poklesu AUC současně podávaného substrátu a vytvoření kalibrační křivky. Podobně lze využít též podíl C_{max} (maximální koncentrace induktoru v plazmě) a EC_{50} nebo podíl AUC induktoru a EC_{50} (Kanebratt a Andersson 2008, Fahmi a Ripp 2010).



Obr. 7 Vztah mezi RIS a vlivem modelových induktorů na AUC současně podávaného substrátu CYP3A ethinylestradiolu

Zkratky: CBM – karbamazepin, NIF – nifedipin, PB – fenobarbital, PHT – fenytoin, PIO – pioglitazon, RIF – rifampicin, RSG – rosiglitazon, TRG – troglitazon

Modifikováno dle: Ripp et al. (2006), přeloženo.

Dalším přístupem při *in vitro-in vivo* extrapolaci je matematická predikce. Příkladem je kombinovaný (též net effect) model. Ten lze využít pro predikci lékových interakcí u látek, jež jsou zároveň induktory i inhibitory CYP3A4, a u nichž tedy není snadné předvídat, který

z efektů bude *in vivo* převládat. K extrapolaci dat lze využít také farmakokinetické modelování a simulace *in silico*, které mohou zahrnout širší paletu vstupních parametrů a které jsou kontinuálně vylepšovány tak, aby byly schopny rizika lékových interakcí předpovídat s co nejvyšší mírou spolehlivosti (Fahmi a Ripp 2010).

Tab. 3 Přehled vlastností jednotlivých buněčných modelů v porovnání s lidskými primárními hepatocyty

Buněčný model	Expresa xenosenzorů	Expresa biotransformačních enzymů a transportérů	Inducibilita biotransformačních enzymů
HepG2	zachována u AhR; nízká u PXR a CAR	zachována u enzymů 2. fáze (kromě UGT) a u CYP1A1; expresa ostatních izoform CYP nízká	zachována u CYP1A2; omezená u CYP3A a CYP2C
Huh7	nízká	zachována u CYP1A1; expresa ostatních izoform CYP nízká	po expozici rifampicinu bez statisticky signifikantní reakce (izoformy CYP3A4, CYP2C9, CYP2C19 a CYP1A2)
HepaRG (diferenciované)	zachována u PXR, CAR i AhR	zachována (CYP1A1, CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2E1 i CYP3A4 a dále UGT1A1, GSTA1, GSTA4, MRP2, MRP3 a P-glykoprotein)	srovnatelná (CYP1A1, CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19 a CYP3A4)
Hepatocytům podobné buňky (získané z kmenových buněk)	signální dráhy nukleárních receptorů nejsou zcela funkční	nízká	omezená
Fa2N-4	zachována u PXR; nízká u CAR	snížená u CYP2D6, CYP1A1, CYP1A2, CYP2E1 a dále u UGT1A1, UGT1A6, OATP1B1, OATP1B3 nebo OCT1	CYP1A2, CYP2C9, CYP3A4 zpočátku inducibilní; se zvyšujícím se počtem pasáží ale reakce na induktory slábne
Upcyte hepatocyty (2. generace)	zachována u PXR i CAR	nižší (CYP2B6, CYP2C9, CYP3A4, CYP2A6 a CYP2C19), avšak vyšší než u HepG2; nízká u CYP1A2	inducibilní CYP2B6 a CYP3A4; méně výrazná indukce CYP2C9

Vytvořeno s využitím informací: Guillouzo et al. (2007), Westerink a Schoonen (2007), Donato et al. (2008), Hariparsad et al. (2008), Choi et al. (2009), Hart et al. (2010), Donato et al. (2013), Ferreira et al. (2014), Ramboer et al. (2014), Berger et al. (2016), Hannoun et al. (2016), Tolosa et al. (2016), Bulutoglu et al. (2019), Donato a Tolosa (2019).

3.3 Zvířecí modely

Kromě buněčných modelů se pro studium enzymové indukce používají také zvířecí modely (nejčastěji potkan, myš nebo králík) (Jaiswal et al. 2014). Evropská léková agentura ve svých doporučeních pro studium lékových interakcí připouští, že mohou být data získaná s využitím laboratorních zvířat v určitých případech relevantní, zároveň ale konstatuje, že přímá extrapolace těchto dat na lidský organismus je v důsledku mezidruhových rozdílů obtížná. Z tohoto důvodu EMA obecně doporučuje provádět farmakokinetické studie lékových interakcí pouze u lidí (European Medicines Agency 2015).

Mezidruhové rozdíly zahrnují odlišnosti v zastoupení biotransformačních enzymů, v jejich substrátové specifitě, katalytické aktivitě a v míře exprese v jednotlivých tkáních (Jaiswal et al. 2014). Rozdíly se netýkají jen biotransformačních enzymů, ale také molekul zapojených do jejich regulace, včetně PXR. Rozdíly ve struktuře ligand vázající domény PXR vedou k různé afinitě ligandů – shoda sekvence této domény mezi člověkem a myší je kupříkladu pouhých 76 %. Dobře známým příkladem odlišného indukčního potenciálu jedné látky u modelového organismu a člověka je rifampicin. Ten indukuje jaterní enzymy prostřednictvím PXR u člověka, nikoliv však u laboratorně využívaných hlodavců (potkan, myš). Obráceně je tomu u pregnenolon-16 α -karbonitrilu (PCN), který indukuje enzymy u potkana a myši, ale ne u člověka (Mohutsky et al. 2010). Pro studium enzymové indukce tak platí, že neupravená laboratorní zvířata z výše uvedených důvodů nepředstavují vhodný model pro predikci indukčního potenciálu léčiv u lidí (Jaiswal et al. 2014), a za tímto účelem ani nejsou běžně používána (Sinz et al. 2008, Lu a Di 2020).

Výjimkou mohou být někteří primáti, například makak rhesus (*Macaca mulatta*) nebo makak jávský (*Macaca fascicularis*). Izoforma CYP3A64 makaka rhesus se například vyznačuje 93% homologií proteinové sekvence s lidskou izoformou CYP3A4 a 83% homologií s lidskou izoformou CYP3A5. Nukleotidová sekvence kódující ligand vázající doménu PXR makaka a člověka jsou si pak podobné z 96 %. Zmíněné druhy tedy díky anatomickým a fyziologickým podobnostem s člověkem mohou být *in vivo* modelem pro studium enzymové indukce (lepším než humanizované myši, viz další podkapitoly), avšak jejich využití k laboratorním účelům má své limity. Ty zahrnují omezenou dostupnost zvířat, vysoké náklady a především řadu etických otázek (Sinz et al. 2008, Jaiswal et al. 2014). Využívání lidem velmi blízkých primátů, například šimpanze, který je s genetickou odlišností menší než 2 % člověku nejbližším příbuzným zástupcem zvířecí říše (Jaiswal et al. 2014), není na území Evropské unie z etických důvodů přípustné – používání lidoopů k laboratorním účelům je zakázáno Směrnicí Evropského

parlamentu a Rady 2010/63/EU ze dne 22. září 2010 o ochraně zvířat používaných pro vědecké účely.

K překonání mezidruhových rozdílů v biotransformační kapacitě byly vyvinuty postupy, kterými je možné získat zvířecí modely s modifikovanými vlastnostmi. Takto upravená – humanizovaná⁴ – zvířata disponují částečně lidským fenotypem, a mají tedy předpoklad k tomu, aby napomohla zvýšit kvalitu preklinického testování nových léčiv. Principiálně lze metody humanizace rozdělit do dvou hlavních skupin – jedná se o genetickou modifikaci zvířete (genetická humanizace) a o transplantaci lidských buněk do zvířecího příjemce (chimérická humanizace). Nejběžněji humanizovaným zvířetem je myš, která má vhodné předpoklady ke genové manipulaci a která s člověkem sdílí mnohé podobné fyziologické a patofyziologické rysy. Méně často je pak humanizován potkan (Jaiswal et al. 2014, Scheer a Wilson 2016).

Takto upravená zvířata představují pomyslný most mezi *in vitro* testováním indukčního potenciálu, které probíhá ve zjednodušených a statických podmínkách, a hodnocením enzymové indukce po podání léčiva člověku. Využití těchto zvířecích modelů, které oproti *in vitro* experimentům disponují dynamičností a komplexností organismu, může být výhodné například v situacích, kdy je nutné rozhodnout, zda má testovaná látka potřebný potenciál k postupu do dalších fází vývoje. Používání humanizovaných myší při studiu lékových interakcí vzniklých na podkladě enzymové indukce v důsledku aktivace PXR (nebo CAR) je tak dnes často využívanou metodou (Jaiswal et al. 2014, Scheer a Wilson 2016).

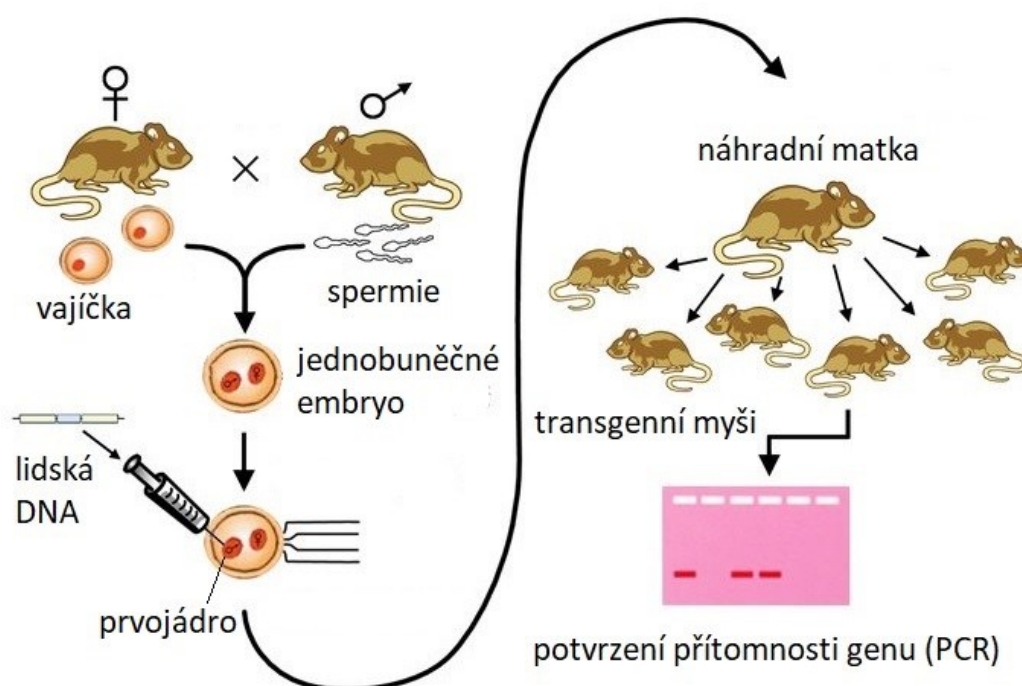
Konkrétní myší model by měl být vybírán vždy pro každý jednotlivý experiment zvlášť, a to po pečlivém zvážení faktorů, jakými jsou například předpokládané metabolické cesty léčiva, počet zapojených biotransformačních enzymů, případný vliv metabolizace mimo játra apod. (Scheer a Wilson 2016).

3.3.1 Myši humanizované metodami genetického inženýrství

V současné době existuje celá řada myších modelů, které vznikly metodami genetického inženýrství. Lidská DNA může být do myšího genomu začleněna několika možnými způsoby.

⁴ Jednotliví autoři se ve svých pracích rozcházejí, co se týče terminologie. Scheer a Wilson (2016) chápou termín humanizace jako nadřazený pojem, který zahrnuje jak genové manipulace, tak transplantace lidských buněk. Fujiwara (2018) oproti tomu definuje humanizované zvíře jako takové, do něž byly vloženy lidské buňky či tkáň, a pojem humanizace tedy vyčleňuje pouze pro druhou ze zmíněných metod. Bissig et al. (2018) pak pojmem humanizovaná myš primárně označují myš nesoucí lidský gen, u níž bylo zároveň dosaženo nepřítomnosti odpovídajícího myšího genu – myši, které tuto podmínku nespĺňují, jsou označeny jako transgenní, nehumanizované. Pro účely této práce byla použita terminologie dle Scheera a Wilsona (2016).

Široce využívanou metodou je mikroinjekce DNA do prvojader myších jednobuněčných embryí, která jsou následně přenesena do vejcovodů náhradních matek. Ty poté rodí mláďata, která jsou nositeli požadovaného lidského genu, což může být ověřeno např. pomocí PCR (Kumar et al. 2009). Uvedený postup je schematicky znázorněn na Obr. 8. Tyto transgenní myši mohou být kříženy s jedinci, u nichž byl naopak odpovídající myší gen odstraněn (tzv. knockoutované myši). Tímto křížením vznikají humanizované myši, u nichž nehrozí překryv exprese lidské a myší varianty genu. Kromě tohoto postupu je dále možné provést inzerci lidské DNA do myšího embrya přesně zacílenou náhradou myšího genu lidským orthologem (tzv. knock-in) (Jaiswal et al. 2014).



Obr. 8 Vznik transgenních myši

Na obrázku je znázorněna mikroinjekce lidské DNA do myších jednobuněčných embryí, která jsou následně přenesena do náhradní matky. Ta poté rodí mláďata, která ve své DNA obsahují požadovaný lidský gen, což je možné ověřit např. pomocí PCR.

Modifikováno dle: Elias et al. (2003), přeloženo.

Vědci mají možnost používat humanizované myší modely exprimující lidské biotransformační enzymy (CYP1A1/1A2, CYP2C9, CYP2C18/2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4, CYP3A7 nebo některé UGT), transportní proteiny (např. P-glykoprotein) i lidské xenosenzory (PXR, CAR i AhR). Dostupné jsou také modely, které exprimují několik lidských proteinů současně (PXR/CAR, CYP2D6/CYP3A4, PXR/CYP3A4, PXR/CAR/CYP3A4/3A7) (Scheer a Wilson 2016, Yamasaki et al. 2018). Henderson et al. (2019) dokonce v nedávné době vytvořili model,

u kterého bylo dosaženo nepřítomnosti 33 myších genů kódujících biotransformační enzymy (skupiny *Cyp1a*, *Cyp2c*, *Cyp2d* a *Cyp3a*). Ty byly nahrazeny geny pro hlavní lidské izoformy podílející se na biotransformaci – CYP1A1, CYP1A2, CYP2C9, CYP2D6, CYP3A4 a CYP3A7. Odstraněny a nahrazeny byly i geny pro PXR a CAR. Tento zvířecí model autoři považují za slibný nástroj k předvídání lékových interakcí v rámci preklinického vývoje.

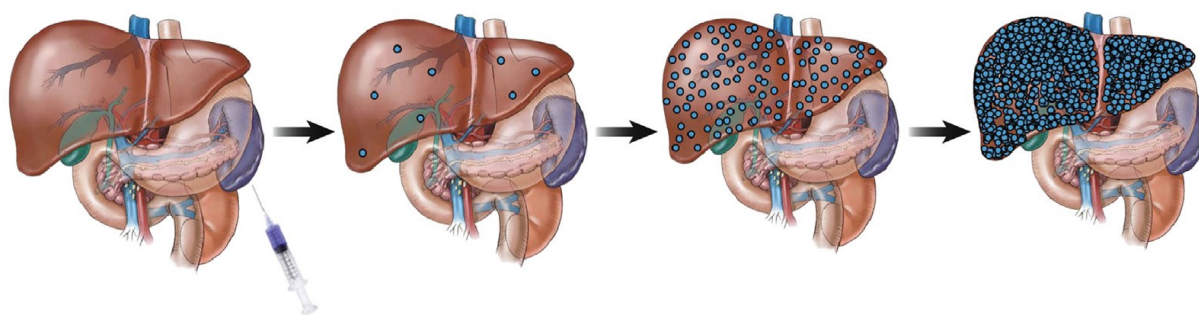
Výhodou myší humanizovaných metodami genetického inženýrství je skutečnost, že jakmile je dosaženo požadovaného fenotypu, jeho udržení není nikterak náročné. Chov zvířat je snadný, relativně levný a poskytuje jedince s nízkou interindividuální variabilitou. Zároveň je u těchto myší zachována schopnost exprimovat vložené geny i extrahepatálně, což má při studiu metabolismu léčiv svůj význam, zvláště pak u léčiv, která se mimo játra metabolizují vyšší měrou. Výhodou je také možnost využití negativních kontrol, tj. knockoutovaných myší, které se od modelového zvířete liší pouze nepřítomností sledovaného genu. Takto je možné snáze určit, zda daný gen hraje ve studované problematice roli, či nikoliv. U knockoutovaných myší je ale nutné počítat s možností zvýšeného zapojení alternativních metabolických cest, které mohou kompenzovat danou genetickou modifikaci. Pozorováno bylo například zvýšení míry exprese myších enzymů podrodiny CYP2C u *Cyp3a*-knockoutovaného modelu (Scheer a Wilson 2016).

Nevýhodou genetiky humanizovaných myší je jejich nekomplexnost, která vyplývá z možnosti ovlivnit pouze omezené množství genů. Mezidruhové odlišnosti v biotransformační kapacitě tak mohou zkreslit interpretaci dat i u humanizovaných modelů. Rozdíly se mohou projevit také při regulaci exprese vložených genů. Tyto geny mohou být v humanizované myši regulovány druhově specifickými faktory (které prozatím nemusíme znát nebo které nemusíme být schopni ovlivnit), jež mohou vést k lékovým interakcím pozorovaným u myšího modelu, nikoliv však u člověka a obráceně (Bissig et al. 2018).

3.3.2 Myši humanizované transplantací lidských hepatocytů

Myš, do níž mají být transplantovány lidské hepatocyty, musí splňovat dvě podmínky. Její imunitní systém musí být značně oslaben, aby nedošlo k odmítnutí transplantovaných buněk. Dále musí být tato myš geneticky upravena tak, aby byly její vlastní jaterní buňky poškozovány. Myší játra tak následně mohou být osídlena lidskými hepatocyty, čímž je umožněna syntéza lidských biotransformačních enzymů v myším organismu (Peltz 2013).

Samotná transplantace je prováděna injekcí lidských hepatocytů do sleziny či portálního řečiště zvířete, odkud tyto buňky putují do jaterních sinusoid, v nichž jsou zachyceny (což je příčinou vzniku dočasné portální hypertenze a poruchy mikrocirkulace). Část hepatocytů je zničena fagocytujícími Kupfferovými buňkami, zbytek se pak dostává až do jaterního parenchymu (Weber et al. 2009). Integrace hepatocytů v játrech je umožněna díky destrukci původních myších hepatocytů, která v játrech také vyvolává regenerační stimuly, jež dávají lidským hepatocytům signál k proliferaci (Strom et al. 2010). Osídlení myších jater je schematicky znázorněno na Obr. 9.



Obr. 9 Osídlení myších jater lidskými hepatocyty

Na obrázku je schematicky znázorněna transplantace lidských hepatocytů do myšního modelu. Hepatocyty jsou injikovány do sleziny a míra osídlení myších jater následně stoupá s časem.

Modifikováno dle: Grompe a Strom (2013).

Myši s nefunkčním imunitním systémem, které jsou dnes používány pro chimérickou humanizaci, byly šlechtěny celou řadu let. Nejdříve byl publikován objev tzv. SCID myši (severe combined immunodeficiency mouse). Ta se vyznačuje nefunkčním genem *Prkdc*, jenž kóduje katalytickou podjednotku DNA-dependentní proteinkinázy (DNA-dependent protein kinase catalytic subunit, DNA-PKcs). V důsledku toho myš nedisponuje funkčními T- ani B-lymfocyty, a její imunitní systém tedy není schopen specifické imunitní odpovědi. Podobný fenotyp je přítomen také u myši s nefunkčním genem *Rag2* (recombination activating gene 2) (Lee et al. 2018). Zkřížením SCID myši s tzv. NOD myši (non-obese diabetic mouse) vznikla NOD/SCID myš, u níž je kromě nepřítomnosti funkčních T- a B-lymfocytů zároveň i nižší množství NK buněk a snížená produkce cytokinů. Zkřížením NOD/SCID myši s myší nesoucí mutaci v genu *Il2rg* (gen pro gamma řetězec receptoru pro interleukin-2, interleukin-2 receptor gamma chain) vznikla tzv. NOG myš, která postrádá zralé T- i B-lymfocyty, NK buňky a dále se vyznačuje nefunkčními makrofágy a sníženou funkcí dendritických buněk. Její imunita je tak poškozena ještě více, než je tomu u dříve zmíněných myši. Podobných vlastností bylo

dosaženo též zkřížením myši nesoucí mutaci genu *Il2rg* a myši s mutací v genu *Rag2* (Zhao et al. 2019).

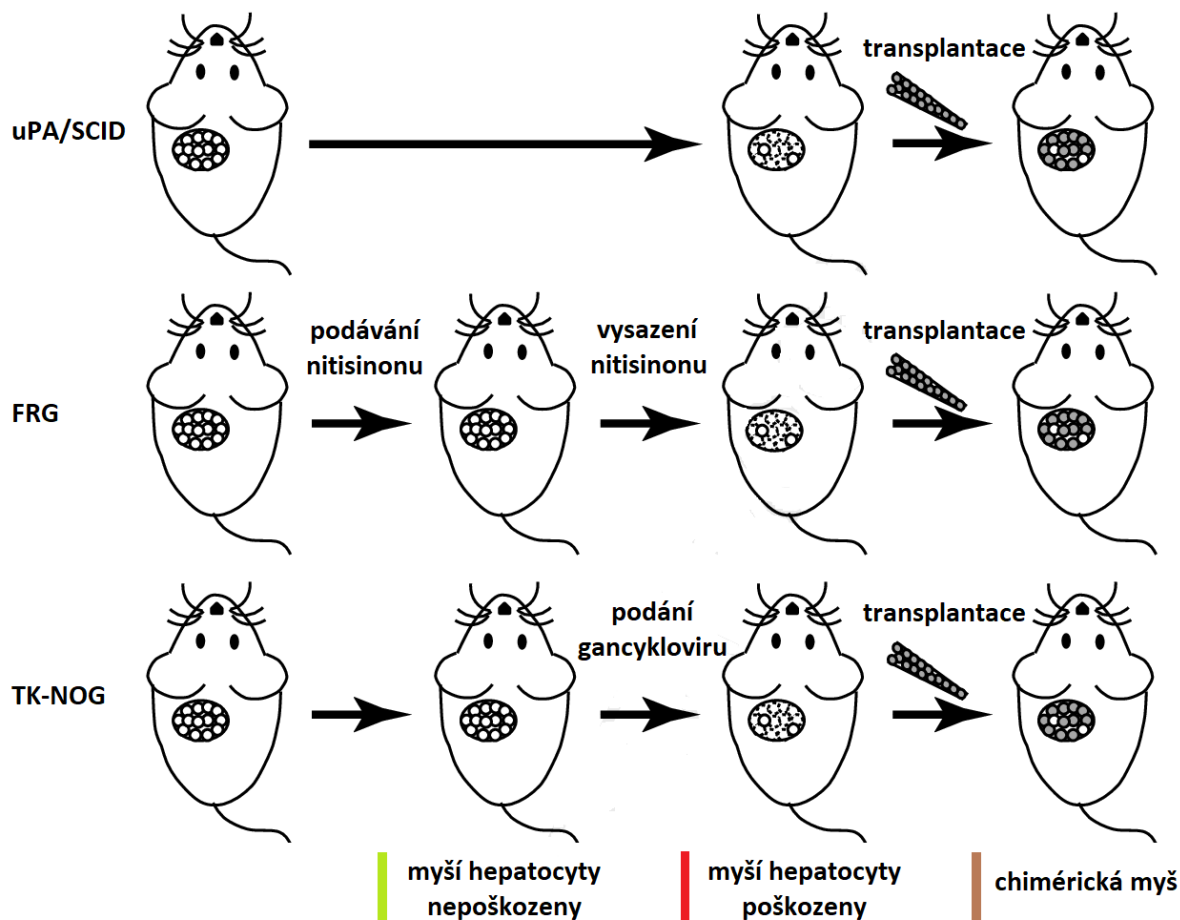
Prvním z dostupných modelů pro chimérickou humanizaci je SCID myš obsahující ve svém genomu transgenní konstrukt skládající se z albuminového promotoru a genu pro urokinázový aktivátor plazminogenu (urokinase-type plasminogen activator, uPA). Tento model je označován zkratkou uPA/SCID. V důsledku konstitutivní a tkáňově specifické exprese hepatoxického uPA dochází k destrukci myších hepatocytů. Tato destrukce je nekontrolovatelná a je příčinou selekčního tlaku, kdy mohou myši hepatocyty, které ztratily transgenní konstrukt, začít játra znovu osidlovat. Myši tohoto modelu mají obecně horší zdravotní stav (poškození ledvin a predispozice ke krvácení), což mj. znesnadňuje jejich chov. Další nevýhodou je fakt, že je u tohoto modelu vyřazena pouze specifická imunita, což může vyžadovat použití dalších látek za účelem inhibice NK buněk a/nebo komplementu, aby bylo zabezpečeno přežití transplantovaných lidských hepatocytů (Peltz 2013, Scheer a Wilson 2016).

Lidské hepatocyty lze transplantovat též do myšního modelu s kombinací nefunkčních genů *Il2rg* a *Rag2*, u kterého byl dále knockoutován gen pro fumarylacetoacetáthydrolázu (FAH), která katalyzuje závěrečný krok degradace tyrosinu. V důsledku toho dochází k hromadění toxického fumarylacetoacetátu, oxidativnímu poškození myších hepatocytů a ke smrti těchto buněk. Tento model lze v literatuře nalézt pod označením FRG. Nástup a míru jaterního poškození je u FRG myši možné kontrolovat, a to pomocí nitisinonu, který, je-li myši podáván, inhibuje degradaci tyrosinu v jednom z předcházejících degradačních kroků, a chrání tedy buňky před kumulací toxického fumarylacetoacetátu (Peltz 2013, Scheer a Wilson 2016). Tento zvířecí model nevyžaduje další zásahy do imunitního systému, neboť jeho genotyp zaručuje nedostatečnou funkci přirozené i specifické imunity. Zdravotní stav zvířat je lepší než u uPA/SCID myši, na druhé straně jsou ale FRG myši v důsledku nefunkčního genu pro FAH náchylné ke vzniku nádorů (Peltz 2013).

Dalším modelem využitelným pro diskutovaný typ humanizace je NOG myš, která v důsledku genetické modifikace exprimuje thymidinkinázu herpes simplex viru typu 1 (herpes simplex virus 1 thymidine kinase, HSVtk). Tento enzym katalyzuje přeměnu gancykloviru na jeho toxický metabolit, a je-li tedy myším gancyklovir podáván, hepatocyty, které HSVtk tkáňově specificky exprimují, jsou destruovány. Označení tohoto zvířecího modelu je TK-NOG (Peltz 2013, Scheer a Wilson 2016). Největší výhodou tohoto modelu je nepřítomnost dlouhodobého jaterního poškození a skutečnost, že je gancyklovir myším před provedením transplantace

podáván jen po velmi krátkou dobu. To pro lidské hepatocyty vytváří vhodnější podmínky k tomu, aby vytvořily adekvátní 3D strukturu a aby si uchovaly svou charakteristickou genovou expresi (Peltz 2013). Po osídlení myších jater lidskými buňkami mohou být navíc podávány další dávky gancykloviru, což může pomoci odstranit přeživší myší hepatocyty. Tím lze zajistit ještě lepší osídlení jater transplantovanými buňkami (Hasegawa et al. 2011).

Jednotlivé myší modely a postupy, jakými je dosaženo osídlení myších jater lidskými hepatocyty, jsou schematicky znázorněny na Obr. 10.



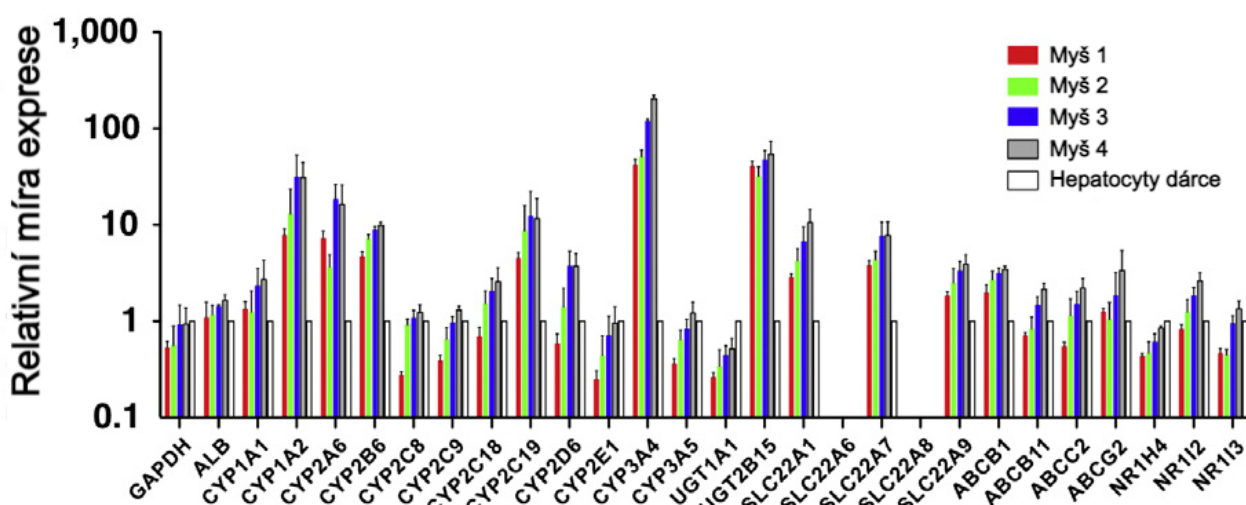
Obr. 10 Myší modely pro chimérickou humanizaci

Na obrázku je znázorněn postup, jakým je u jednotlivých modelů umožněno osídlení myších jater lidskými hepatocyty. Bílé kruhy představují nepoškozené/přeživší myší hepatocyty, šedé kruhy pak hepatocyty lidské.

Modifikováno dle: Scheer a Wilson (2016), přeloženo.

Transplantací lidských hepatocytů do uPA/SCID modelu může být na úrovni mRNA dosaženo v myším organismu podobné exprese lidských izoform CYP1A1, CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 a CYP3A4, jaká je přítomna v játrech dárce. Obdobná zjištění přineslo i zkoumání na úrovni množství proteinů a enzymové aktivity nejdůležitějších izoform

cytochromu P450 (Strom et al. 2010, Naritomi et al. 2018). U modelu FRG jsou k dispozici data o expresi izoforem CYP1A2 a CYP3A4, která je srovnatelná s expresí genů v lidském organismu (Strom et al. 2010). Již při prvním představení TK-NOG myši se Hasegawa et al. (2011) zabývali expresí biotransformačních enzymů (viz Obr. 11). Zjistili, že exprese CYP1A1, CYP2C8, CYP2C9, CYP2D6 a CYP2E1 je u sledovaných humanizovaných myši srovnatelná s korespondujícími lidskými hepatocyty. Míra exprese izoforem CYP1A2, CYP2B6, CYP2C19 a CYP3A4 byla u myši výrazně vyšší. Exprese PXR a CAR byla s hepatocyty srovnatelná.



Obr. 11 Srovnání míry exprese biotransformačních enzymů a dalších proteinů u TK-NOG humanizovaných myši a u hepatocytů lidského dárce

V uvedeném grafu je znázorněna míra exprese biotransformačních enzymů a dalších proteinů na úrovni mRNA. Exprese byla stanovena u vzorků jater ze čtyř různých humanizovaných myši TK-NOG a u původních hepatocytů dárce, vůči nimž je v grafu exprese relativně vyjádřena. Poznámka: NR1H2 – PXR, NR1H3 – CAR.

Modifikováno dle: Hasegawa et al. (2011), přeloženo.

Výhodou chiméricky humanizovaných myši je komplexnost, která vyplývá z transplantace celých lidských buněk (v porovnání s úpravou jednoho nebo několika genů u geneticky humanizovaných modelů). Tato skutečnost pomáhá korigovat mezidruhové rozdíly v biotransformační kapacitě způsobené molekulárními a metabolickými pochody specifickými pro myši organismus. Výhodná může být pro některé typy experimentů také široká paleta možných dárců (např. dárce se specifickým genotypem či onemocněním). Zajímavou možností je také použití hepatocytů jednoho dárce jak pro transplantaci, tak zároveň pro *in vitro* experimenty – taková kombinace může přispět k získání relevantnějších dat a k přesnější predikci klinických konsekvencí spojených s podáváním studovaného léčiva. Nevýhodami

chimérických myší jsou nutnost provést transplantaci u každé jedné myši zvlášť, vysoké náklady, variabilita v úspěšnosti osídlení myších jater lidskými hepatocyty nebo riziko interference přeživších myších hepatocytů (Scheer a Wilson 2016).

Skutečnost, že lidské hepatocyty v myších játrech proliferují, nabízí možnost tyto buňky z myšího organismu zpětně izolovat a využít pro *in vitro* experimenty. Zásadní výhodou takto získaných lidských hepatocytů je jejich lepší dostupnost v porovnání se získáváním hepatocytů od lidských dárců (pacientů). Zároveň mohou být hepatocyty izolované z humanizované myši použity k transplantaci dalšímu zvířeti. Izolované hepatocyty je rovněž možné kryoprezervovat (Grompe a Strom 2013).

3.4 Metody pro studium enzymové indukce zprostředkované PXR

Lékové interakce na podkladu enzymové indukce mohou vyústit v nežádoucí klinické důsledky, a proto je jejich hodnocení věnována pozornost již v počátečních fázích vývoje léčiv (Fahmi a Ripp 2010). Dle doporučení Evropské lékové agentury by měla být při vývoji nových léčiv vždy hodnocena indukce izoformem CYP3A4 a CYP2B6, a to jako marker indukce zprostředkované PXR/CAR, a indukce izoformy CYP1A2 jako marker indukce pomocí AhR (European Medicines Agency 2015).

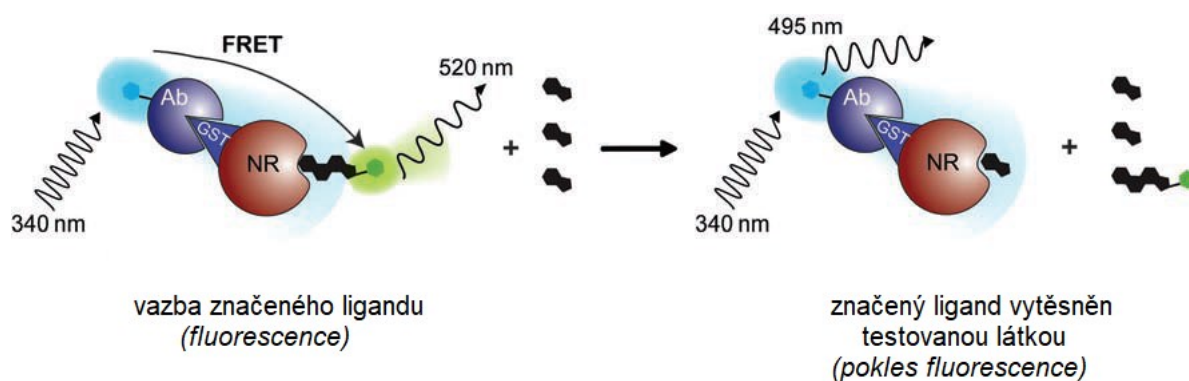
Jednodušší postupy používané v jiných oblastech výzkumu, jakými jsou například práce s mikrozomy nebo rekombinantními enzymy, neumožňují testování enzymové indukce, neboť studium změn genové exprese vyžaduje buněčný systém se schopností transkripce a translace. Omezené využití mají tkáňové řezy (Ferreira et al. 2014).

Nejjednodušší metodou pro studium enzymové indukce je metoda označovaná zkratkou SPA (scintillation proximity assay). Spočívá v určení schopnosti testované látky soutěžit o vazebné místo LBD PXR receptoru s radioaktivně značeným referenčním ligandem. Ten je na LBD vázán v blízkosti scintilačního materiálu, který v důsledku dopadajícího ionizujícího záření poskytuje fluorescenci. Je-li testovaná látka schopna vazby do LBD PXR, vytěsňuje značený ligand a intenzita detekované fluorescence poklesne (Mohutsky et al. 2010, Raucy a Lasker 2010). Schopnost vázat se na PXR ovšem nemusí nutně znamenat, že bude testovaná látka také schopna receptor aktivovat a zapříčinit enzymovou indukci. Metoda proto nachází využití zejména pro rychlý screening velkého množství potenciálních induktorů (Mohutsky et al. 2010).

Na obdobném principu funguje také tzv. TR-FRET metoda (time-resolved fluorescence resonance energy transfer). V tomto případě je využíváno fluoroforů – označena je jak protilátka, jež se specificky váže na nukleární receptor, tak také referenční ligand. Nachází-li se tyto dvě molekuly v bezprostřední blízkosti, dochází mezi jejich fluorofory k přenosu energie a k následné detekci fluorescence o specifické vlnové délce. Je-li referenční ligand vytěsňen testovanou látkou, fluorofory se od sebe vzdálí a intenzita fluorescenčního záření sledované vlnové délky poklesne (Shukla et al. 2009). Princip této metody je znázorněn na Obr. 12.

Fluorofory mohou být označeny také koregulátory PXR. Tímto způsobem je s použitím různých uspořádání možné testovat agonisty i antagonisty PXR receptoru. Jako příklad lze uvést označení některého z koaktivátorů – je-li v tomto případě navázán ligand do LBD, dojde

ke konformační změně PXR, čímž je umožněna vazba označeného koaktivátoru. Takto se fluorofor umístěný na koaktivátoru dostává do bezprostřední blízkosti fluoroforu umístěného na protilátce navázané na nukleárním receptoru, čímž je umožněn přenos energie a je detekován nárůst fluorescence (Lin a Chen 2018). Obě zmíněné metody využívající přenos energie mezi fluorofory jsou podobně jako SPA vhodné zejména pro screening velkého počtu potenciálních induktorů (Shukla et al. 2009, Lin a Chen 2018).



Obr. 12 Princip fungování metody TR-FRET s využitím fluoroforem značeného ligandu

Nachází-li se fluorofory v bezprostřední blízkosti, je detekována fluorescence (520 nm). Navázáním testované látky dochází k oddálení fluoroforů a k poklesu intenzity fluorescenčního záření (520 nm).

Modifikováno dle: Shukla et al. (2009), přeloženo.

Další metodou je hodnocení genové indukce v buňkách, do nichž byl metodami genetického inženýrství vložen reportérový gen, jehož promotorová oblast je regulována PXR (Mohutsky et al. 2010). Reportérový protein kódovaný vloženým DNA konstruktem by v dané buňce neměl být endogenně exprimován a měl by být schopen poskytovat rychlý a snadno detekovatelný signál. S výhodou je využíván například gen pro luciferázu, enzym katalyzující oxidaci D-luciferinu na oxyluciferin, při níž je produkováno světlo ve viditelné oblasti spektra. Intenzita světla pak koreluje s promotorovou aktivitou genu (Jiang et al. 2008). Tato metoda je taktéž určena zejména pro rychlý screening řady potenciálních induktorů (Martínez-Jiménez et al. 2007).

V souladu s informacemi uvedenými v Kap. 3.2 EMA při zkoumání enzymové indukce preferuje použití primárních lidských hepatocytů, zatímco data získaná experimenty s odvozenými buněčnými liniemi nebo s využitím reportérových konstruktů jsou považována pouze za doplňková. Z důvodu interindividuálních rozdílů je doporučeno hodnotit indukci pomocí hepatocytů od alespoň tří dárců. Inkubace by měla trvat 3 dny. Měla by zahrnovat pravidelnou výměnu média a znalost koncentrace léčiva v systému. Zároveň by měla být

potvrzena životaschopnost buněk, a to před inkubací a po inkubaci s nejvyšší koncentrací látky, aby byla vyloučena možnost ovlivnění experimentu buněčnou toxicitou. Není-li možné dosáhnout při *in vitro* experimentu požadovaných koncentrací léčiva, například z důvodu buněčné toxicity, lze přejít k testování *in vivo*. Experiment by měl být dle EMA vyhodnocen na základě stanovení mRNA (které bude z tohoto důvodu podrobně popsáno v Kap 3.5), případně též na základě stanovení enzymové aktivity, existuje-li podezření indukce v důsledku stabilizace proteinů, tj. nezávisle na aktivaci nukleárních receptorů⁵. Dle EMA je experiment vyhodnocen jako pozitivní, došlo-li na úrovni mRNA k nejméně 100% nárůstu oproti kontrolnímu vzorku. Je-li nárůst nižší, může být experiment vyhodnocen jako negativní pouze za předpokladu, že je nárůst zároveň nižší než 20 % ve srovnání s pozitivní kontrolou (rifampicin pro PXR). Pozitivní nebo neprůkazný výsledek *in vitro* experimentu je třeba potvrdit klinickou studií, negativní výsledek by měl být prokázán dalšími *in vitro* testy (European Medicines Agency 2015).

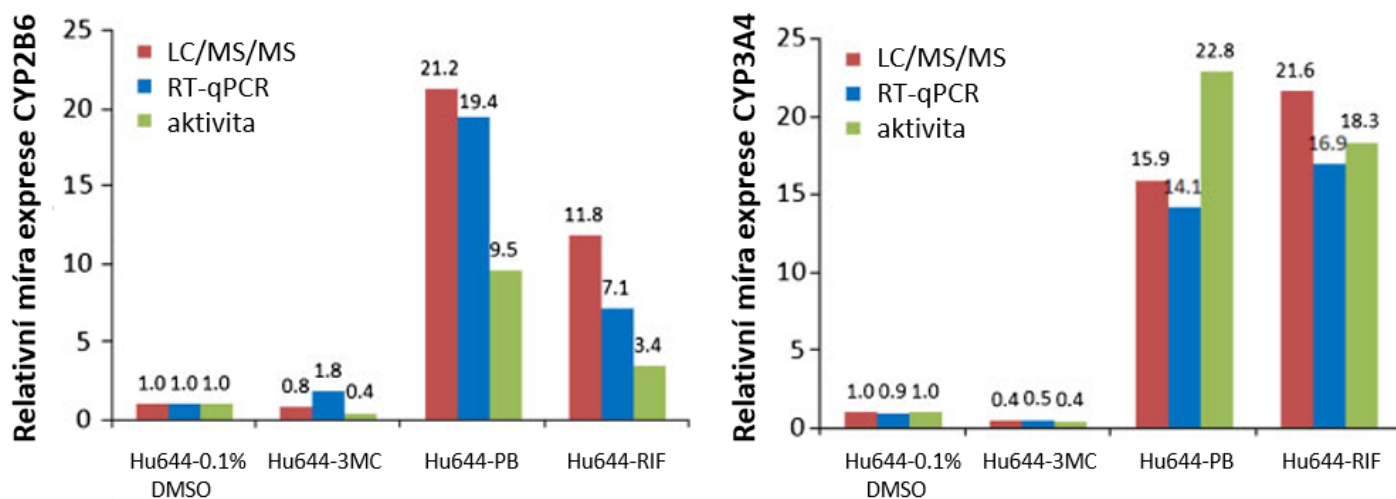
Po expozici potenciálním induktorům lze změny v enzymové aktivitě určit stanovením vznikajících metabolitů substrátů selektivně přeměňovaných sledovaným enzymem (Martínez-Jiménez et al. 2007, Mohutsky et al. 2010). K určení aktivity skupiny CYP3A je kupříkladu používán testosteron a jeho přeměna na 6β-hydroxytestosteron (Kandel et al. 2017).

Změny v expresi genů pro biotransformační enzymy je možné zhodnotit také na proteinové úrovni, a to s pomocí Western blotu (Williamson et al. 2011). Během této metody jsou proteiny nejdříve separovány dle velikosti pomocí gelové elektroforézy. Následně jsou přeneseny na membránu, která je poté inkubována s protilátkami, jež se specificky vážou na molekuly sledovaného proteinu – po detekci je tento protein viditelný jako pruh, jehož tloušťka odpovídá množství daného proteinu, což umožňuje relativní srovnání mezi vzorky (Mahmood a Yang 2012). Úskalí metody představuje příprava vzorku, normalizace, transfer proteinů, výběr protilátek, délka inkubace a detekce signálu (Taylor et al. 2013).

Pro kvantifikaci na úrovni proteinů byla vyvinuta také řada metod založených na hmotnostní spektrometrii. Williamson et al. (2011) například publikovali postup, který se zakládá na lýze exponovaných buněk, digesci mikrozomální frakce a na stanovení získaných peptidů specifických pro jednotlivé izoformy CYP. Toto stanovení bylo provedeno pomocí kapalinové

⁵ Aktivita jaterních enzymů může být v některých případech indukována též nezávisle na aktivaci nukleárních receptorů, tedy bez ovlivnění míry jejich transkripce. Isoforma CYP2E1 je kupříkladu indukována svými substráty (etanol, aceton aj.) a předpokládá se, že je tato indukce způsobena stabilizací mRNA a/nebo proteinu. Studován je v této souvislosti například vliv microRNA (miRNA). Přesný mechanismus této regulace však není zcela jasný (Mohri et al. 2010).

chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí a jako vnitřní standardy byly použity izotopicky značené syntetické peptidy. Uvedení autoři také exponovali lidské primární hepatocyty typickým induktorům a porovnali různé přístupy k vyhodnocení tohoto experimentu (jimi navržená metoda, změna na úrovni mRNA, změna na úrovni enzymové aktivity). Toto porovnání je znázorněno na Obr. 13.



Obr. 13 Porovnání různých přístupů k vyhodnocení *in vitro* experimentu

Lidské primární hepatocyty byly exponovány 3-methylcholanthrenu (3MC), fenobarbitalu (PB) a rifampicinu (RIF) a pomocí tří různých metod byla vyhodnocena enzymová indukce. Těmito metodami jsou: stanovení změn na úrovni proteinu (LC/MS/MS), na úrovni mRNA (RT-qPCR) a na úrovni enzymové aktivity.

Modifikováno dle: Williamson et al. (2011), přeloženo.

Při zkoumání indukčního potenciálu mohou být kromě výše zmíněných metod prováděny také analýzy *in silico*. Spolehlivě předpovědět schopnost dané látky vázat se na PXR je však vzhledem k flexibilitě vazebného místa tohoto receptoru obtížné. Molekulový docking, analýza vztahu chemické struktury a biologické aktivity, zapojení umělé inteligence a algoritmů strojového učení jsou nicméně oblasti, které procházejí kontinuálním vývojem, a do budoucna lze očekávat jejich ještě spolehlivější přispění k odhadu indukčního potenciálu léčiv v rané fázi jejich vývoje (Handa et al. 2015).

Jako konkrétní příklad strategie pro studium enzymové indukce CYP3A lze uvést postup aplikovaný ve společnosti AstraZeneca. Ten ve své práci popisují Jones et al. (2017). V počátečních fázích projektu je syntetizována řada látek, které jsou v rámci screeningu otestovány s využitím reportérových konstruktů. Tato data jsou následně doplněna experimenty s HepaRG buňkami. Získané výsledky jsou důležité při výběru kandidátů vhodných pro postup do klinické fáze hodnocení. Bylo-li kandidátní léčivo během experimentu s HepaRG linií

vyhodnoceno jako neindukující (A), je tato skutečnost potvrzena klinicky s využitím 4 β -hydroxycholesterolu, který je produktem endogenní přeměny cholesterolu pomocí CYP3A. Dochází-li k enzymatické indukci, zvýší se hladina tohoto selektivního biomarkeru v plazmě. Pokud nedojde ke zvýšení hladiny tohoto metabolitu, je nepřítomnost indukčního potenciálu daného léčiva dále potvrzena kultivací s lidskými primárními hepatocyty. Pokud byla při kultivaci s buňkami HepaRG pozorována indukce (B), je nejdříve s využitím 4 β -hydroxycholesterolu ověřena klinická relevance zjištěného *in vitro* indukčního potenciálu. Následně je testována interakce kandidátního léčiva a midazolamu, substrátu CYP3A. Midazolam je podáván subjektům premedikovným testovanou látkou a subjektům bez premedikace a jsou sledovány rozdíly ve farmakokinetice midazolamu mezi skupinami.

3.5 Polymerázová řetězová reakce

Expozice lidských primárních hepatocytů testované látce a následné stanovení změn exprese na úrovni mRNA je jedním ze základních postupů při studiu enzymové indukce. Tento postup ve svých doporučeních pro studium lékových interakcí preferuje i Evropská léková agentura (European Medicines Agency 2015). Zásadní a hojně využívanou metodou, která toto stanovení umožňuje, je kvantitativní polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction, PCR), již předchází proces reverzní transkripce (Jensen 2012). Pro porozumění způsobu, jakým je mRNA kvantifikována, bude dále popsán princip klasické PCR. Aktuální trend v metodice PCR reprezentuje digitální PCR, které bude věnována samostatná kapitola.

3.5.1 Princip polymerázové řetězové reakce

PCR je molekulárně biologická metoda, pomocí níž je možné exponenciálně zvýšit množství definovaného krátkého úseku DNA, který je původně ve vzorku obsažen buď v jediné molekule (Brunstein 2013). Tato metoda, za kterou její autor Kary B. Mullis získal v roce 1993 Nobelovu cenu, nachází široké uplatnění v rozličných oblastech přírodních věd a medicíny. PCR lze využít při detekci mutací, diagnostice onemocnění, určování patogenů, forenzní analýze nebo například při určování pohlaví ptáků, což jen dokládá šíři možných aplikací této metody (Garcia a Ma 2005, Morinha et al. 2012).

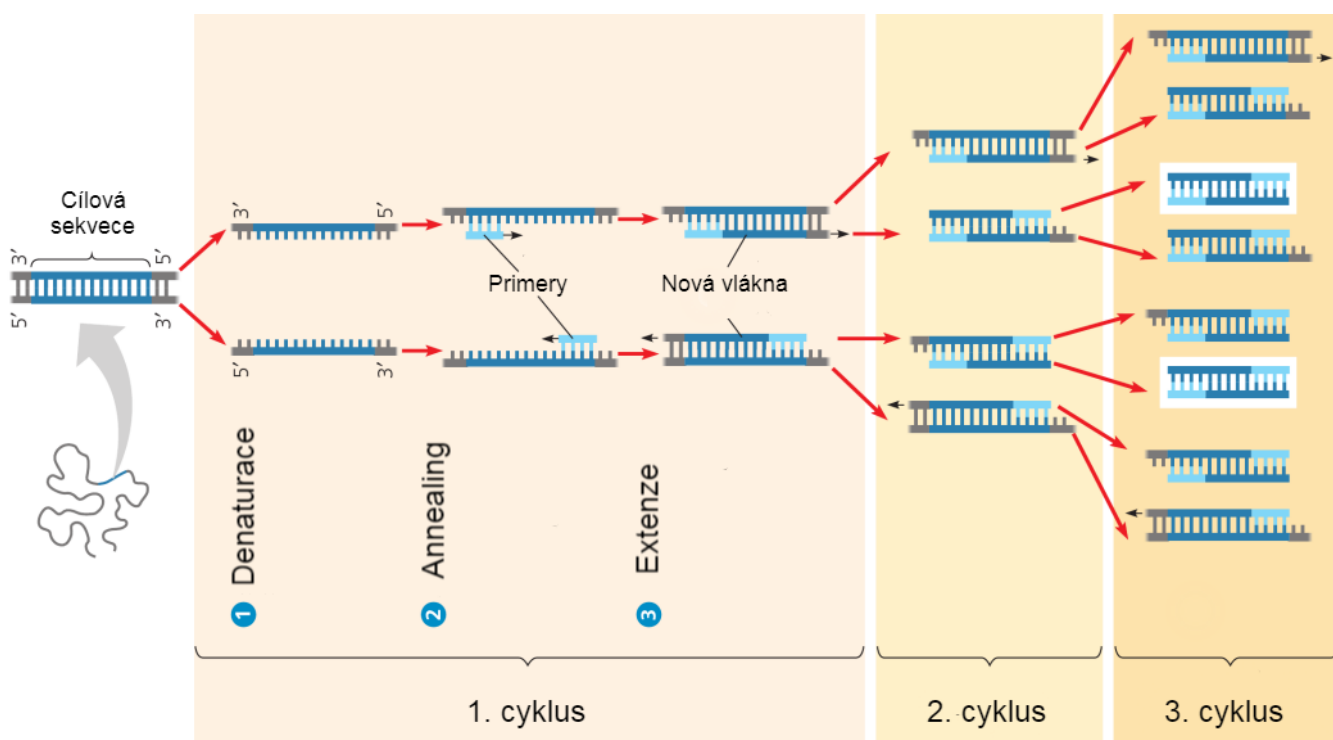
Svým principem PCR staví na obecných mechanismech zajišťujících buněčné dělení živých organismů, kdy dochází ke zdvojnásobení množství DNA, která je následně rovnoměrně rozdělena mezi dvě nově vznikající buňky (Waters a Shapter 2014). Zásadními komponentami PCR reakce jsou templátová DNA, obsahující cílovou nukleotidovou sekvenci; dva syntetické primery, specifické oligonukleotidy komplementární se začátkem a koncem cílové sekvence; deoxynukleosidtrifosfáty (dNTPs), směs deoxyadenosintrifosfátu (dATP), deoxythymidintrifosfátu (dTTP), deoxyguanosintrifosfátu (dGTP) a deoxycytidintrifosfátu (dCTP), které jsou stavebními jednotkami DNA; a DNA polymeráza, enzym zajišťující syntézu nově vznikajícího vlákna DNA. Protože je při PCR experimentech dosahováno vysokých teplot, jsou s výhodou využívány termostabilní DNA polymerázy – typicky tzv. *Taq* polymeráza izolovaná z mikroorganismu *Thermus aquaticus*. Ke správnému průběhu PCR je dále nutné zajistit vhodné reakční podmínky, což zahrnuje například optimální koncentraci iontů Mg^{2+} potřebných pro správnou funkci DNA polymerázy a optimální pH (Waters a Shapter 2014, Green a Sambrook 2019).

Samotný průběh polymerázové řetězové reakce se zakládá na cyklickém opakování tří základních kroků, kterými jsou denaturace, annealing a extenze (Brunstein 2013, Waters a Shapter 2014, Green a Sambrook 2019). Mikrozkuřavka obsahující výše zmíněné komponenty je umístěna do zařízení schopného automaticky měnit teplotu v závislosti na zadaném programu – do termocykléru (Brunstein 2013). Reakční směs je nejdříve zahřáta na teplotu přibližně 95 °C, což způsobí rozdělení původně dvouvláknové DNA na dvě samostatná vlákna (denaturace). Po několika málo desítkách sekund je teplota snížena (annealing) na hodnotu, při které primery nasedají na své komplementární sekvence na jednotlivých vláknech DNA (hybridizace) (Brunstein 2013, Waters a Shapter 2014, Green a Sambrook 2019). Optimální teplotu pro annealing je nutno určit pro každou reakci zvlášť – pokud by byla teplota příliš nízká, mohly by primery na DNA nasedat nespecificky a mohly by být amplifikovány nechtěné části DNA; pokud by byla naopak příliš vysoká, primery by nasedaly na templátovou DNA obtížně a efektivita reakce by byla nízká (Green a Sambrook 2019). Jelikož jsou primery v reakční směsi v nadbytku, je zajištěno, že nasednou na svá komplementární místa s mnohem vyšší pravděpodobností, než že dojde k opětovnému spojení obou řetězců templátové DNA (Brunstein 2013). Posledním krokem cyklu je opětovné zvýšení teploty na přibližně 72 °C, což umožní termostabilní DNA polymeráze na obou vláknech postupně prodlužovat 3'-konec primeru a vytvořit nové vlákno komplementární s templátem (extenze) (Brunstein 2013, Waters a Shapter 2014, Green a Sambrook 2019).

V prvních dvou cyklech DNA polymeráza prodlužuje nové vlákno i za sekvencí templátového vlákna, která je komplementární s místem, na něž na druhém vláknu nasedá další primer. Ve třetím a každém dalším cyklu jsou stále ve větší míře tvořeny specifické úseky DNA definované místy nasednutí primerů na templátové DNA (Green a Sambrook 2019). Množství těchto kopií se v průběhu PCR exponenciálně zvyšuje – denaturace, annealing a extenze jsou během experimentu standardně opakovány ve 25 až 35 cyklech, a cílová sekvence DNA je tedy v ideálním případě zmnožena 2^{25} až 2^{35} krát (Waters a Shapter 2014). Průběh PCR je schematicky znázorněn na Obr. 14.

K detekci produktů vzniklých při polymerázové řetězové reakci se tradičně využívá gelová elektroforéza, během níž jsou fragmenty DNA separovány v agarózovém gelu dle jejich velikosti (Garibyan a Avashia 2013). K produktu je přidáván ethidium bromid, fluorescenční barvivo schopné interkalovat mezi vlákna vzniklých fragmentů DNA, což po následném ozáření UV světlem umožňuje jejich zviditelnění (Garcia a Ma 2005). Současně se vzorkem je na gel nanesena pozitivní a negativní kontrola a fragmenty DNA o známých velikostech.

Metoda umožňuje kvalitativně vyhodnotit přítomnost a velikost vzniklých fragmentů. Toto vyhodnocení poskytuje informaci o tom, zda během PCR vznikl požadovaný produkt, a zda tedy ve zkoumaném vzorku DNA byla přítomna cílová nukleotidová sekvence (například zda vzorek obsahoval sekvenci charakteristickou pro určitý patogen) (Garibyan a Avashia 2013).



Obr. 14 Schematické znázornění průběhu PCR

Modifikováno dle: Giri (2020), přeloženo.

3.5.2 Kvantitativní polymerázová řetězová reakce

Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (quantitative polymerase chain reaction, qPCR), nebo též real-time PCR, je modifikací PCR, která oproti prostému vyhodnocení přítomnosti, či nepřítomnosti cílové sekvence ve vzorku DNA umožňuje také její kvantifikaci (Jensen 2012). Namísto vyhodnocení produktu až po skončení posledního cyklu reakce, jak bylo vysvětleno v předchozí kapitole, je při qPCR tvorba produktu sledována v reálném čase po každém jednom cyklu. K tomu jsou využívány fluorescenční látky, jež při interakci se vznikající DNA emitují záření, které je v průběhu reakce detekováno. Během počátečních cyklů je fluorescence slabá a prakticky neodlišitelná od pozadí. S postupně se zvyšujícím množstvím produktu se však zvyšuje i intenzita fluorescence – počet cyklů nutných k tomu, aby fluorescence překročila určenou prahovou hodnotu je označován jako C_q (quantification cycle)⁶. Čím je hodnota C_q

⁶ V literatuře se lze kromě označení C_q setkat též s označeními C_t (threshold cycle), C_p (crossing point) nebo TOP (take-off point) (Bustin et al. 2009).

vyšší, tím více cyklů muselo proběhnout k tomu, aby vzorek překročil prahovou hodnotu fluorescence, a tím nižší tedy bylo původní množství cílové DNA ve vzorku (Kubista et al. 2006, Jensen 2012).

Množství DNA obsahující cílovou sekvenci může být vyjádřeno relativně ve vztahu daného vzorku ke vzorku jinému nebo absolutně s využitím kalibrační křivky (Quan et al. 2018). Při relativním vyjádření lze vycházet z Rov. 2, v níž $[N_0]_A$ a $[N_0]_B$ představují původní počet molekul templátové DNA ve vzorcích A a B a Cq_A a Cq_B jsou příslušné Cq hodnoty vzorků (Kubista et al. 2006).

$$[N_0]_A / [N_0]_B = 2^{(Cq_B - Cq_A)} \quad \text{Rov. 2}$$

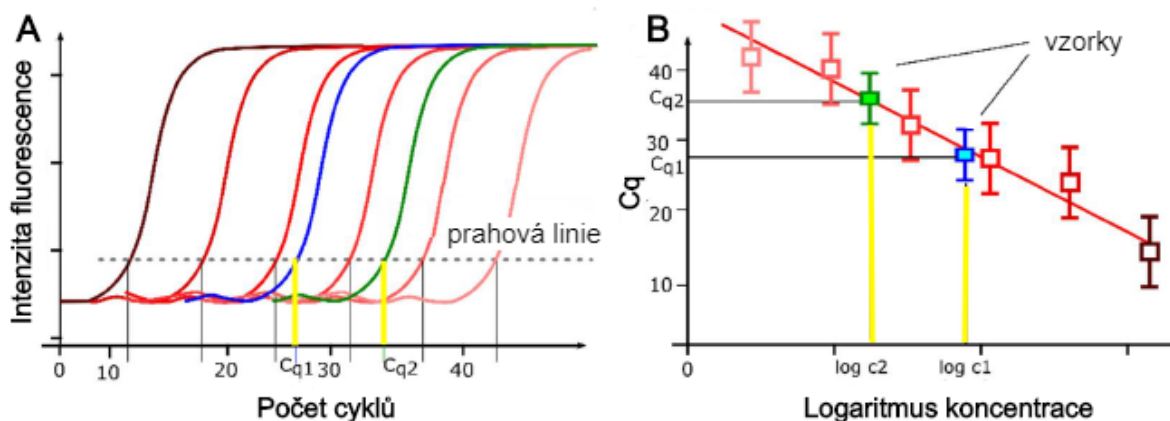
Toto vyjádření je platné pouze za předpokladu, že PCR probíhá se 100% efektivitou, tedy že se s každým cyklem množství PCR produktu zdvojnásobí. To ve většině případů není zcela reálné, a pro přesnější relativní kvantifikaci je tedy nutné provést stanovení efektivity daného PCR experimentu a Rov. 2 upravit. Místo čísla 2 se pro základ mocniny použije výraz $(1 + E)$, kde E značí efektivitu reakce. Například pro 90% efektivitu je takto získán tvar $(1 + 0,9)^{(Cq_B - Cq_A)}$ (Kubista et al. 2006, Quan et al. 2018).

Absolutní kvantifikaci lze provést s využitím série standardních vzorků se známým množstvím cílové DNA. Po amplifikaci každého standardu a stanovení jednotlivých hodnot Cq jsou tyto použity pro tvorbu kalibrační křivky, která vyjadřuje závislost hodnot Cq na logaritmicky vyjádřeném množství cílové DNA v jednotlivých standardních roztocích. Z kalibrační křivky je po určení Cq vzorku možné určit původní množství cílové DNA. Při tomto stanovení je nutné, aby amplifikace standardů i vzorku probíhaly se srovnatelnou efektivitou – rozdíly v efektivitě by měly významný vliv na přesnost kvantifikace (Quan et al. 2018). Pro ilustraci je postup při absolutní kvantifikaci znázorněn na Obr. 15.

Jak již bylo vysvětleno výše, využívá qPCR ke sledování množství vznikajícího produktu fluorescenční látky. Ty lze rozdělit do dvou hlavních skupin – jedná se o látky interkalující mezi dvě vlákna vznikající DNA (A) a o fluorofory navázané na oligonukleotidy (B).

(A) Mezi interkalační fluorescenční barviva patří například již zmíněný ethidium bromid nebo látky s obchodními názvy SYBR Green I či EvaGreen. Komplex DNA-barvivo je možné detekovat fluorescencí. Při využití interkalačních látek mohou být ale detekovány i nespecifické produkty nebo dimery primerů, a proto se pro ověření specifiity provádí analýza křivky tání produktu (anglicky melting curve analysis), viz Obr. 16. Při této analýze je vzorek vystaven

vysokým teplotám, přičemž při určité teplotě dochází k prudkému poklesu fluorescence v důsledku denaturace DNA a disociace barviva. PCR produkty s různou délkou a nukleotidovým složením denaturují při odlišných teplotách. Pokud je tedy detekováno více vrcholů reprezentujících pokles fluorescence, existuje též více současně detekovaných produktů ve vzorku (Navarro et al. 2015).



Obr. 15 Postup při absolutní kvantifikaci pomocí qPCR

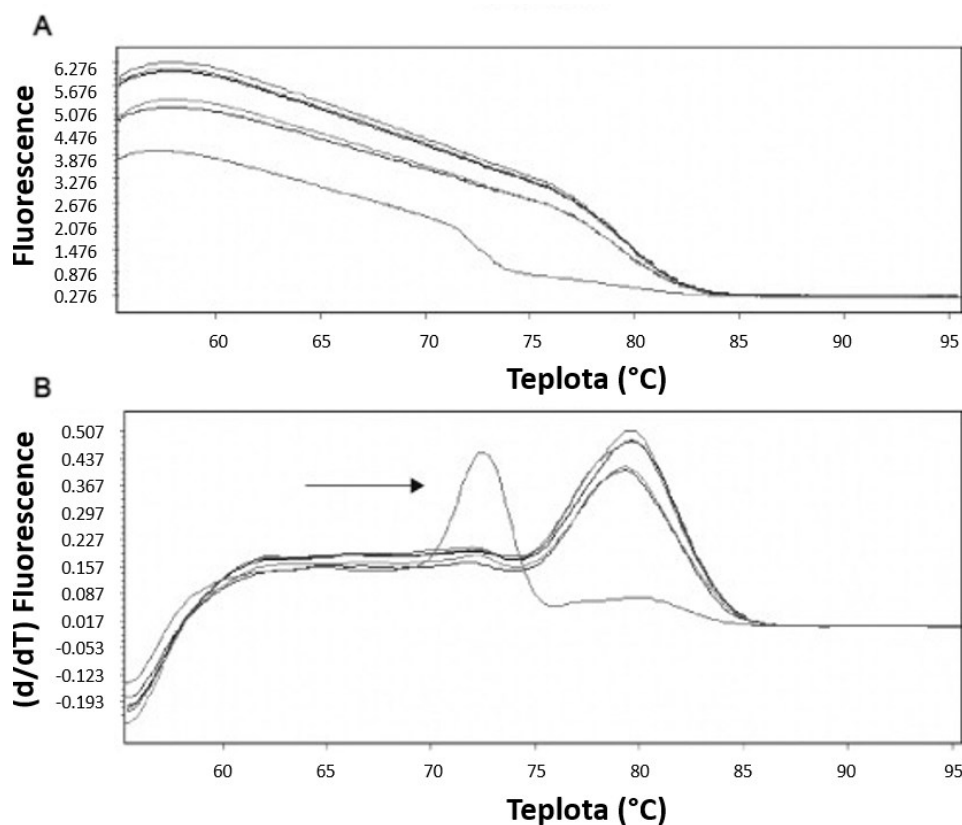
A – Amplifikační křivky série šesti standardních roztoků se známými koncentracemi sledovaného úseku DNA a dvou vzorků. Stanoveny jsou hodnoty C_q u jednotlivých standardů a následně také C_q hodnoty vzorků (svísle žluté linie).

B – C_q hodnoty standardních roztoků a jejich logaritmicky vyjádřené koncentrace jsou použity k sestavení kalibrační křivky. Se znalostí C_q hodnot vzorků je z kalibrační křivky možné určit koncentraci cílové DNA (svísle žluté linie).

Modifikováno dle: Quan et al. (2018), přeloženo.

(B) Skupinu fluorofory značených oligonukleotidů tvoří tzv. sondy, jež se vzájemně liší způsobem, jakým dochází ke tvorbě fluorescenčního signálu. Zástupcem této skupiny je například sonda TaqMan obsahující na 5'-konci tzv. donor (reporter), který je po ozáření světlem excitován a při návratu zpět do nižšího energetického stavu se zbavuje přebytečné energie ve formě fluorescence. Tato energie je mechanismem zvaným fluorescenční rezonanční přenos energie (fluorescence resonance energy transfer, FRET) předána akceptoru (quencher, tzv. zhášec) na 3'-konci oligonukleotidu. Akceptor v tomto případě již sám fluorescenci neemituje (přebytečné energie se zbavuje ve formě tepla). TaqMan je hydrolyzační sonda, která je navržena tak, aby se svým oligonukleotidovým řetězcem komplementárně vážala na sekvenci v amplifikovaném úseku, kde je při extenzi degradována díky exonukleázové aktivitě DNA polymerázy. Tímto způsobem dochází k oddělení donoru od akceptoru. Akceptor následně není schopen přijmout přebytečnou energii od donoru, a tato energie je vyzářena ve formě

fluorescence, která je detekována. Jiným příkladem jsou sondy FRET⁷, které jsou vždy tvořeny párem oligonukleotidů, jež jsou komplementární se sekvencemi, které se v cílovém úseku DNA vyskytují blízko sebe. První z řetězců na svém 3'-konci nese donor, druhý na svém 5'-konci nese akceptor. Jedná se o tzv. hybridizační sondy, které se při annealingu dostanou do těsné blízkosti, a nadbytečná energie donoru tak může být zachycena akceptorem, který je v tomto případě sám schopen fluorescence, jež je následně detekována (Navarro et al. 2015).



Obr. 16 Analýza křivek tání produktů

A – křivky tání, B – derivace křivek tání. Po paralelní amplifikaci pěti vzorků byla provedena analýza křivek tání PCR produktů. Vrchol (označený šipkou) při nižší než očekávané teplotě naznačuje přítomnost dimeru primerů nebo jiného nespecifického produktu.

Modifikováno dle: Farrell (2010), přeloženo.

3.5.3 Kvantitativní reverzně transkriptázová polymerázová řetězová reakce

Kvantitativní reverzně transkriptázová polymerázová řetězová reakce (RT-qPCR, též qRT-PCR) kombinuje qPCR s procesem reverzní transkripce. Umožňuje tak kvantifikovat RNA, díky čemuž představuje zásadní nástroj pro studium genové exprese (Sanders et al. 2014).

⁷ Zažité označování tohoto typu sondy zkratkou FRET není zcela přesné, neboť tato zkratka popisuje fluorescenční rezonanční přenos energie, tedy obecný děj, při němž dochází k přenosu energie mezi dvěma fluorofory a který není specifický pouze pro tento typ sondy (Bustin et al. 2009).

Aby mohlo být při studiu genové exprese stanoveno množství mRNA ve vzorku, je nutné, aby byla mRNA přepsána do komplementární DNA (cDNA), kterou je následně možné amplifikovat pomocí qPCR. Tato reverzní transkripce je při RT-qPCR experimentech zajišťována reverzními transkriptázami, které původně pocházejí z viru Moloneyho myší leukémie (Moloney murine leukemia virus, MMLV) nebo z viru ptačí myeloblastózy (avian myeloblastosis virus, AMV) (Kubista et al. 2006). Komerčně dostupné modifikované varianty těchto reverzních transkriptáz se mezi sebou liší svou velikostí, teplotním optimem a efektivitou (Kubista et al. 2006, Skrzypski 2008). Reverzní transkriptázy při RT-qPCR experimentech vykonávají funkci RNA-dependentní DNA polymerázy. Reverzní transkripce začíná nasednutím primeru na mRNA a pokračuje postupným připojováním nukleotidů dle RNA sekvence. Takto je vytvořeno první vlákno cDNA, které následně slouží jako templát pro PCR amplifikaci (Brunstein 2013).

Výběr primerů ovlivňuje výtěžek reverzní transkripce (Bustin et al. 2005) a zahrnuje několik možných strategií – použít lze primery nespecifické, oligo(dT) primery nebo primery specifické. Nespecifické primery jsou krátké řetězce různých sekvencí o délce nejčastěji šesti (hexamery) nebo devíti (nonamery) bází, které umožňují přepis celkové RNA, tedy i rRNA a tRNA. Jejich použití je vhodné například v případech, kdy je analyzován celý transkriptom. Oligo(dT) primery umožňují přepis molekul mRNA, neboť tyto molekuly obsahují komplementární poly(A) konec (Kubista et al. 2006, Skrzypski 2008). Reverzní transkripce je tak započata od 3'-konce mRNA (Kubista et al. 2006). Nachází-li se však cílová sekvence pro PCR příliš daleko nebo má-li mRNA výraznou sekundární strukturu, hrozí, že se reverzní transkriptáza odpojí dříve, než dosáhne cílové sekvence. To může vést k podhodnocení množství zkoumané mRNA. Specifické primery umožňují reverzní transkripci konkrétních úseků mRNA a jsou vhodné v případě, že je sledována exprese pouze několika málo genů – reverzní transkripce však musí být provedena odděleně pro každý gen, což je nevýhodou této strategie (Bustin et al. 2005, Skrzypski 2008).

Reverzní transkripce je klíčovým krokem, na němž závisí spolehlivost kvantifikace – množství vytvořené cDNA musí přesně odpovídat původnímu množství mRNA ve vzorku (Kubista et al. 2006). Tento krok tedy může přispívat ke zvýšení variability a zhoršení reprodukovatelnosti výsledků, které RT-qPCR experimenty provázejí. Dalšími problémy při porovnávání míry genové exprese u odlišných vzorků jsou rozdíly v množství biologického materiálu, z něž je RNA extrahována; nestabilita RNA; přítomnost inhibitorů reverzní transkripce nebo polymerázové řetězové reakce ve vzorku (např. hem skupina nebo lipidy) a již zmíněné rozdíly

v efektivitě reakcí. Z tohoto důvodu je při provádění RT-qPCR experimentů nutné aplikovat některou z normalizačních strategií, které umožňují rozdíly mezi jednotlivými vzorky zohlednit (Bustin et al. 2005, Huggett et al. 2005, Kubista et al. 2006).

Tyto strategie zahrnují normalizaci vůči celkovému množství RNA ve vzorku, vůči rRNA, vůči přidanému RNA standardu nebo vůči referenčním genům – právě normalizace vůči referenčním genům je v současné době při studiu genové exprese používána nejčastěji (Kubista et al. 2006). Jako referenční jsou vybírány ty geny, které jsou za daných experimentálních podmínek exprimovány konstantně (Riedel et al. 2014). Většinou se jedná o tzv. housekeeping geny, tedy geny zajišťující základní buněčné funkce (Tunbridge et al. 2011). Míra exprese běžně používaných referenčních genů se však odlišuje v závislosti na studovaném buněčném typu a na experimentálních podmínkách, a proto by měly být geny vždy pečlivě vybrány a jejich vhodnost pro daný experiment by měla být validována. Výběr nevhodných referenčních genů může vést k nesprávné interpretaci získaných dat a může výrazně ovlivnit výsledky studie (Ceelen et al. 2011). Často využívaným referenčním genem je například *GAPDH* (gen pro glycerinaldehyd-3-fosfátdehydrogenázu), a to i přesto, že jeho exprese není vždy zcela stálá (Sanders et al. 2014).

K dispozici je několik softwarových nástrojů (geNorm, BestKeeper, Normfinder), které na základě matematických algoritmů napomáhají výběru optimálních referenčních genů. Riedel et al. (2014) pomocí těchto nástrojů hodnotili stabilitu exprese různých referenčních genů u lidských primárních hepatocytů, buněk HepG2 a Huh7.5⁸. U primárních hepatocytů získaly nejlepší hodnocení geny *PSMB6* (gen pro $\beta 6$ podjednotku proteazomu), *CYC1* (gen pro cytochrom c1), *HDCC2* (gen pro HD domain containing protein 2) a *RPS18* (gen pro ribozomální protein S18); u buněk HepG2 a Huh7.5 pak geny *PSMB6*, *MDHI* (gen pro malátdehydrogenázu 1), *ACTB* (gen pro β -aktin) a *PPIA* (gen pro peptidylprolylizomerázu A). Ceelen et al. (2011) se zaměřili na buňky HepaRG, u nichž jako nejvhodnější určili gen *TBP* (gen pro TATA vazebný protein). Jako stabilní byly dále vyhodnoceny geny *UBC* (gen pro ubikvitin C) nebo *SDHA* (gen pro podjednotku A sukcinátdehydrogenázy).

Výsledky zkoumání genové exprese s využitím RT-qPCR mohou být vyjádřeny jako absolutní počet kopií sledované mRNA ve vzorku nebo jako relativní srovnání množství mRNA ve dvou odlišných vzorcích. Absolutní kvantifikace probíhá obdobným způsobem, jaký byl popsán v Kap. 3.5.2. Zapotřebí je tedy koncentrační řada roztoků se známým množstvím cDNA

⁸ Buněčná linie Huh7.5 je odvozena od buněk Huh7 a slouží jako *in vitro* model pro studium viru hepatitidy C, který se v těchto buňkách snadno replikuje. Stejně využití nachází i další podlinie Huh7.5.1 (Omura et al. 2019).

odvozené od sledované mRNA. Z kalibrační křivky je možné určit množství sledované mRNA ve vzorku. Protože je tento způsob poměrně experimentálně náročný, je jako výstup mnoha studií upřednostňována relativní kvantifikace. Běžně je mRNA exprese hodnocena pomocí tzv. $2^{-\Delta\Delta Cq}$ metody, která zahrnuje výpočet dle Rov. 3. Tato metoda předpokládá vzorek exponovaný zkoumaným podmínkám (V_E) a vzorek kontrolní (V_K). U obou vzorků jsou získány hodnoty Cq pro cílový (Cq_{EC} a Cq_{KC}) a pro referenční gen (Cq_{ER} a Cq_{KR}). Hodnota Cq referenčního genu je odečtena od hodnoty Cq cílového genu, čímž je pro oba vzorky získána hodnota ΔCq . Odečtením ΔCq kontrolního vzorku od ΔCq exponovaného vzorku je získána hodnota $\Delta\Delta Cq$, jejíž záporná hodnota je použita jako exponent čísla 2 a představuje násobek míry mRNA exprese cílového genu u exponovaného vzorku vůči vzorku kontrolnímu. Předpokladem této metody je opět 100% efektivita PCR (Schmittgen a Livak 2008, VanGuilder et al. 2008, Jensen 2012).

$$V_E / V_K = 2^{-[(Cq_{EC} - Cq_{ER}) - (Cq_{KC} - Cq_{KR})]} = 2^{-\Delta\Delta Cq} \quad \text{Rov. 3}$$

3.5.4 Digitální polymerázová řetězová reakce

Digitální polymerázová řetězová reakce (digital polymerase chain reaction, dPCR) je metoda umožňující velmi přesnou absolutní kvantifikaci nukleových kyselin, a to bez nutnosti použití kalibrační křivky, jako tomu je u qPCR. Principem dPCR je naředění vzorku obsahujícího cílovou DNA (spolu s veškerými komponentami nutnými pro správný průběh PCR) a jeho rozdělení do velkého počtu oddílů. Každý z těchto oddílů obsahuje jednu nebo žádnou molekulu cílové DNA, případně výjimečně dvě nebo více těchto molekul. Každý oddíl samostatně podstupuje proces PCR a každá z těchto reakcí je také samostatně vyhodnocena. Oddíly, které obsahují cílovou sekvenci, poskytují pozitivní fluorescenční signál, zatímco u ostatních oddílů fluorescence detekována není. Získaná množina hodnot „1 – ano“ a „0 – ne“ připomíná binární fungování digitální techniky, a udává tak digitální PCR její název (Cao et al. 2017, Sreejith et al. 2018). Schematicky je průběh digitální PCR znázorněna na Obr. 17.

Celkový počet molekul obsahujících cílovou sekvenci je s využitím Poissonova rozdělení možno stanovit pomocí Rov. 4, v níž C značí koncentraci cílové DNA, V značí reakční objem oddílů a λ průměrný počet cílových molekul DNA v oddílu. Důležitým aspektem tohoto výpočtu je předpoklad, že je reakční objem všech oddílů stejný – případné rozdíly by mohly ovlivnit přesnost stanovení (Sreejith et al. 2018).

$$C = \lambda / V$$

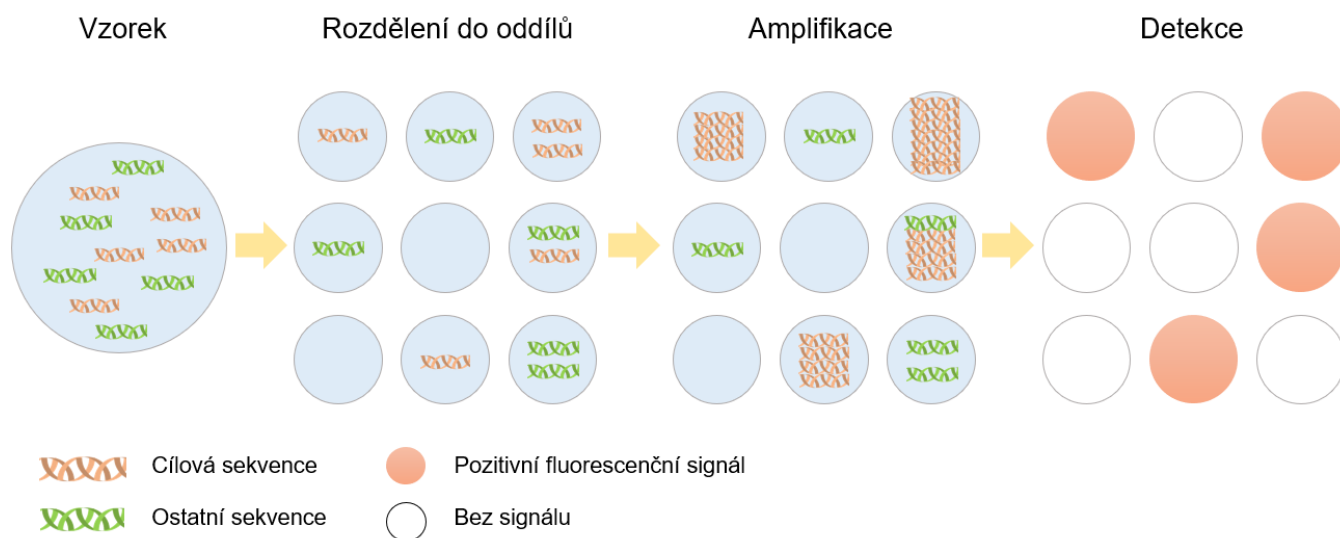
Rov. 4

Průměrný počet cílových molekul v oddílu λ lze vypočítat dle Rov. 5, v níž z značí počet oddílů bez fluorescenčního signálu a n celkový počet oddílů (Sreejith et al. 2018).

$$\lambda = -\ln(z/n)$$

Rov. 5

Při rozptýlení vzorku do oddílů je žádoucí, aby tyto měly co nejmenší objem (běžně se jedná o objem v rozmezí od několika set pikolitrů do několika nanolitrů). Tím je minimalizována jejich schopnost pojmout větší množství vzorku včetně více než jedné templátové molekuly. Zároveň je však třeba mít na paměti, že velmi malé oddíly nemusejí být schopny pojmout některé příliš velké molekuly DNA (např. intaktní genomovou DNA), a mají-li takové molekuly být předmětem kvantifikace, je nutné je fragmentovat. Čím více oddílů systém obsahuje, tím větší je pravděpodobnost detekce cílové DNA i při její extrémně nízké koncentraci ve vzorku, čímž je metoda citlivější a výsledek přesnější. Systém oddílů také musí být dostatečně stabilní a rozptýlení vzorku by nemělo být příliš časově náročné (Cao et al. 2017).



Obr. 17 Schematické znázornění průběhu digitální PCR

Vytvořeno s využitím informací: Cao et al. (2017) a Sreejith et al. (2018).

Oddíly mohou být při dPCR v zásadě dvojího typu – buď se jedná o soustavu fyzicky oddělených komůrek či jamek (chamber-based digital polymerase chain reaction, cdPCR), nebo o emulzi tvořenou vnitřní vodnou fází, v níž probíhá reakce, a vnější olejovou fází, jež od sebe odděluje jednotlivé kapky vodné fáze (droplet digital polymerase chain reaction, ddPCR, viz Kap. 3.5.5). Obě varianty vyžadují zabránění adsorpci biomolekul na fázová rozhraní, což by

mohlo mít za následek inaktivaci enzymů a ztrátu vzorku. Adsorpci lze při cdPCR zamezit vhodnou povrchovou úpravou jednotlivých oddílů (např. s využitím bovinního sérového albuminu), při ddPCR pak lze použít amfifilní surfaktanty (Basu 2017).

Digitální PCR je považována za nejpřesnější PCR metodu (Sreejith et al. 2018). Při qPCR se intenzita fluorescence s každým cyklem zdvojnásobuje, a je tedy typicky možné určit nejméně dvojnásobný rozdíl v množství cílové DNA – pomocí digitální PCR lze oproti tomu zaznamenat i rozdíly menší (až 1,16 násobné), což umožňuje porovnávat vzorky, které se v množství DNA liší velmi málo (Basu 2017). Kompartmentalizace vzorku a individuální vyhodnocení každého z oddílů dále vede k eliminaci vlivu šumu pozadí a umožňuje této metodě vykazovat vyšší detekční citlivost. Zároveň je takto upozaděna role efektivity amplifikace, která v tomto uspořádání nepředstavuje problém. Výhodou dPCR je také snížená náchylnost k inhibici reakce. Důležitým faktorem je rovněž lepší reprodukovatelnost dat ve srovnání s jinými PCR technikami (Sreejith et al. 2018, Basu 2017, Cao et al. 2017).

Na druhé straně má digitální PCR i některé své nevýhody. Mezi ty patří omezený objem vzorku v reakci, což může být komplikací při analýze klinických vzorků, je-li jejich objem poměrně velký (kupříkladu několik mililitrů séra) a je-li v nich DNA přítomna ve velmi nízké koncentraci. Dalšími nevýhodami jsou nižší dynamický rozsah v důsledku omezeného množství oddílů; možnost podhodnocení množství DNA v důsledku neproběhnutí amplifikace, ačkoliv daný oddíl obsahoval cílovou molekulu DNA; nižší počet fluorescenčních barviv, jejichž signál je většina dPCR přístrojů schopna současně měřit v rámci jednoho vzorku v porovnání s přístroji pro qPCR; méně přesná kvantifikace větších amplikonů; složitější pracovní postup a nižší počet vzorků, které je možné analyzovat během jednoho pracovního dne v laboratoři v porovnání s qPCR; vyšší riziko kontaminace vzorku v některých otevřenějších instrumentálních uspořádáních a dále také vysoká cena přístrojového vybavení. Mnohé z nedostatků dPCR jsou záležitostí technických limitů přístrojů a jejich překonání je předmětem úsilí jednotlivých výrobců (Kuypers et al. 2017, Basu 2017).

Výše uvedené přednosti dPCR je možno s výhodou využít v mnoha různých oblastech vědecké či klinické praxe, a to zejména ve dvou hlavních směrech, kterými jsou přesná absolutní kvantifikace nukleových kyselin bez nutnosti sestavení kalibrační křivky a vysoce citlivá detekce vzácně se vyskytujících sekvencí. Pomocí digitální PCR tak lze detekovat a kvantifikovat patogeny, provádět vyšetření variací počtu kopií (copy number variations, CNV), detekovat chromozomální abnormality (např. při neinvazivním prenatálním screeningu) nebo

sekvence spojené s onkologickými onemocněními či identifikovat genetické manipulace (Cao et al. 2017).

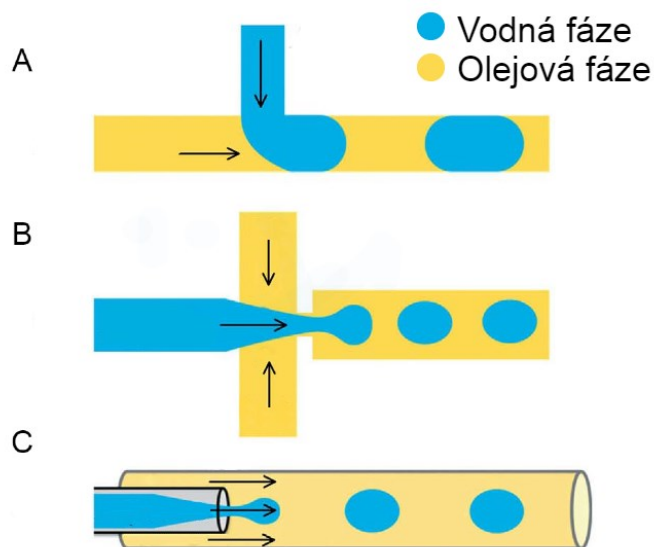
3.5.5 Droplet digital PCR

Droplet digital PCR (ddPCR) je metoda založená na principu rozdělení vzorku do velkého počtu samostatných oddílů, kterými jsou v tomto případě kapky vnitřní vodné fáze rozptýlené ve vnější olejové fázi. Jednotlivé kapky samostatně podstupují proces amplifikace a u každé z nich je jednotlivě detekován fluorescenční signál, který umožňuje vyhodnotit přítomnost cílové DNA v každé kapce a následně cílovou DNA ve vzorku kvantifikovat. Při použití této metody tedy není nutné sestavovat kalibrační křivku (Nyaruaba et al. 2019). Podrobněji je princip dPCR spolu s jeho přednostmi i limity popsán v předchozí kapitole.

Před amplifikací je vzorek obsahující potřebné komponenty pro průběh PCR rozdělen do velkého množství kapek (20 000 a více v závislosti na konkrétním přístroji) (Nyaruaba et al. 2019). Kapky jsou generovány pomocí mikrofluidních zařízení, a to nejčastěji s použitím následujících třech konfigurací, které jsou schematicky znázorněny na Obr. 18. Proud olejové fáze může na proud vodné fáze působit z jednoho směru (tzv. T-junction konfigurace), ze dvou směrů (tzv. flow-focusing konfigurace) nebo může být vodná fáze vystřikována z tenké kapiláry, umístěné paralelně v kapiláře větší, obsahující olejovou fázi (tzv. co-flow konfigurace). Těmito způsoby je při ddPCR možné získat dostatečně uniformní kapky vodné fáze, které jsou v emulzi vzájemně odděleny vnější olejovou fází, čímž je zamezeno případné křížové kontaminaci a je omezena evaporace vodné fáze. Systém kapek se navíc vyznačuje velkým specifickým povrchem, který usnadňuje přenos tepla, a tak urychluje PCR. Po této kompartmentalizaci a amplifikaci následuje detekce fluorescenčního signálu a s využitím příslušného softwaru je cílová DNA kvantifikována (Cao et al. 2017, Sreejith et al. 2018).

Ačkoliv je koncept digitální PCR vyvíjen již od 90. let 20. století, stala se ddPCR komerčně dostupnou metodou až v roce 2011. Dnes je součástí portfolia několika výrobců a nachází využití v mnoha rozličných oblastech. Kromě využití při detekci patogenů, variací počtu kopií, mutací, genetických manipulací aj., jak bylo popsáno výše, je tato metoda vhodná také pro studium genové exprese. Oproti konvenční RT-qPCR, která neposkytuje spolehlivé výsledky, je-li exprese cílového genu velmi nízká nebo jsou-li rozdíly v expresi mezi jednotlivými vzorky menší než dvojnásobné, je pomocí ddPCR možné stanovit i nízkou míru exprese, a to i

v přítomnosti inhibitorů. Právě díky kombinaci citlivosti, přesnosti a reprodukovatelnosti dat se ddPCR stala užitečným nástrojem pro studium genové exprese (Nyaruba et al. 2019).



Obr. 18 Tvorba kapek při ddPCR

A – Proud olejové fáze působí na proud vodné fáze z jednoho směru (T-junction konfigurace)

B – Proud olejové fáze působí na proud vodné fáze ze dvou směrů (flow-focusing konfigurace)

C – Vodná fáze je vystřikována z tenké kapiláry, umístěné paralelně v kapiláře větší, obsahující olejovou fází (co-flow konfigurace)

Modifikováno dle: Cao et al. (2017).

Taylor et al. (2017) srovnávali qPCR a ddPCR jako metody pro analýzu genové exprese, přičemž použili purifikovanou syntetickou DNA ve velmi malém množství. Takto bylo zjištěno, že obsahují-li vzorky velmi malé nebo žádné množství kontaminantů, poskytují qPCR i ddPCR srovnatelné výsledky při relativní i absolutní kvantifikaci, a to s výbornou přesností a reakční efektivitou. Při stanovení mRNA je však nejdříve nutné provést reverzní transkripci, přičemž komponenty reakčního mixu pro tuto reakci mohou inhibovat *Taq* polymerázu, a tak ovlivňovat reakční efektivitu a hodnoty C_q při qPCR – v tomto ohledu jsou nejnáchylnější vzorky obsahující velké množství nečistot a nízké množství cílové cDNA. Autoři uvádějí, že je-li míra kontaminace hodnocených vzorků stejná, poskytují qPCR i ddPCR přibližně stejně spolehlivé výsledky. Mezi vzorky ale často existují drobné rozdíly v množství kontaminantů – v tomto případě poskytuje ddPCR konzistentní a reprodukovatelné výsledky, zatímco výsledky qPCR jsou zatíženy vysokou variabilitou. Pomocí normalizace může být dosaženo vyšší přesnosti qPCR díky korekci počátečního množství cDNA ve vzorcích, nemůže však být zcela eliminována variabilita dat související s kontaminanty. Autoři zároveň upozorňují, že i při

ddPCR má normalizace svůj význam, a to z důvodu variability při procesu reverzní transkripce. V souhrnu autoři uvádějí, že obsahují-li vzorky cílovou cDNA v malém množství ($C_q \geq 29$) nebo obsahují-li proměnlivá množství kontaminantů, poskytuje ddPCR v porovnání s qPCR přesnější, statisticky významnější a reprodukovatelnější data.

4 DISKUSE

Lékové interakce vzniklé na podkladě enzymové indukce mohou mít závažné klinické důsledky, jakými jsou snížení účinku užívaných léčiv či zvýšení jejich toxicity. Z tohoto důvodu je nezbytné, aby byl případný indukční potenciál u nově vyvíjených léčiv odhalen již během preklinického testování (Fahmi a Ripp 2010). Tato práce dokládá, že klíčovým předpokladem pro úspěšné odhalení potenciálních enzymových induktorů je znalost molekulárních mechanismů, jež jsou zapojeny do regulace exprese biotransformačních enzymů. Neméně důležité je použití adekvátních preklinických experimentálních metod a modelů, které umožňují translaci poznatků do klinické praxe.

Role PXR při enzymové indukci je v odborné literatuře velmi dobře zdokumentována. Výsledkem zdokonalení metodických postupů při studiu indukčního potenciálu je nízký počet induktorů CYP mezi nově schvalovanými léčivy. Pelkonen et al. (2020) provedli analýzu nově schválených molekul ve Finsku mezi lety 2007 a 2016. Pouze 6 z celkového počtu 256 nových léčiv bylo induktory CYP. Tuto skutečnost autoři připisují vývoji stále specifitějších a účinnějších léčiv, jež mohou být podávána v nižších dávkách, které nemají dostatečný potenciál k enzymové indukci. Zároveň autoři vyzdvihují efektivitu hodnocení lékových interakcí v rámci vývoje nových léčiv. Studie analyzovala léčiva schválená ve Finsku, avšak prakticky všechna z nich byla schválena centralizovanou procedurou na úrovni EU a dle názoru autorů jsou jimi představená data obecně v souladu se situací v globálním měřítku.

Přesto se mohou objevit případy neočekávané aktivace PXR. Delfosse et al. (2015) zjistili, že současné navázání pesticidu trans-nonachloru a 17 α -ethinyloestradiolu vykazuje synergistický efekt a vede k aktivaci PXR. Samostatně je schopnost těchto látek vázat se na PXR nízká. Vzájemnou interakcí uvnitř LBD však společně vytvářejí jakýsi supramolekulární ligand, který aktivuje PXR a indukuje CYP3A4 (ověřeno u lidských primárních hepatocytů na úrovni mRNA, proteinu i enzymové aktivity). Podobným mechanismem by mohlo docházet k aktivaci PXR i kombinací jiných léčiv a/nebo dalších xenobiotik, jimž je člověk exponován. Tímto mechanismem se tedy mohou stát potenciálními enzymovými induktory i léčiva, která byla sama o sobě vyhodnocena jako neindukující.

Oproti zřejmému klinickému významu indukce CYP jsou lékové interakce na podkladě PXR mediované indukce enzymů 2. fáze diskutovány mnohem méně. V literatuře jim je ve srovnání s indukcí CYP věnován menší prostor a není snadné nalézt mnoho konkrétních příkladů doložených klinicky významných, či dokonce závažných lékových interakcí vzniklých tímto

mechanismem. Jako příklad lze uvést kyselinu valproovou, jejíž clearance může být zvýšena při současném podávání rifampicinu, induktoru PXR. Mechanismem této interakce je pravděpodobně indukce UGT (glukuronidace hraje v metabolismu kyseliny valproové významnou roli) a dále také indukce izoform CYP2C9 a CYP2C19 (Doran et al. 2021).

Kromě indukce CYP může být příčinou lékových interakcí také indukce transportních proteinů. Klinicky zdokumentován je v tomto ohledu význam indukce efluxního transportéru P-glykoproteinu ve střevě. Indukce byla pozorována především u aktivátorů PXR a může mít za následek snížení absorpce podávaných léčiv. Míra, jakou může induktor zvýšit eflux současně podávaného substrátu P-glykoproteinu, je obecně nižší, než jakou může stejný induktor zvýšit metabolizaci současně podávaného substrátu CYP. Zatímco rifampicin může způsobit více než 80% pokles AUC midazolamu (prostřednictvím indukce CYP3A), u dabigatranu (relativně specifický substrát P-glykoproteinu) je pokles nejvýše 67%. Proto u látek se slabým potenciálem k indukci CYP3A není očekávána ani klinicky významná indukce P-glykoproteinu. V současné době není k dispozici dostatečně validovaný *in vitro* systém pro studium intestinální indukce P-glykoproteinu, a proto je testování induktorů tohoto transportního proteinu založeno na klinických studiích kombinovaných s matematickým modelováním. Vývoj a validace nových přístupů pro studium této problematiky tak zůstává otázkou budoucího vědeckého bádání (Zamek-Gliszczyński et al. 2021).

Další výzkum by také měl směřovat k ještě lepšímu pochopení buněčných signálních drah, do nichž je PXR zapojen. Hendriks et al. (2020) kupříkladu v nedávné studii popsali mechanismus nepřímé aktivace PXR prostřednictvím inhibice fosforylace ERK1/2 (kináza regulovaná mimobuněčným signálem, extracellular signal-regulated kinase). Aktivita ERK1/2 kaskády je zvýšená při kultivaci hepatocytů ve 2D uspořádání a souvisí s dediferenciací buněk, nižší aktivita je pozorována ve 3D uspořádání. Fosforylované ERK1/2 kinázy (prozatím neobjasněným způsobem) inhibují funkci PXR. Látka AZD1208 byla vyvíjena jako potenciální léčivo pro terapii akutní myeloidní leukemie. Při *in vitro* testování s využitím linie HepaRG a 2D hepatocytů nebyla detekována indukce aktivity CYP3A4 a látka postoupila do klinického hodnocení. V klinických zkouškách se ukázalo, že AZD1208 indukuje aktivitu izoformy CYP3A4, která zároveň tuto látku metabolizuje (autoindukce). Autoři práce dokázali, že indukční potenciál AZD1208 může být identifikován testováním látky v 3D hepatocytech (sféroidech), protože v tomto uspořádání nedochází k výraznému zvýšení aktivity kaskády ERK1/2, s níž je indukční potenciál AZD1208 spjat. Citovaná studie dokazuje, že detailní porozumění signálním drahám zapojených do regulace exprese biotransformačních enzymů

není významné pouze z hlediska základního výzkumu, nýbrž že jsou tyto poznatky přímo využitelné v oblasti vývoje léčiv. Zároveň studie podtrhuje význam kultivace ve 3D uspořádání, v němž jsou hepatocyty schopny citlivěji detekovat i atypické mechanismy enzymové indukce.

V budoucnu lze rovněž očekávat další nové poznatky o PXR a jeho rolích v endogenním metabolismu. PXR se tak může stát potenciálním farmakologickým cílem. Při studiu endogenních procesů může být navíc indukce CYP využita jako biomarker. OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development, Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj) například v současnosti rozvíjí tzv. AOP koncept (adverse outcome pathway). Jeho podstatou je popis jednotlivých mezikroků toxikologických a patofyziologických dějů a jejich vzájemných vztahů. Jako spouštěcí faktor každé kaskády je definována tzv. molekulární iniciační událost. Při popisu procesů, při kterých hrají roli nukleární receptory, může být za takovou událost považována vazba ligandu na receptor a jeho aktivace. Jako biomarker expozice xenobiotiku a aktivace receptoru pak může sloužit právě enzymová indukce (Hakkola et al. 2018).

Je zřejmé, že modely, u nichž není exprese PXR zachována, nemohou poskytovat spolehlivá prediktivní data. Z rešerše zaměřené na tuto problematiku vyplývá, že neexistuje zcela univerzální model, který by umožnil snadnou a přímou extrapolaci experimentálních dat do klinických podmínek. Každý model má své přednosti a limity, které je zapotřebí znát a respektovat.

Zlatým standardem jaterních *in vitro* modelů jsou lidské primární hepatocyty (Zeilinger et al. 2016). Je jisté, že bude nadále pokračovat snaha o vyvinutí takového postupu kultivace, který zajistí uchování diferenciovaného fenotypu těchto buněk po co nejdélejší možnou dobu. Lze očekávat, že bude pozornost věnována především zdokonalování metod kultivace hepatocytů ve trojrozměrném uspořádání a/nebo jejich kultivaci s dalšími buněčnými typy jaterní tkáně. Zároveň bude pravděpodobně stále více využíváno dynamické uspořádání, které zahrnuje kontinuální oběh kultivačního média. Tím simuluje *in vivo* podmínky věrohodněji než výměna média, která je při konvenční statické kultivaci nejčastěji prováděna pouze několikrát týdně.

Buněčné linie, o nichž je známo, že nejsou pro studium enzymové indukce fenotypově optimální (HepG2, Huh7 aj.) (Donato et al. 2013), stále představují cenově nejdostupnější model, a je tedy pravděpodobné, že budou používány i nadále. Data publikovaná s využitím těchto buněk by však s vědomím těchto limitů měla být interpretována spíše jako signál, který je nutné potvrdit dalšími experimenty. Zajímavé bude také sledovat zdokonalování protokolů pro přípravu hepatocytům podobných buněk získaných z kmenových buněk. Kamei et al.

(2019) například vyvinuli platformu, na níž jsou hepatocytům podobné buňky kultivovány ve 3D uspořádání v mikrofluidním prostředí. Tímto autoři kombinují několik strategií a byli schopni generovat buňky, které na úrovni mRNA exprimují CYP3A4, CYP2C19, CYP2D6 nebo UGT1A1 ve větší míře než buňky HepG2. Ačkoliv míra exprese stále není srovnatelná s normálními hepatocyty, tato a velké množství dalších prací nepochybně přispívají k pokroku v oblasti diferenciačních strategií. Kmenovým buňkám je věnována velká pozornost a v budoucnu lze očekávat další úspěchy a potenciální využití těchto buněk i při studiu enzymové indukce.

Pomyslným mostem mezi buněčnými modely a klinickými studii jsou zvířecí modely (Jaiswal et al. 2014, Scheer a Wilson 2016). Zvířecí modely používané při studiu enzymové indukce jsou bezesporu fascinujícím obrazem úrovně současné vědy a možností, které nabízí. Geneticky modifikované myši, které exprimují lidské enzymy, či dokonce myši, jejichž játra jsou téměř celá tvořena lidskými hepatocyty, pomáhají překonat mezidruhové rozdíly mezi zvířecím a lidským organismem. K dalšímu zdokonalení těchto modelů může přispět rozvoj průlomových technologií umožňujících genetickou manipulaci. Takovou technologií je například CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats). Principem je specifické navedení endonukleázy Cas9 k cílové sekvenci DNA, kterou Cas9 rozštěpí. Výsledkem může být delece cílové sekvence nebo její nahrazení exogenním fragmentem DNA (Kim a Ko 2018). Zdokonalení humanizovaných zvířecích modelů může v budoucnu přinést nejen lepší možnosti pro studium indukčního potenciálu, ale také například perspektivní nástroj pro studium personalizované farmakoterapie. Humanizované modely by mohly pomoci predikovat odpověď pacientů na léčbu nebo racionalizovat polyfarmakoterapii, která je dnes běžnou součástí klinické praxe (Henderson et al. 2019).

Vývoj je patrný také v oblasti metod využívaných při testování enzymové indukce. Důležitou metodou je kvantitativní polymerázová řetězová reakce, která umožňuje stanovit změny v genové expresi na úrovni mRNA (Jensen 2012). V minulosti neexistoval žádný standard, který by definoval optimální experimentální protokol nebo zásady pro publikaci a interpretaci výsledků získaných s využitím této metody. Reakcí bylo vytvoření tzv. MIQE doporučení (minimální informace pro publikaci kvantitativních real-time PCR experimentů, minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments), která chybějící standardy definují a přispívají k publikování kvalitních, transparentních a reprodukovatelných qPCR dat nejen v oblasti studia enzymové indukce (Bustin et al. 2009). MIQE doporučení se stala všeobecně uznávaným standardem, který aktivně prosazují mnohá vědecká periodika či

výrobci přístrojového vybavení a reagensií. Přesto se stále objevují práce, jež se od tohoto standardu odchyľují – kvalita publikovaných prací tak vždy záleží především na svědomitosti autorů a na pravidlech daného vědeckého časopisu (Bustin a Wittwer 2017).

Ačkoliv je PCR používána již poměrně dlouhou dobu, neustále prochází vývojem. Ten před několika lety vyústil v komerčně dostupnou technologii droplet digital PCR, která nalézá uplatnění v různých oblastech výzkumu i klinické praxe. Metoda umožňuje absolutní kvantifikaci nukleových kyselin bez nutnosti sestavení kalibrační křivky a vysoce citlivou detekci vzácně se vyskytujících sekvencí (Cao et al. 2017). Především v případech, kdy vzorky obsahují stanovovanou DNA v malém množství nebo kdy obsahují proměnlivá množství kontaminantů, poskytuje ddPCR v porovnání s qPCR přesnější, statisticky významnější a reprodukovatelnější data (Taylor et al. 2017). Také pro digitální PCR byla publikována MIQE doporučení (Bustin a Wittwer 2017).

Díky svým vlastnostem se ddPCR stala užitečným nástrojem pro studium genové exprese (Nyaruba et al. 2019). Lze očekávat, že se v blízké budoucnosti objeví studie, které potvrdí využitelnost ddPCR pro zkoumání indukčního potenciálu nově vyvíjených léčiv. Zároveň by ddPCR mohla být díky snadné absolutní kvantifikaci mRNA metodou volby pro komplexní srovnání charakteristik jednotlivých buněčných modelů z hlediska jejich relevantnosti pro studium enzymové indukce.

5 ZÁVĚR

Rešeršní práce se věnovala PXR, klíčovému transkripčnímu faktoru, který se podílí na regulaci exprese důležitých biotransformačních enzymů a transportérů v hepatocytech. Byla popsána také role PXR v regulaci endogenních pochodů.

Práce uvádí přehled buněčných jaterních modelů sloužících k popisu funkcí PXR. Lidské primární hepatocyty jsou fenotypově nejlépe srovnatelné s nativní jaterní tkání. Dále jsou zmíněny strategie, pomocí nichž může být podpořen fenotyp hepatocytů v kultuře. Charakterizovány byly rovněž další buněčné modely využívané při studiu enzymové indukce, a to především se zaměřením na míru exprese PXR, míru exprese biotransformačních enzymů a jejich inducibilitu.

Diskutována byla také možnost využití zvířecích modelů, přičemž bylo zdůrazněno, že běžná laboratorní zvířata jsou pro studium enzymové indukce vzhledem k mezidruhovým rozdílům nevhodná. Představeny byly geneticky a chiméricky humanizované myši, které umožňují tyto rozdíly překonat, a byly uvedeny výhody a nevýhody obou postupů humanizace.

Sestaven byl také přehled metod pro studium enzymové indukce. Popsány byly jak metody vhodné pro screening velkého množství potenciálních induktorů, tak také metody využívané pro vyhodnocení genové indukce u *in vitro* modelů po jejich expozici testovanému léčivu. Byly vysvětleny možnosti stanovení změn na úrovni mRNA, proteinu a enzymové aktivity.

Z hlediska vyhodnocení změn v genové expresi na úrovni mRNA, které ve svých doporučeních pro studium lékových interakcí preferuje Evropská léková agentura, byla podrobně představena polymerázová řetězová reakce. Metoda má zásadní význam pro diskutovanou problematiku. Pozornost byla věnována také novější modifikaci této metody, droplet digital PCR, která nabízí možnost velmi přesné a citlivé absolutní kvantifikace mRNA.

V souhrnu lze konstatovat, že pro kvalitní preklinické zhodnocení indukčního potenciálu kandidátního léčiva je zapotřebí komplexní soustava kroků, mezi které patří použití vhodných screeningových nástrojů; uvážený výběr *in vitro* a *in vivo* modelů, znalost jejich předností a respektování jejich limitů; precizní laboratorní práce s využitím adekvátních experimentálních postupů; znalost principů *in vitro-in vivo* extrapolace; vhodné využívání doplňkových *in silico* nástrojů a v neposlední řadě také znalost molekulárních mechanismů zapojených do regulace exprese biotransformačních enzymů. Kombinace uvedených kroků pomáhá zpřesnit odhad indukčního potenciálu nově vyvíjeného léčiva v klinických podmínkách.

6 LITERATURA

- Ahmed HMM, Salerno S, Morelli S, Giorno L, De Bartolo L. 3D liver membrane system by co-culturing human hepatocytes, sinusoidal endothelial and stellate cells. *Biofabrication* 2017;9(2):1-13.
- Bachmann A et al. 3D Cultivation techniques for primary human hepatocytes. *Microarrays (Basel)* 2015;4(1):64-83.
- Basu AS. Digital Assays Part I: Partitioning statistics and digital PCR. *SLAS Technol* 2017;22(4):369-86.
- Bell CC et al. Characterization of primary human hepatocyte spheroids as a model system for drug-induced liver injury, liver function and disease. *Sci Rep* 2016;6:1-13.
- Bell CC et al. Transcriptional, functional, and mechanistic comparisons of stem cell-derived hepatocytes, HepaRG cells, and three-dimensional human hepatocyte spheroids as predictive in vitro systems for drug-induced liver injury. *Drug Metab Dispos* 2017;45(4):419-29.
- Berger B et al. Comparison of liver cell models using the basel phenotyping cocktail. *Front Pharmacol* 2016;7:1-12.
- Beuers U, Trauner M, Jansen P, Poupon R. New paradigms in the treatment of hepatic cholestasis: from UDCA to FXR, PXR and beyond. *J Hepatol* 2015;62(1 Suppl):25-37.
- Bissig KD et al. P450-Humanized and Human Liver Chimeric Mouse Models for Studying Xenobiotic Metabolism and Toxicity. *Drug Metab Dispos* 2018;46(11):1734-44.
- Blumberg B et al. SXR, a novel steroid and xenobiotic-sensing nuclear receptor. *Genes Dev* 1998;12(20):3195-205.
- Brewer CT, Chen T. PXR variants: the impact on drug metabolism and therapeutic responses. *Acta Pharm Sin B* 2016;6(5):441-9.
- Brodie MJ, Mintzer S, Pack AM, Gidal BE, Vecht CJ, Schmidt D. Enzyme induction with antiepileptic drugs: cause for concern? *Epilepsia* 2013;54(1):11-27.
- Brunstein J. PCR: the basics of the polymerase chain reaction. *MLO Med Lab Obs* 2013;45(4):32, 34-5.
- Buchman CD, Chai SC, Chen T. A current structural perspective on PXR and CAR in drug metabolism. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2018;14(6):635-47.

- Bulutoglu B, Mert S, Rey-Bedón C, Deng SL, Yarmush ML, Usta OB. Rapid maturation of the hepatic cell line Huh7 via CDK inhibition for PXR dependent CYP450 metabolism and induction. *Sci Rep* 2019;9(1):1-9.
- Burkard A et al. Generation of proliferating human hepatocytes using Upcyte® technology: characterisation and applications in induction and cytotoxicity assays. *Xenobiotica* 2012;42(10):939-56.
- Bustin SA et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 2009;55(4):611-22.
- Bustin SA, Benes V, Nolan T, Pfaffl MW. Quantitative real-time RT-PCR – a perspective. *J Mol Endocrinol* 2005;34(3):597-601.
- Bustin SA, Wittwer CT. MIQE: A Step Toward More Robust and Reproducible Quantitative PCR. *Clin Chem* 2017;63(9):1537-8.
- Calitz C, Hamman JH, Fey SJ, Wrzesinski K, Gouws C. Recent advances in three-dimensional cell culturing to assess liver function and dysfunction: from a drug biotransformation and toxicity perspective. *Toxicol Mech Methods* 2018;28(5):369-85.
- Cao L et al. Advances in digital polymerase chain reaction (dPCR) and its emerging biomedical applications. *Biosens Bioelectron* 2017;90:459-74.
- Ceelen L et al. Critical selection of reliable reference genes for gene expression study in the HepaRG cell line. *Biochem Pharmacol* 2011;81(10):1255-61.
- Chang TK, Waxman DJ. Synthetic drugs and natural products as modulators of constitutive androstane receptor (CAR) and pregnane X receptor (PXR). *Drug Metab Rev* 2006;38(1-2):51-73.
- Choi S, Sainz B Jr, Corcoran P, Uprichard S, Jeong H. Characterization of increased drug metabolism activity in dimethyl sulfoxide (DMSO)-treated Huh7 hepatoma cells. *Xenobiotica* 2009;39(3):205-17.
- Delfosse V et al. Synergistic activation of human pregnane X receptor by binary cocktails of pharmaceutical and environmental compounds. *Nat Commun* 2015;6:1-10.
- di Masi A, De Marinis E, Ascenzi P, Marino M. Nuclear receptors CAR and PXR: Molecular, functional, and biomedical aspects. *Mol Aspects Med* 2009;30(5):297-343.
- Donato MT, Jover R, Gómez-Lechón MJ. Hepatic cell lines for drug hepatotoxicity testing: limitations and strategies to upgrade their metabolic competence by gene engineering. *Curr Drug Metab* 2013;14(9):946-68.

- Donato MT, Lahoz A, Castell JV, Gómez-Lechón MJ. Cell lines: a tool for in vitro drug metabolism studies. *Curr Drug Metab* 2008;9(1):1-11.
- Donato MT, Tolosa L. Stem-cell derived hepatocyte-like cells for the assessment of drug-induced liver injury. *Differentiation* 2019;106:15-22.
- Doran C, Moro M, Green J, Gardner KN. Rifampin-divalproex drug-drug interaction in an adult patient: A case report. *Ment Health Clin* 2021;11(1):19-22.
- Elias JA, Lee CG, Zheng T, Ma B, Homer RJ, Zhu Z. New insights into the pathogenesis of asthma. *J Clin Invest* 2003;111(3):291-7.
- European Medicines Agency. Guideline on the investigation of drug interactions. Rev. 1 Corr. 2. London: European Medicines Agency; 2015:1-59.
- Evans RM. The nuclear receptor superfamily: a rosetta stone for physiology. *Mol Endocrinol* 2005;19(6):1429-38.
- Fahmi OA, Ripp SL. Evaluation of models for predicting drug-drug interactions due to induction. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2010;6(11):1399-416.
- Farrell RE. *RNA Methodologies*. 4th ed. Cambridge: Academic Press, 2010:449-89.
- Ferreira A, Rodrigues M, Silvestre S, Falcão A, Alves G. HepaRG cell line as an in vitro model for screening drug-drug interactions mediated by metabolic induction: amiodarone used as a model substance. *Toxicol In Vitro* 2014;28(8):1531-5.
- Fraczek J, Bolleyn J, Vanhaecke T, Rogiers V, Vinken M. Primary hepatocyte cultures for pharmaco-toxicological studies: at the busy crossroad of various anti-dedifferentiation strategies. *Arch Toxicol* 2013;87(4):577-610.
- Fujiwara S. Humanized mice: A brief overview on their diverse applications in biomedical research. *J Cell Physiol* 2018;233(4):2889-901.
- Garcia JG, Ma SF. Polymerase chain reaction: a landmark in the history of gene technology. *Crit Care Med* 2005;33(12 Suppl):429-32.
- Garibyan L, Avashia N. Polymerase chain reaction. *J Invest Dermatol* 2013;133(3):1-4.
- Godoy P et al. Recent advances in 2D and 3D in vitro systems using primary hepatocytes, alternative hepatocyte sources and non-parenchymal liver cells and their use in investigating mechanisms of hepatotoxicity, cell signaling and ADME. *Arch Toxicol* 2013;87(8):1315-530.

- Gómez-Lechón MJ, Tolosa L, Donato MT. Upgrading HepG2 cells with adenoviral vectors that encode drug-metabolizing enzymes: application for drug hepatotoxicity testing. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2017;13(2):137-48.
- Gonzalez-Sanchez E, Firrincieli D, Housset C, Chignard N. Nuclear receptors in acute and chronic cholestasis. *Dig Dis* 2015;33(3):357-66.
- Green MR, Sambrook J. Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harb Protoc* 2019;2019(6):436-56.
- Grompe M, Strom S. Mice with human livers. *Gastroenterology* 2013;145(6):1209-14.
- Guillouzo A, Corlu A, Aninat C, Glaise D, Morel F, Guguen-Guillouzo C. The human hepatoma HepaRG cells: a highly differentiated model for studies of liver metabolism and toxicity of xenobiotics. *Chem Biol Interact* 2007;168(1):66-73.
- Hakkola J, Bernasconi C, Coecke S, Richert L, Andersson TB, Pelkonen O. Cytochrome P450 Induction and Xeno-Sensing Receptors Pregnane X Receptor, Constitutive Androstane Receptor, Aryl Hydrocarbon Receptor and Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α at the Crossroads of Toxicokinetics and Toxicodynamics. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2018;123 Suppl 5:42-50.
- Hakkola J, Rysä J, Hukkanen J. Regulation of hepatic energy metabolism by the nuclear receptor PXR. *Biochim Biophys Acta* 2016;1859(9):1072-82.
- Han HK. Role of transporters in drug interactions. *Arch Pharm Res* 2011;34(11):1865-77.
- Handa K, Nakagome I, Yamaotsu N, Gouda H, Hirono S. Three-dimensional quantitative structure-activity relationship analysis for human pregnane X receptor for the prediction of CYP3A4 induction in human hepatocytes: structure-based comparative molecular field analysis. *J Pharm Sci* 2015;104(1):223-32.
- Hannoun Z, Steichen C, Dianat N, Weber A, Dubart-Kupperschmitt A. The potential of induced pluripotent stem cell derived hepatocytes. *J Hepatol* 2016;65(1):182-99.
- Hariparsad N et al. Identification of pregnane-X receptor target genes and coactivator and corepressor binding to promoter elements in human hepatocytes. *Nucleic Acids Res* 2009;37(4):1160-73.
- Hariparsad N, Carr BA, Evers R, Chu X. Comparison of immortalized Fa2N-4 cells and human hepatocytes as in vitro models for cytochrome P450 induction. *Drug Metab Dispos* 2008;36(6):1046-55.

- Hart SN, Li Y, Nakamoto K, Subileau EA, Steen D, Zhong XB. A comparison of whole genome gene expression profiles of HepaRG cells and HepG2 cells to primary human hepatocytes and human liver tissues. *Drug Metab Dispos* 2010;38(6):988-94.
- Hasegawa M et al. The reconstituted 'humanized liver' in TK-NOG mice is mature and functional. *Biochem Biophys Res Commun* 2011;405(3):405-10.
- Hassani-Nezhad-Gashti F et al. Activation of nuclear receptor PXR impairs glucose tolerance and dysregulates GLUT2 expression and subcellular localization in liver. *Biochem Pharmacol* 2018;148:253-64.
- Henderson CJ et al. An Extensively Humanized Mouse Model to Predict Pathways of Drug Disposition and Drug/Drug Interactions, and to Facilitate Design of Clinical Trials. *Drug Metab Dispos* 2019;47(6):601-15
- Hendriks DFG et al. Clinically Relevant Cytochrome P450 3A4 Induction Mechanisms and Drug Screening in Three-Dimensional Spheroid Cultures of Primary Human Hepatocytes. *Clin Pharmacol Ther* 2020;108(4):844-55.
- Hewitt NJ et al. Primary hepatocytes: current understanding of the regulation of metabolic enzymes and transporter proteins, and pharmaceutical practice for the use of hepatocytes in metabolism, enzyme induction, transporter, clearance, and hepatotoxicity studies. *Drug Metab Rev* 2007;39(1):159-234.
- Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun* 2005;6(4):279-84.
- Ihunnah CA, Jiang M, Xie W. Nuclear receptor PXR, transcriptional circuits and metabolic relevance. *Biochim Biophys Acta* 2011;1812(8):956-63.
- Jackson JP, Li L, Chamberlain ED, Wang H, Ferguson SS. Contextualizing hepatocyte functionality of cryopreserved HepaRG cell cultures. *Drug Metab Dispos* 2016;44(9):1463-79.
- Jaiswal S, Sharma A, Shukla M, Vaghasiya K, Rangaraj N, Lal J. Novel pre-clinical methodologies for pharmacokinetic drug-drug interaction studies: spotlight on "humanized" animal models. *Drug Metab Rev* 2014;46(4):475-93.
- Jancová P, Anzenbacher P, Anzenbacherová E. Phase II drug metabolizing enzymes. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2010;154(2):103-16.
- Jensen EC. Real-time reverse transcription polymerase chain reaction to measure mRNA: use, limitations, and presentation of results. *Anat Rec (Hoboken)* 2012;295(1):1-3.

- Jeong H, Choi S, Song JW, Chen H, Fischer JH. Regulation of UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 1A1 by progesterone and its impact on labetalol elimination. *Xenobiotica* 2008;38(1):62-75.
- Jiang T, Xing B, Rao J. Recent developments of biological reporter technology for detecting gene expression. *Biotechnol Genet Eng Rev* 2008;25(1):41-76.
- Jones BC et al. Managing the Risk of CYP3A Induction in Drug Development: A Strategic Approach. *Drug Metab Dispos* 2017;45(1):35-41.
- Kamei KI, Yoshioka M, Terada S, Tokunaga Y, Chen Y. Three-dimensional cultured liver-on-a-Chip with mature hepatocyte-like cells derived from human pluripotent stem cells. *Biomed Microdevices* 2019;21(3):1-9.
- Kandel SE, Han LW, Mao Q, Lampe JN. Digging deeper into CYP3A testosterone metabolism: kinetic, regioselectivity, and stereoselectivity differences between CYP3A4/5 and CYP3A7. *Drug Metab Dispos* 2017;45(12):1266-75.
- Kanebratt KP, Andersson TB. HepaRG cells as an in vitro model for evaluation of cytochrome P450 induction in humans. *Drug Metab Dispos* 2008;36(1):137-45.
- Kim YS, Ko JH. Humanized model mice by genome editing and engraftment technologies. *Mol Cell Toxicol* 2018;14:255-61
- Kliwer SA et al. An orphan nuclear receptor activated by pregnanes defines a novel steroid signaling pathway. *Cell* 1998;92(1):73-82.
- Kubista M et al. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 2006;27(2-3):95-125.
- Kumar TR, Larson M, Wang H, McDermott J, Bronshteyn I. Transgenic mouse technology: principles and methods. *Methods Mol Biol* 2009;590:335-62.
- Kuypers J, Jerome KR. Applications of digital PCR for clinical microbiology. *J Clin Microbiol* 2017;55(6):1621-28.
- Lauschke VM, Hendriks DF, Bell CC, Andersson TB, Ingelman-Sundberg M. Novel 3D culture systems for studies of human liver function and assessments of the hepatotoxicity of drugs and drug candidates. *Chem Res Toxicol* 2016;29(12):1936-55.
- Lauschke VM, Shafagh RZ, Hendriks DFG, Ingelman-Sundberg M. 3D primary hepatocyte culture systems for analyses of liver diseases, drug metabolism, and toxicity: Emerging culture paradigms and applications. *Biotechnol J* 2019;14(7):1-12.

- Lee JH et al. Differences between immunodeficient mice generated by classical gene targeting and CRISPR/Cas9-mediated gene knockout. *Transgenic Res* 2018;27(3):241-51.
- Lehmann JM, McKee DD, Watson MA, Willson TM, Moore JT, Kliewer SA. The human orphan nuclear receptor PXR is activated by compounds that regulate CYP3A4 gene expression and cause drug interactions. *J Clin Invest* 1998;102(5):1016-23.
- Lin W et al. SPA70 is a potent antagonist of human pregnane X receptor. *Nat Commun* 2017;8(1):1-14.
- Lin W, Chen T. Using TR-FRET to Investigate Protein-Protein Interactions: A Case Study of PXR-Coregulator Interaction. *Adv Protein Chem Struct Biol* 2018;110:31-63.
- López-Terrada D, Cheung SW, Finegold MJ, Knowles BB. Hep G2 is a hepatoblastoma-derived cell line. *Hum Pathol* 2009;40(10):1512-5.
- Lu C, Di L. In vitro and in vivo methods to assess pharmacokinetic drug-drug interactions in drug discovery and development. *Biopharm Drug Dispos* 2020;41(1-2):3-31.
- Macherey AC, Dansette PM. Biotransformations Leading to Toxic Metabolites: Chemical Aspects. In: Wermuth CG, Aldous D, Raboisson P, Rognan D, eds. *The Practice of Medicinal Chemistry*. 4th ed. Cambridge: Academic Press, 2015:674-96.
- Mackowiak B, Hodge J, Stern S, Wang H. The Roles of xenobiotic receptors: Beyond chemical disposition. *Drug Metab Dispos* 2018;46(9):1361-71.
- Mackowiak B, Wang H. Mechanisms of xenobiotic receptor activation: Direct vs. indirect. *Biochim Biophys Acta* 2016;1859(9):1130-40.
- Mahmood T, Yang PC. Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *N Am J Med Sci* 2012;4(9):429-34.
- Mani S, Dou W, Redinbo MR. PXR antagonists and implication in drug metabolism. *Drug Metab Rev* 2013;45(1):60-72.
- Martínez-Jiménez CP, Jover R, Donato MT, Castell JV, Gómez-Lechón MJ. Transcriptional regulation and expression of CYP3A4 in hepatocytes. *Curr Drug Metab* 2007;8(2):185-94.
- Mohri T, Nakajima M, Fukami T, Takamiya M, Aoki Y, Yokoi T. Human CYP2E1 is regulated by miR-378. *Biochem Pharmacol* 2010;79(7):1045-52.
- Mohutsky MA, Romeike A, Meador V, Lee WM, Fowler J, Francke-Carroll S. Hepatic drug-metabolizing enzyme induction and implications for preclinical and clinical risk assessment. *Toxicol Pathol* 2010;38(5):799-809.

- Morinha F, Cabral JA, Bastos E. Molecular sexing of birds: A comparative review of polymerase chain reaction (PCR)-based methods. *Theriogenology* 2012;78(4):703-14.
- Naritomi Y, Sanoh S, Ohta S. Chimeric mice with humanized liver: Application in drug metabolism and pharmacokinetics studies for drug discovery. *Drug Metab Pharmacokinet* 2018;33(1):31-9.
- Navarro E, Serrano-Heras G, Castaño MJ, Solera J. Real-time PCR detection chemistry. *Clin Chim Acta* 2015;439:231-50.
- Nguyen A, Bouscarel B. Bile acids and signal transduction: role in glucose homeostasis. *Cell Signal* 2008;20(12):2180-97.
- Nigam SK. What do drug transporters really do? *Nat Rev Drug Discov* 2015;14(1):29-44.
- Nyaruaba R, Mwaliko C, Kering KK, Wei H. Droplet digital PCR applications in the tuberculosis world. *Tuberculosis (Edinb)* 2019;117:85-92.
- Oladimeji PO, Chen T. PXR: More than just a master xenobiotic receptor. *Mol Pharmacol* 2018;93(2):119-27.
- Omicinski CJ, Vanden Heuvel JP, Perdew GH, Peters JM. Xenobiotic metabolism, disposition, and regulation by receptors: from biochemical phenomenon to predictors of major toxicities. *Toxicol Sci* 2011;120(Suppl 1):49-75.
- Omura H et al. Establishment and characterization of a new cell line permissive for hepatitis C virus infection. *Sci Rep* 2019;9(1):1-14.
- Pávek P. Pregnane X receptor (PXR)-mediated gene repression and cross-talk of PXR with other nuclear receptors via coactivator interactions. *Front Pharmacol* 2016;7:1-16.
- Pelkonen O, Hakkola J, Hukkanen J, Turpeinen M. CYP-associated drug-drug interactions: A mission accomplished? *Arch Toxicol* 2020;94(11):3931-4.
- Peltz G. Can 'humanized' mice improve drug development in the 21st century? *Trends Pharmacol Sci* 2013;34(5):255-60.
- Pondugula SR, Pávek P, Mani S. Pregnane X receptor and cancer: context-specificity is key. *Nucl Receptor Res* 2016;3:1-20.
- Quan PL, Sauzade M, Brouzes E. dPCR: A Technology Review. *Sensors (Basel)* 2018;18(4):1-27.
- Ramachandran SD et al. Applicability of second-generation upcyte® human hepatocytes for use in CYP inhibition and induction studies. *Pharmacol Res Perspect* 2015;3(5):1-17.

- Ramboer E et al. Strategies for immortalization of primary hepatocytes. *J Hepatol* 2014;61(4):925-43.
- Raucy JL, Lasker JM. Current in vitro high throughput screening approaches to assess nuclear receptor activation. *Curr Drug Metab* 2010;11(9):806-14.
- Riedel G, Rüdrieh U, Fekete-Drimusz N, Manns MP, Vondran FW, Bock M. An extended Δ CT-method facilitating normalisation with multiple reference genes suited for quantitative RT-PCR analyses of human hepatocyte-like cells. *PLoS One* 2014;9(3):1-5.
- Ripp SL et al. Use of immortalized human hepatocytes to predict the magnitude of clinical drug-drug interactions caused by CYP3A4 induction. *Drug Metab Dispos* 2006;34(10):1742-8.
- Rosette C et al. Rifamycin SV exhibits strong anti-inflammatory in vitro activity through pregnane X receptor stimulation and NF κ B inhibition. *Drug Metab Pharmacokinet* 2019;34(3):172-80.
- Sanders R, Mason DJ, Foy CA, Huggett JF. Considerations for accurate gene expression measurement by reverse transcription quantitative PCR when analysing clinical samples. *Anal Bioanal Chem* 2014;406(26):6471-83.
- Scheer N, Wilson ID. A comparison between genetically humanized and chimeric liver humanized mouse models for studies in drug metabolism and toxicity. *Drug Discov Today* 2016;21(2):250-63.
- Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 2008;3(6):1101-8.
- Shukla SJ et al. Identification of pregnane X receptor ligands using time-resolved fluorescence resonance energy transfer and quantitative high-throughput screening. *Assay Drug Dev Technol* 2009;7(2):143-69.
- Sinz M, Wallace G, Sahi J. Current industrial practices in assessing CYP450 enzyme induction: preclinical and clinical. *AAPS J* 2008;10(2):391-400.
- Sinz MW. Evaluation of pregnane X receptor (PXR)-mediated CYP3A4 drug-drug interactions in drug development. *Drug Metab Rev* 2013;45(1):3-14.
- Skálová L et al. *Metabolismus léčiv a jiných xenobiotik*. Druhé, upravené a rozšířené vydání. Praha: Karolinum, 2017:1-171.

- Skrzypski M. Quantitative reverse transcriptase real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) in translational oncology: lung cancer perspective. *Lung Cancer* 2008;59(2):147-54.
- Směrnice Evropského parlamentu a Rady 2010/63/EU ze dne 22. září 2010 o ochraně zvířat používaných pro vědecké účely.
- Smutný T, Mani S, Pávek P. Post-translational and post-transcriptional modifications of pregnane X receptor (PXR) in regulation of the cytochrome P450 superfamily. *Curr Drug Metab* 2013;14(10):1059-69.
- Sreejith KR, Ooi CH, Jin J, Dao DV, Nguyen NT. Digital polymerase chain reaction technology – recent advances and future perspectives. *Lab Chip* 2018;18(24):3717-32.
- Staudinger JL et al. The nuclear receptor PXR is a lithocholic acid sensor that protects against liver toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(6):3369-74.
- Strom SC, Davila J, Grompe M. Chimeric mice with humanized liver: tools for the study of drug metabolism, excretion, and toxicity. *Methods Mol Biol* 2010;640:491-509.
- Taylor SC, Berkelman T, Yadav G, Hammond M. A defined methodology for reliable quantification of Western blot data. *Mol Biotechnol* 2013;55(3):217-26.
- Taylor SC, Laperriere G, Germain H. Droplet Digital PCR versus qPCR for gene expression analysis with low abundant targets: from variable nonsense to publication quality data. *Sci Rep.* 2017;7(1):1-8.
- Tolosa L et al. Human upcyte hepatocytes: Characterization of the hepatic phenotype and evaluation for acute and long-term hepatotoxicity routine testing. *Toxicol Sci* 2016;152(1):214-29.
- Tolson AH, Wang H. Regulation of drug-metabolizing enzymes by xenobiotic receptors: PXR and CAR. *Adv Drug Deliv Rev* 2010;62(13):1238-49.
- Tunbridge EM, Eastwood SL, Harrison PJ. Changed relative to what? Housekeeping genes and normalization strategies in human brain gene expression studies. *Biol Psychiatry* 2011;69(2):173-9.
- Urquhart BL, Tirona RG, Kim RB. Nuclear receptors and the regulation of drug-metabolizing enzymes and drug transporters: implications for interindividual variability in response to drugs. *J Clin Pharmacol* 2007;47(5):566-78.
- VanGuilder HD, Vrana KE, Freeman WM. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *Biotechniques* 2008;44(5):619-26.

- Vlach M et al. Cytochrome P450 1A1/2, 2B6 and 3A4 HepaRG cell-based biosensors to monitor hepatocyte differentiation, drug metabolism and toxicity. *Sensors (Basel)* 2019;19(10):1-17.
- Wahli W. A gut feeling of the PXR, PPAR and NF- κ B connection. *J Intern Med* 2008;263(6):613-9.
- Wang YM, Chai SC, Brewer CT, Chen T. Pregnane X receptor and drug-induced liver injury. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2014;10(11):1521-32.
- Waring RH. Cytochrome P450: genotype to phenotype. *Xenobiotica* 2020;50(1):9-18.
- Waters DLE, Shapter FM. The Polymerase Chain Reaction (PCR): General Methods. In: Henry RJ, Furtado A, eds. *Cereal Genomics*. Totowa: Humana Press, 2014:65-75.
- Weber A, Groyer-Picard MT, Franco D, Dagher I. Hepatocyte transplantation in animal models. *Liver Transpl* 2009;15(1):7-14.
- Westerink WM, Schoonen WG. Phase II enzyme levels in HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes and their induction in HepG2 cells. *Toxicol In Vitro* 2007;21(8):1592-602
- Williamson BL et al. Quantitative protein determination for CYP induction via LC-MS/MS. *Proteomics* 2011;11(1):33-41.
- Wu B, Li S, Dong D. 3D structures and ligand specificities of nuclear xenobiotic receptors CAR, PXR and VDR. *Drug Discov Today* 2013;18(11-12):574-81.
- Xia L et al. Cytochrome P450 induction response in tethered spheroids as a three-dimensional human hepatocyte in vitro model. *J Appl Toxicol* 2016;36(2):320-9.
- Xing Y, Yan J, Niu Y. PXR: a center of transcriptional regulation in cancer. *Acta Pharm Sin B* 2020;10(2):197-206.
- Yamasaki Y et al. Characterization of P-Glycoprotein Humanized Mice Generated by Chromosome Engineering Technology: Its Utility for Prediction of Drug Distribution to the Brain in Humans. *Drug Metab Dispos* 2018;46(11):1756-66.
- Yang K et al. Sandwich-cultured hepatocytes as a tool to study drug disposition and drug-induced liver injury. *J Pharm Sci* 2016;105(2):443-59.
- Yoon E, Babar A, Choudhary M, Kutner M, Pysopoulos N. Acetaminophen-induced hepatotoxicity: a comprehensive update. *J Clin Transl Hepatol* 2016;4(2):131-42.

Zamek-Gliszczyński MJ et al. Intestinal P-gp and Putative Hepatic OATP1B Induction: International Transporter Consortium Perspective on Drug Development Implications. *Clin Pharmacol Ther* 2021;109(1):55-64.

Zanger UM, Schwab M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacol Ther* 2013;138(1):103-41.

Zeilinger K, Freyer N, Damm G, Seehofer D, Knöspel F. Cell sources for in vitro human liver cell culture models. *Exp Biol Med (Maywood)* 2016;241(15):1684-98.

Zhao Y et al. Biological Characteristics of Severe Combined Immunodeficient Mice Produced by CRISPR/Cas9-Mediated Rag2 and IL2rg Mutation. *Front Genet* 2019;10:1-10.

Elektronické zdroje

Giri D. Polymerase chain reaction (PCR): Principle, procedure, components, types and applications. In: *LaboratoryInfo*. 2020. Dostupné na URL: laboratoryinfo.com/polymerase-chain-reaction-pcr. Přístup 17. 8. 2020.