

In vitro modeli za preučevanje metabolizma učinkovin v jetrih

In vitro models for investigation of drug metabolism in the liver

Tina Trdan Lušin, Jurij Trontelj

Povzetek: V prispevku so sistematično predstavljeni eksperimentalni modeli za preučevanje jetrnega metabolizma učinkovin *in vitro*. Opisani so naslednji modeli po rastoči stopnji kompleksnosti: rekombinantni encimi, mikrosomi, citosol, S9 frakcija, izolirani hepatociti, celične linije, jetrne rezine in perfundirana jetra. Predstavljene so njihove prednosti, slabosti in omejitve ter področja uporabe.

Gljučne besede: *metabolizem zdravilnih učinkovin, eksperimentalni modeli.*

Abstract: This article gives a systematic review of *in vitro* experimental models for hepatic drug metabolism. The presented models include: recombinant enzymes, microsomes, cytosol, S9 fraction, isolated hepatocytes, cell lines, liver tissue slices and perfused liver. For each model, a comprehensive overview is given, including application, benefits, and drawbacks.

Keywords: *drug metabolism, experimental models.*

1 Uvod

V zadnjih desetih letih se je zelo povečalo število raziskav na področju metabolizma zdravilnih učinkovin, tako na univerzah kot tudi v industriji, ker se je izkazalo, da je bilo v preteklosti kar 40% novih učinkovin ustavljenih v kasnejših fazah razvoja zdravila ravno zaradi neustreznih farmakokinetičnih oz. toksikoloških lastnosti, ki so povezane z metabolizmom ali drugimi vzroki. Procese LADME-T (Liberation – sproščanje, Absorption – absorpcija, Distribution – porazdelitev, Metabolism – metabolizem, Excretion – izločanje, Toxicology – toksikologija) intenzivno preučujejo na več stopnjah razvoja novih zdravil, zato da se, kar se da hitro, pravilno predvidi *in vivo* obnašanje nove učinkovine v človeškem telesu oziroma, da se primerno optimizira spojino vodnico (1). Pri tem so se v preteklosti večinoma uporabljale različne laboratorijske živali, ki so mnogokrat dajale povsem napačne napovedi za metabolizem nove učinkovine v človeku zaradi velikih razlik v metabolnih encimih med vrstami. Ob enem pa so raziskave na živalih zelo drage in v očeh laične javnosti tudi etično sporne. Posledično je prišlo do velikega napredka v razvoju *in vitro* eksperimentalnih modelov za metabolizem učinkovin, izpeljanih iz človeških tkiv, ki imajo mnogokrat boljše napovedno vrednost kot poskusi na živalih, ki se jim pa kljub temu še vedno ne da popolnoma izogniti (2). *In vitro* modeli izpeljani iz človeških tkiv so etično manj sporni, ker se uporabijo tkiva, ki bi se sicer zavržla kot odvečna tkiva pri transplantacijah.

Glavno mesto metabolizma učinkovin predstavljajo jetra. Težnja po čim boljšem napovedovanju metabolnih in transportnih procesov ter napovedovanju hepatotoksičnosti *in vivo* je privedla do razvoja eksperimentalnih modelov za preučevanje metabolizma *in vitro*. Ti modeli, ki poenostavljeno posnemajo pogoje v organizmu, se po svoji strukturi in kompleksnosti ločijo na: subcelične (mikrosomi,

rekombinantni encimi, citosol, S9 frakcija), celične (izolirani in kultivirani hepatociti, nesmrtno celične linije), tkivne (izolirano vitalno tkivo) in organske (npr. perfundirana jetra).

2 In vitro modeli

V nadaljevanju prispevka so predstavljeni posamezni *in vitro* modeli po rastoči kompleksnosti in s tem tudi po rastoči napovedni moči. Z njimi lahko ugotovimo, s katerimi encimi oz. izoformami preiskovana učinkovina vstopa v interakcije (se metabolizira ali jih inhibira, aktivira...), računamo lahko intrinzični očistek (definiran kot merilo encimske aktivnosti in je neodvisen od fizioloških parametrov, kot so pretok skozi organ ali vezava učinkovine na plazemske proteine). Iz intrinzičnega očistka lahko s skaliranjem izračunamo očistek organa in s seštevanjem organskih očistkov dobimo očistek organizma. Nadalje lahko ugotovljamo mehanizem interakcij med zdravili, med zdravili in prehranskimi dopolnili na nivoju metabolizma učinkovin in hepatotoksičnost preiskovanih učinkovin. Poleg tega lahko s pomočjo nekaterih omenjenih *in vitro* modelov ugotovljamo možnosti za različne odzive na zdravilo med različnimi populacijami pacientov (različni genotipi za metabolne encime).

2.1 Subcelične frakcije

Med subcelične frakcije uvrščamo: jetrni homogenat, S9 frakcijo, citosol, mikrosome, rekombinantne encime, peroksisome, mitohondrije, lizosome in jedrne frakcije. Subcelične frakcije so eden prvih *in vitro* sistemov za preučevanje metabolizma in toksičnosti, mikrosomi pa še danes predstavljajo glavni *in vitro* sistem v zgodnjih fazah razvoja novih zdravilnih učinkovin. Prednosti subceličnih frakcij za uporabo pri

raziskovanju metabolizma so enostavna priprava, fleksibilnost inkubacijskih pogojev in enostavni protokoli za dolgotrajno shranjevanje. Poleg prednosti pa imajo subcelične frakcije tudi slabosti, ki so: nestabilnost nekaterih encimov med pripravo, izguba celične heterogenosti (v primeru, da organ sestavlja več različnih vrst celic), omejitev zaporednega metabolizma, saj je za to potrebna prisotnost več različnih kofaktorjev ali več subceličnih komponent (3).

2.1.1 Mikrosomi

Mikrosomi so majhni membranski vezikli velikosti 20-200 nm. Nastanejo po homogenizaciji tkiva in diferencialnem ultracentrifugiranju. V njih so prisotni encimi I. in tudi nekateri encimi II. faze, ki so odgovorni za metabolizem učinkovin. Tako vsebujejo citokrome P450 (CYP), flavinske monooksigenaze (FMO), epoksidne hidrolaze, uridindifosfat glukuronozil transferaze (UGT), esteraze, amidaze, glutation-S-transferaze (GST) in metiltransferaze (3, 4, 5).

Njihova prednost je, da dajejo precej ponovljive rezultate, imajo visoko vsebnost metabolnih encimov in izkazujejo relativno majhno nespecifično vezavo učinkovin. Da se jih dobro shranjevati, tudi po večkratnem zamrzovanju in odtajevanju dajejo ponovljive rezultate. Vse to so razlogi, da so mikrosomi še danes najpogosteje uporabljan *in vitro* sistem za preučevanje metabolizma (5, 6, 7). Z njimi lahko napovedujemo poti metabolizma učinkovine in identificiramo ter pridobivamo standarde metabolitov. Mikrosomi so glavni *in vitro* sistem za ocenjevanje metabolne stabilnosti (napoved očistka), določanje parametrov encimske kinetike, inhibicijskega potenciala učinkovine, za primerjavo metabolizma med vrstami in za reakcijsko fenotipiziranje v predkliničnih raziskavah (8, 9).

Pomanjkljivost uporabe mikrosomov je nezanesljivost kvantitativne ocene očistka *in vivo*, saj je v mikrosomih povečana količina CYP in UGT encimov, odsotno pa je tekmovanje z drugimi encimi (6). Dodaten problem predstavlja dostopnost do aktivnega mesta mikrosomskih encimov, ki je v nekaterih primerih, kot na primer pri UGT v notranjosti mikrosoma. Difuzijsko bariero, ki jo predstavlja njegova membrana, lahko prekinemo s pomočjo močnega ultrazvoka, površinsko aktivnih snovi (npr. Brij 58) ali pa z almeticinom, ki tvori pore v membrani. Če tega ne storimo, lahko določimo nižji jetrni očistek od dejanskega (10).

2.1.2 Rekombinantni encimi

Rekombinantni encimi so mikrosomi pridobljeni iz celic insektov predhodno transfeciranih z bakulovirusom kot vektorjem za rekombinanten vnos CYP-ov ali UGT-jev, kateri pri insektih niso endogeno izraženi. S pomočjo rekombinantnih encimov lahko raziskujemo vpliv posameznega CYP ali UGT encima pri metabolni poti preučevane učinkovine. Za delovanje encimov je potreben dodatek ustreznih kofaktorjev (6).

Glavna prednost rekombinantnih encimov je, da so uporabni tako za raziskovanje vpliva določenega encima pri metabolizmu učinkovine kot tudi za ugotavljanje interakcij med učinkovinami. Njihova slabost pa je (tako kot pri mikrosomih), da se aktivno mesto UGT encimov nahaja v notranjosti, zaradi česar brez uporabe snovi, ki luknja membrano, pride do zakasnjene glukuronidacije. Rekombinantni encimi so lahko dober nadomestek človeških jetrnih mikrosomov, zato se bo najverjetneje njihova uporaba v prihodnosti še povečala (6).

2.1.3 Citosolne frakcije človeških jeter

Citosolno frakcijo pridobimo z diferencialnim ultracentrifugiranjem homogenata jeter in vsebuje citosolne encime II. faze. Za katalitsko aktivnost encimov pa je potreben dodatek eksogenih kofaktorjev (6).

V primerjavi s S9 frakcijo človeških jeter je prednost citosolne frakcije, da so le trije encimi prisotni v višjih koncentracijah. Metabolizem z N-acetil-transferazo (NAT), sulfotransferazo (ST) in GST se lahko preučuje v kombinaciji ali pa vsak encim posebej (odvisno od dodanih kofaktorjev). Slabost tega eksperimentalnega modela je prisotnost le citosolnih encimov II. faze, ne pa tudi UGT-jev, ki se nahajajo v endoplazemskem retikulumu (6).

V raziskavah metabolizma učinkovin se citosolna frakcija ne uporablja prav pogosto. Najverjetneje pa se bo njena uporaba v prihodnosti povečala, saj se raziskovalci vse bolj zavedajo, da za metabolizem niso odgovorni le CYP encimi ampak še cela vrsta drugih encimov (6).

2.1.4 Človeška jetrna S9 frakcija

S9 frakcija je definirana kot supernatant, ki ostane po dvajset minutnem centrifugiranju tkivnega homogenata v polju 9000 G in vsebuje tako mikrosomsko kot tudi citosolno frakcijo (11). Podobno kot pri rekombinantnih encimih in mikrosomih, je tudi tu potrebna uporaba ustreznih kofaktorjev. V primerjavi z mikrosomi in citosolom omogoča S9 frakcija bolj popolno predstavitev metabolnega profila, saj vključuje tako encime I. kot tudi II. faze metabolizma. Zaenkrat uporaba S9 frakcije ni zelo velika, najverjetneje pa se bo v prihodnosti zaradi velikega pomena poznavanja celotne metabolne poti povečala (5,6).

2.2 Celične kulture

2.2.1 Izolirani hepatociti

Velik napredek na področju preučevanja metabolizma učinkovin je bil dosežen z uspešno izolacijo, gojenjem in krioprezervacijo človeških hepatocitov, ki se zdaj že rutinsko uporabljajo v razvoju učinkovin kot eksperimentalni model za oceno vrstno-specifičnih lastnosti učinkovin (metabolizem, medsebojne interakcije in toksičnost) (3). V primerjavi z mnogimi ostalimi *in vitro* tehnikami, kot so izolirani encimi, subcelične frakcije ali homogenati, hepatociti tako veliko bolje predstavljajo dogajanje *in vivo*, zato jih uporabljamo v študijah metabolizma učinkovin, interakcij in ocenjevanju njihove toksičnosti (12).

Lahko uporabimo sveže izolirane hepatocite, ali pa izolirane hepatocite, ki jih kultiviramo. Sveže izolirani hepatociti v suspenziji predstavljajo preprost sistem za preučevanje jetrnega metabolizma in so primerni predvsem za študije primerjave hitrosti in poteka metabolizma med vrstami, določanje jetrnega očistka, napovedovanje interakcij med učinkovinami in tvorbe toksičnih metabolitov. Prednost tega sistema pred celičnimi kulturami je v fiziološki aktivnosti in popolni zastopanosti encimov, ki jih vsebujejo sveži hepatociti. Poleg tega hepatociti v suspenziji ne zahtevajo dodajanja kofaktorjev, potrebujejo le ustrezen medij s hranilnimi snovmi nujnimi za celično preživetje. Ker jetrne celice živijo le, če so pritrjene na substrat, je njihovo preživetje v suspenziji omejeno na 3-4 ure, nato pa opazimo naglo celično smrt. Omenjena pomanjkljivost preprečuje uporabo tega sistema v dolgotrajnih študijah metabolnih procesov. Izolirane hepatocite pa se lahko tudi kultivira, s čimer pridobijo sposobnost preučevanja dolgotrajnih metabolnih, farmakoloških ali toksikoloških procesov (3). Alternativa uporabi

hepatocitov v kulturi je uporaba »sendvič kulture« hepatocitov ter kokultivacija hepatocitov z intestinalnimi bakterijami. Hepatocitna sendvič kultura med dvema plastema zunajceličnega matriksa predstavlja *in vitro* model s ponovno vzpostavljeno jetrno polarizacijo, stabilnimi funkcijami diferenciacije in aktivnostjo, ki je obnovljena v nekaj dneh po izolaciji (13). Novo razviti *in vitro* model kokultivacije hepatocitov z intestinalnimi bakterijami je prvi, ki omogoča direktno preučevanje metabolne interakcije jeter in intestinalne flore. Še posebej je ta model primeren za preučevanje metabolizma učinkovin, ki zapadejo enterohepatički cirkulaciji (14).

2.2.2 Nesmrtni celične linije

Hepatocitne celične linije tumorskega izvora in tiste pridobljene z onkogeno nesmrtnostjo kljub enostavnosti gojenja predstavljajo manj priljubljen model za *in vitro* študije metabolizma učinkovin. Njihovo bolj razširjeno uporabo omejuje izguba različnih jetrno specifičnih funkcij in nepopolno izražanje vseh družin metabolnih encimov, kar onemogoča posnemanje normalne fiziologije parenhimskih jetrnih celic (6).

Najbolj pogosto uporabljeno in preučevano linijo človeških jetrnih celic tumorskega izvora predstavlja linija HepG2, ki izraža vse encime II. faze, v standardnih pogojih gojenja pa kaže komaj zaznaven nivo izražanja CYP. Fiziološka ekspresija encimov II. faze v kombinaciji z znižanim oz. neznatnim izražanjem CYP lahko daje napačno sliko metabolizma in toksičnosti spojin, ki se metabolizirajo predvsem z encimi I. faze, zato je pri interpretaciji rezultatov pridobljenih na HepG2 celični liniji potrebna večja pozornost. Po drugi strani pa ista celična linija predstavlja enostavno orodje v študijah regulacije encimov II. faze metabolizma (15).

Poleg HepG2 celične linije se uporablja še druge celične linije kot npr. BC2 in HepaRG celični liniji. Za BC2 celično linijo je značilno predvsem izražanje glavnih vrst CYP ter encimov II. faze, kot sta GST in UGT, katerih aktivnost pa je v primerjavi s sveže izoliranimi hepatociti še vedno nizka (3). Za HepaRG je značilno, da v nasprotju z drugimi tumorskimi celičnimi linijami izkazujejo le omejene kariotipske spremembe. Njihova univerzalna lastnost je, da pri nasaditvi z nizko gostoto dobro diferencirane in medsebojno zraščene celice transdiferencirajo. Tako dobimo dva morfološko različna tipa celic: prvi tvori skupke granularanih epitelijskih celic, ki posnemajo hepatocite, drugi tip, ki obdaja prve, pa predstavlja ploščate celice z bistro citoplazmo. V primerjavi z ostalimi hepatomskimi celičnimi linijami vključno s HepG2, izražajo HepaRG celice različne citokrome, encime II. faze in jedrne receptorje kot sta konstitutivni androstanski receptor in pregnan X receptor na nivoju primerljivem z gojenimi primarnimi človeškimi hepatociti. HepaRG celice bi lahko predstavljale ustrezno alternativo primarnim človeškim hepatocitom v študijah metabolizma in toksičnosti učinkovin (16).

Ker uporabnost jetrnih celic sovпада z njihovo sposobnostjo izražanja encimov I. in II. faze, povečano ekspresijo CYP ali drugih zelenih encimov, lahko dosežemo s transfekcijo celic s plazmidom. V tem primeru govorimo o transgenih celičnih linijah. Transgene celične linije uporabljamo v študijah ene same encimske reakcije in vpliva enega ali kombinacije izoencimov na metabolizem učinkovin (6).

2.3 Jetrne rezine

Po razvoju zelo natančnih tkivnih rezalnikov, ki omogočajo pripravo rezin enakomerne debeline 100-1000 µm, je inkubacija rezin jeter v mediju

bogatem s hranili postala eno pomembnejših orodij v raziskavah metabolizma učinkovin *in vitro* (17).

Glavna prednost jetrnih rezin pred primarnimi hepatociti je v ohranjeni celični in tkivni arhitekturi, ki omogoča ne le vpogled v hepatocitni pač pa tudi nehepatocitni metabolizem. Ohranjena celična heterogenost in medcelične interakcije v originalnem tkivnem matriksu bolje odsevajo visoko organiziranost jetrnega tkiva, kar omogoča boljše posnemanje dejanskih fizioloških pogojev v organu. Uporaba jetrnih rezin kot modela pa ima tudi nekatere pomanjkljivosti. Mednje spadajo omejena sposobnost prodiranja medija v globlje plasti tkiva, poškodba celic na zunanji strani rezine in kratka življenjska doba tkiva (18).

2.4 Perfundirana jetra

Ker so jetra glavni organ, ki je vključen v metabolizem večine učinkovin, se tudi metabolični poskusi najpogosteje izvajajo na celih jetrih. Najpogosteje se uporabljajo izolirana podganja jetra; in sicer za namen ocenjevanja eliminacije učinkovine prek jeter, primerjavo *in vitro* in *in vivo* ocen očiščka učinkovine, pojasnjevanje nelinearne eliminacije učinkovine, razlago vpliva vezave učinkovine na plazemske proteine na njen očišček, ugotavljanje vrste encima, ki vpliva na detoksifikacijo ali bioaktivacijo učinkovine ter za biosintezo metabolitov učinkovine (3). Po drugi strani se perfundirana jetra le redko uporabljajo v študijah metabolizma. Eden od vzrokov za to je, da človeška jetra niso na razpolago, živalska jetra pa niso vedno ustrezen model za opis metabolizma učinkovin v človeku. Med slabosti tega modela prištevamo tudi zahtevnost izvedbe, slabo reproducibilnost in omejitve funkcionalne integritete na 3 ure. Prednosti tega *in vitro* jetrnega modela pred ostalimi pa so, da najbolje predstavlja *in vivo* situacijo, omogoča zbiranje in analizo žolča, ohranjena je tridimenzionalna arhitektura tkiva, prisotne so vse vrste celic, zato je prisoten tudi metabolizem, ki se ne dogaja v hepatocitih (6).

V primerjavi s perfundiranimi jetri so jetrne rezine le malenkost slabše, zato se slednje v farmakokinetičnih študijah pogosteje uporabljajo. Model perfundiranih živalskih jeter je v prednosti le v primeru, kadar želimo spremljati sekrecijo žolča ali pa to metodo uporabimo za validacijo druge *in vitro* metode (6).

3 Zaključek

Uporaba eksperimentalnih sistemov za *in vitro* preučevanje metabolizma predstavlja napredek v farmacevtski znanosti. Uporaba teh sistemov ne vodi le do boljšega razumevanja metabolizma, ki pogosto omejuje učinkovitost zdravilnih učinkovin oz. kandidatov za učinkovine, temveč tudi do povečanega obsega raziskav izvedenih v predkliničnih študijah in posledično do izboljšanja učinkovitosti in varnosti zdravil, ki pridejo v klinično fazo preizkušanj. Z optimizacijo farmakoloških in farmakokinetičnih lastnosti učinkovin v razvoju ter njihovimi strukturnimi modifikacijami tudi pripomoremo k povečanju števila spojin, ki uspejo v kliničnih študijah. Na ta način se zmanjšajo stroški in čas, ki so potrebni za uvedbo novega zdravila v klinično prakso.

4 Literatura

1. Ruiz-Garcia A, Bermejo M, Moss A et al. Pharmacokinetics in drug discovery. *J Pharm Sci* 2008; 97 (2):654-690.

2. Ito K, Houston JB. Prediction of human drug clearance from in vitro and preclinical data using physiologically based and empirical approaches. *Pharm Res* 2005; 22 (1): 103-112.
3. Pearson P, Wienkers LC. Handbook of drug metabolism, 2. ed. Informa Healthcare, 2009: 445-492.
4. Gómez-Lechón MJ, Castell JV, Donato MT. Hepatocytes-the choice to investigate drug metabolism and toxicity in man: in vitro variability as a reflection of in vivo. *Chem Biol Interact* 2007; 168 (1): 30-50.
5. Hariparsad N, Sane RS, Strom SC et al. In vitro methods in human drug biotransformation research: implications for cancer chemotherapy. *Toxicol In Vitro* 2006; 20 (2): 135-153.
6. Brandon EFA, Raap CD, Meijerman I et al. An update on in vitro test methods in human hepatic drug biotransformation research: pros and cons. *Toxicol Appl Pharmacol* 2003; 189 (3): 233-246.
7. Baranczewski P, Stańczyk A, Kautiainen A et al. Introduction to early in vitro identification of metabolites of new chemical entities in drug discovery and development. *Pharmacol Rep* 2006; 58 (3): 341-352.
8. Sinz MW. Drug metabolism in preclinical development. In: Krishna R. Applications of pharmacokinetic principles in drug development; Springer, 2004: 75-132.
9. Lacarelle B, Marre F, Blanc-Gauthier T et al. Use of human and animal liver microsomes in drug metabolic studies. *Eur J Drug Metab Pharmacokin* 1991; Spec No 3: 458-465.
10. Narayanan R, LeDuc B, Williams DA. Glucuronidation of haloperidol by rat liver microsomes: involvement of family 2 UDP-glucuronosyltransferases. *Life Sci* 2004; 74 (20): 2527-2539.
11. Hakura A, Suzuki S, Satoh T. Improvement of the Ames test using human liver S9 preparation. In: Yan Z, Caldwell G. Optimization in drug discovery: in vitro methods. Humana Press, 2004: 325-336.
12. Li AP. Human hepatocytes: isolation, cryopreservation and applications in drug development. *Chem Biol Interact* 2007; 168 (1): 16-29.
13. Fahrig R, Rupp M, Steinkamp-Zucht A et al. Use of primary rat and human hepatocyte sandwich cultures for activation of indirect carcinogens: monitoring of DNA strand breaks and gene mutations in co-cultured cells. *Toxicology in Vitro* 1998; 12 (4): 431-444.
14. Gebhardt R, Hengstler JG, Müller D et al. New hepatocyte in vitro systems for drug metabolism: metabolic capacity and recommendations for application in basic research and drug development, standard operation procedures. *Drug Metab Rev* 2003; 35 (2-3): 145-213.
15. Westerink WMA, Schoonen WGEJ. Phase II enzyme levels in HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes and their induction in HepG2 cells. *Toxicol In Vitro* 2007; 21 (8): 1592-1602.
16. Guillouzo A, Corlu A, Aninat C et al. 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.
17. Lupp A, Glöckner R, Etzrodt J et al. Precision-cut liver slices from rats of different ages: basal cytochrome P450-dependent monooxygenase activities and inducibility. *Anal Bioanal Chem* 2008; 392 (6): 1173-1184.
18. Lerche-Langrand C, Toutain HJ. Precision-cut liver slices: characteristics and use for in vitro pharmaco-toxicology. *Toxicology* 2000; 153 (1-3): 221-253.