

БИОЛОГИЧНИ ТЕСТОВЕ И *IN SILICO*-МОДЕЛИ ПРИ ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ЛЕКАРСТВЕНО-ИНДУЦИРАНА ХЕПАТОТОКСИЧНОСТ

Светлана Георгиева

Катедра по фармацевтични науки, Факултет по фармация,
Медицински университет-Варна

BIOLOGICAL TESTS AND *IN SILICO* MODELS IN DETERMINING THE DRUG-INDUCED HEPATOTOXICITY

Svetlana Georgieva

Department of Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmacy, Medical University of Varna

РЕЗЮМЕ

Известно е, че черният дроб играе голяма роля при процесите на биотрансформация на химическите съединения (ксенобиотиците), вкл. фармацевтичните средства, постъпващи в тялото на бозайниците. В хода на осъществяването на тези основни биологични функции тялото е подложено на редица биохимични влияния, упражнявани от много такива съединения. При известни условия това се изразява с различни ефекти на чернодробна увреда. Целта на този обзор е да опише в сбита форма природата на чернодробна токсичност, предизвикана от лекарства, различни биологични тестове *in vitro* и *in vivo*, както и да представи новия напредък в тази област, а именно - моделирането *in silico*.

Ключови думи: фармацевтични средства, чернодробна токсичност, биологични тестове, моделиране *in silico*

ABSTRACT

It is known that the liver plays a major role in the biotransformation processes of chemical compounds (xenobiotics) including pharmaceuticals entering the body of mammals. In the course of performing these basic biological functions, the body undergoes several biochemical effects exerted by many of these compounds. Under certain conditions this is expressed in different effects of liver damage. The aim of this survey is to concisely describe the nature of liver toxicity induced by drugs, various *in vitro* and *in vivo* biological tests as well as to present the new advances in this field, namely *in silico* modeling.

Key words: pharmaceuticals, liver toxicity, biological tests, *in silico* modeling

СЪЩНОСТ НА ЛЕКАРСТВЕНО-ИНДУЦИРАНАТА ХЕПАТОТОКСИЧНОСТ

По своята същност хепатотоксичността представлява чернодробно увреждане, предизвикано от химически въздействия на различни вещества. Поради ролята му на метаболитна „лаборатория“ на организма и връзката му със стомашно-чревния тракт, черният дроб е уязвим към увреждане от лекарствени вещества и други продукти на химическата и химико-фармацевтична индустрия. Известно е, че около 75% от кръвта, постъпваща в черния дроб, пристига директно от стомашно-чревния тракт и далака през порталните вени. Поради това ксенобиотиците въздействат върху този важен орган в концентрирана форма. Мно-

го лекарства се изтеглят от фармацевтичния пазар вследствие откриването на хепатотоксични ефекти при тяхното масово приложение (1).

Неблагоприятните лекарствени ефекти върху организма се определят от два основни типа хепатотоксичност:

– Тип А: Хепатотоксичността се определя от типични фармакологични въздействия, свързани с познати и предвидими зависимости между администрираната доза и нейния ефект върху организма. При по-висока концентрация на лекарството се причинява по-голямо увреждане на черния дроб („дозата прави отровата“) и механизми на хепатотоксичност. Директното увреждане на чернодробната тъкан или блокирането

на метаболитни процеси са добре охарактеризирани. Класически пример в това отношение е хепатотоксичността, предизвикана от парацетамол при превишаване на необходимата доза (7,11);

– Тип В: Идиосинкратична (скрита) хепатотоксичност. Хепатотоксичните ефекти не може да се предвидят, не са свързани с назначаването на определена доза и имат различен скрит (латентен) период. Тази хепатотоксичност не може да се моделира на основата на определена зависимост на ефекта от дозата на лекарството (ксенобиотици). Дори и след много подробни клинични изпитания като част от процеса на одобряване от Администрацията по храни и лекарства в САЩ, някои лекарствени вещества (троглитазон и тровафлоксацин) са изтеглени от фармацевтичния пазар поради доказана идиосинкратична хепатотоксичност (7,11).

IN VIVO И IN VITRO МОДЕЛИ ЗА ХЕПАТОТОКСИЧНОСТ

Всяка година синтезирането на стотици нови лекарства води до огромни разходи за изследвания, свързани с тяхната токсичност, които може да достигнат милиони долари за всяко отделно съединение. Така развитието на *in vitro*-моделните системи за оценка на токсичността на дадено лекарство придобива първостепенна важност. Значението на тези системи за химичната токсикология се състои в предварителната оценка на механизмите на химически-индуцираната токсичност чрез използване на по-прости експериментални системи, намаляване на разходите и спестяване на страданията на опитните животни (3).

Съществуват редица *in vitro*-тестови експериментални системи за оценка на хепатотоксичността. В тях се включват: (а) изолиран орган (черен дроб), подложен на перфузия; (б) чернодробни изрезки; (в) суспензии на култури от чернодробни клетки (хепатоцити); (г) изолирани органели, мембрани или ензими; (д) компютърни модели за прогнозиране и т. н. (13). Тези *in vitro*-тестови експериментални системи са широко разпространени, тъй като чрез тях може сравнително евтино да се изследват взаимодействията на ксенобиотиците с помощта на цели (неразрушени) чернодробни клетки, което е в обхвата на експертизата на повечето лаборатории за тъканни култури, а също така и да се направят сравнения между различни биологични видове. Недостатъкът на тези системи е, че те не могат напълно да моделират сложните и взаимно-свързани взаимодействия в живия организъм и фармакокинетичните фактори. Тестовите

in vitro обикновено допълват тестовите *in vivo* с животни и се намалява броят на живите организми, които трябва да се пожертват (13). Различните системи *in vitro* позволяват определянето на механизмите на хепатотоксичност като цитотоксични изменения, нарушения в калциевата хомеостаза, нарушаване на механизмите на възстановяване на тъканите, инхибиране на транспортните протеини, метаболитната активация и ковалентно свързване с протеини, ензими и ДНК и т. н. Крайните показатели за оценка на хепатотоксичните ефекти, които може да се оценят количествено, са синтезът на албумин, съдържанието на аденозинмоно-, ди- и трифосфат, синтезът на холестерол, липопротеини и билирубин, нивата на цитохромните ензими и тяхната активност, синтезите на протеини и ДНК, на глутатион в клетките, на серумните протеини (алкална фосфатаза, аланин-трансфераза и др.), морфологичните изменения и т. н. (13). Съгласно всеобщо мнение хепатоцитните култури са най-подходящите *in vitro*-моделни системи за изследване на хепатотоксичността,

Изолираните хепатоцити представляват уникален експериментален подход за изследване на хепатотоксичността на серия от органични съединения при различни концентрации с оценка на някои крайни показатели и предварително сравняване на различни биологични видове с един и същ тип клетъчни култури (6). Първичните хепатоцити съдържат пълния набор от ензими, катализиращи биотрансформацията на ксенобиотиците, и най-добре моделират системите *in vivo* (16). Следователно те са особено полезни за определяне на механизмите, чрез които ксенобиотиците причиняват ефекти на хепатотоксичност на молекулно и клетъчно равнище (14,18).

Човешките хепатоцити предоставят най-достъпното моделиране на метаболизма и хепатотоксичността в живия организъм, целта на което са подобни изследвания. Поради ограничената им достъпност и стабилност при съхранение те се използват главно за сравнителни изследвания по отношение на други животински видове (4,5). Последните постижения в съхраняването на хепатоцити при криогенни условия преодоляват проблема с ограничената наличност на човешки хепатоцити за изследователска работа.

Друг проблем в това отношение е т. нар. генетичен полиморфизъм, проявяващ се при хепатоцитите, изолирани от различни човешки индивиди, който не е така ясно изразен при животните, отгледани в унифицирани лабораторни условия. Работата с човешки хепатоцити за из-

следване на метаболизма и токсичността на ксенобиотиците представлява предизвикателство, именно поради това разнообразие, тъй като всяка порция проби може да реагира по различен начин при инкубацията с даден химикал. Независимо от тези ограничения, човешките хепатоцити си остават най-подходящото *in vitro* приближение до реалната метаболитна ситуация в човешкия организъм (9).

Все още не е напълно ясно, дали хепатоцитите може да моделират адекватно хепатотоксичните явления *in vivo*. Допущането, че ефектите *in vitro* са в разумна степен представителни за процесите, протичащи в органите и тъканите на живия организъм, не е напълно коректно. Много трудно е да се направи „екстраполация” на молекулярните явления и други процеси в инкубационната среда *in vitro* до тези в живия организъм с неговата комплексна система от взаимосвързани органи и тъкани, насочена към елиминиране на вредните вещества чрез фармакокинетичните фактори и механизми (18). Освен това хепатотоксичността в човешкия организъм корелира трудно с оценката на подобни ефекти в другите бозайници, която е обект на регулаторните агенции (10). От друга страна, се счита, че ако един *in vitro*-тест за цитотоксичност идентифицира дадено органично съединение като хепатотоксично, съществува вероятност от около 80% тази прогноза да се потвърди и *in vivo* при човека (17).

Тестовите за хепатотоксичност *in vivo* са ограничени от етични съображения за хуманно третиране на животните. Някои автори (18) предлагат подход, който може да се използва като индикация за това, дали изследванията в изолирани клетъчни системи са валидни за живия организъм. Този подход се състои в класиране на серия от химични съединения по отношение на степента на тяхната токсичност *in vitro*, за да се демонстрира подобна класификация *in vivo* на основата на подходящ краен параметър за оценка. Подобни изследвания (19) доказват очакваните съответствия в цитотоксичните ефекти на структурно-подобни съединения при близки стойности на съответния параметър *in vitro* и *in vivo*.

Т. нар. метод на „ускорено сканиране на механизмите на цитотоксичност” (“accelerated cytotoxicity mechanism screening”, ACMS) е използван за определяне на цитотоксичната ефективност на даден ксенобиотик след двучасов инкубационен период с хепатоцити, изолирани от стандартна (Sprague-Dawley) порода на мъжки плъхове (14). При това се приема, че чрез тази *in vitro*-„цитотоксична ефективност” достатъчно добре може да се предвиди хепатотоксичността

in vivo след период на въздействие на ксенобиотика от 6 до 48 часа. Този ACMS-метод се оказва полезен за идентифициране на факторите, отговорни за токсичността. Така може да се идентифицират активните метаболити и съответните ензими, които участват в процесите на биоактивация и детоксификация на даден ксенобиотик. Основната хипотеза в случая е, че цитотоксичните молекулярни механизми, установени *in vitro* чрез използване на този метод, са подобни на онези, протичащи *in vivo*.

IN SILICO-МОДЕЛИ ЗА ПРЕДКАЗВАНЕ НА ХЕПАТОТОКСИЧНОСТТА - ОБЩИ ПОЛОЖЕНИЯ

Опитите да се „спестят” различните *in vivo*- и *in vitro*-експерименти за оценка на хепатотоксичността на химичните съединения довеждат до развитието и на теоретични модели (8,12). Много регулаторни агенции се стремят да намалят използването на животни за тестване, тъй като подобни експерименти са скъпи и често са свързани с умъртвяването на значителен брой живи организми. Алтернативните *in silico*-методи за предсказване на токсичността са основани на връзката между химичната структура, реакционната способност и токсичните ефекти на ксенобиотиците. Най-общо тези методи може да се класифицират като основани или на статистически подходи, или на експертни познания за биохимичните основи на хепатотоксичността. Освен данните за токсичност на известни съединения тук се имат предвид и редица други фактори - механизъм на крайния ефект, оценки на метаболизма, химична реакционна способност на съединенията, техни взаимодействия с биологични макромолекули и т. н. От друга страна статистическите модели са построени на основата на дадено обучаващо множество от химични съединения и количествени данни за тяхната токсичност. За тази цел се използва определен автоматизиран алгоритъм. Съществуват голям брой публикувани статистически (Q)SAR-модели (15), QSAR-методи и експертни системи (2) за *in silico*-предсказване на хепатотоксичността (2) въз основа на съществуването на характерни структурни фрагменти в молекулите на ксенобиотиците („токсикофори”) (2). Необходима е значителна допълнителна информация за описание на различните класове съединения във връзка с механизмите на техните биохимични въздействия върху организма, оценка на влиянието на физикохимичните свойства върху биологичната активност и т. н. (2).

ЛИТЕРАТУРА

1. Ангелов, А., Е. Гачев, К. Данчева, А. Кършовас, Г. Николов, Л. Сираков. Биохимия за медици и стоматолози. София, Университетско издателство "Св. Климент Охридски", 1995.
2. Chan, K. Application of quantitative structure-activity relationships to investigate xenobiotic cytotoxicity mechanisms in hepatocyte systems. PhD thesis. Toronto, University of Toronto, Graduate Department of Pharmaceutical Sciences. 2008.
3. Davila, J. C., R. J. Rodriguez, R. B. Melchert, D. Acosta, Jr. Predictive value of in vitro model systems in toxicology.- *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **38**, 1998, 63-96.
4. Davila, J. C., J. J. Xu, K. A. Hoffmaster, P. J. O'Brien, S. C. Storm. Current in vitro models to study drug-induced liver injury.- In: Hepatotoxicity. From genomics to in vitro and in vivo models. S. C. Sahu, ed. John Wiley & Sons, 2007, 3-55.
5. Guillouzo, A., C. Guguen-Guillouzo. Isolated and cultured hepatocytes. Paris, John Libby Eurotext, 1986.
6. Guillouzo, A., F. Morel, S. Langouët, K. Maheo, M. Rissel. Use of hepatocyte cultures for the study of hepatotoxic compounds.- *J. Hepatol.*, **26**, 1997, Suppl. 2, 73-80.
7. Jaeschke, H., G. J. Gores, A. I. Cederbaum, J. A. Hinson, D. Pessayre, J. J. Lemasters. Mechanisms of hepatotoxicity.- *Toxicol. Sci.*, **65**, 2002, No 2, 166-176.
8. Marchant, C. A., L. Fisk, R. R. Note, M. L. Patel, D. Suárez. An expert system approach to the assessment of hepatotoxic potential.- *Chem. Biodivers.*, **6**, 2009, No 11, 2107-2114.
9. O'Brien, P. J., K. Chan, P. M. Silber. Human and animal hepatocytes in vitro with extrapolation in vivo.- *Chem. Biol. Interact.*, **150**, 2004, No 1, 97-114.
10. Olson, H., G. Betton, J. Stritar, D. Robinson. The predictivity of the toxicity of pharmaceuticals in humans from animal data - an interim assessment.- *Toxicol. Lett.*, **102-103**, 1998, 535-538.
11. Patel, T., L. R. Roberts, B. A. Jones, G. J. Gores. Dysregulation of apoptosis as a mechanism of liver disease: an overview.- *Semin. Liver Dis.*, **18**, 1998, No 2, 105-114.
12. Richard, A. M. Future of toxicology - predictive toxicology: An expanded view of "chemical toxicity".- *Chem. Res. Toxicol.*, **19**, 2006, No 10, 1257-1262.
13. Silber, P. M., C. E. Ruegg, N. Myslinski. In vitro methods for predicting human toxicity.- *Lab. Animal*, **23**, 1994, No 3, 33-37.
14. Siraki, A. G., T. Chevaldina, M. Y. Moridani, P. J. O'Brien. Quantitative structure-toxicity relationships by accelerated cytotoxicity mechanism screening.- *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.*, **7**, 2004, No 1, 118-125.
15. Sklarew, M. Toxicity tests in animals: alternative models.- *Environ. Health Perspect.*, **101**, 1993, No 4, 288-291.
16. Sturgill, M. G., G. H. Lambert. Xenobiotic-induced hepatotoxicity: mechanisms of liver injury and methods of monitoring hepatic function.- *Clin. Chem.*, **43**, 1997, No 8, Pt. 2, 1512-1526.
17. Tuschl, G., J. Hrach, P. G. Hewitt, S. O. Mueller. Application of short- and long-term hepatocyte cultures to predict toxicities.- In: Hepatotoxicity. From genomics to in vitro and in vivo models. S. C. Sahu, ed. John Wiley & Sons, 2007, 141-174.
18. Tyson, C. A., K. Hawk-Prather, D. L. Story, D. H. Gould. Correlations of in vitro and in vivo hepatotoxicity for five haloalkanes.- *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **70**, 1983, No 2, 289-302.
19. Zimmerman, H. J., J. Kendler, S. Libber, L. Lukacs. Hepatocyte suspensions as a model for demonstration of drug hepatotoxicity.- *Biochem. Pharmacol.*, **23**, 1974, No 15, 2187-2189.

Адрес за кореспонденция:

доц. Светлана Георгиева, д. фарм.
 Катедра по фармацевтични науки
 Факултет по фармация
 Медицински университет-Варна
 гр. Варна 9002
 ул. „Марин Дринов“ № 55
 E-mail: fotkova@abv.bg