

MYSZY TRANSGENICZNE I CHIMERYCZNE W BADANIACH METABOLIZMU I TOKSYCZNOŚCI NOWYCH LEKÓW

Agnieszka Basińska-Ziobroń (Kraków)

Streszczenie

Wszystkie nowe leki przed wprowadzeniem na rynek farmaceutyczny przechodzą dokładne badania metaboliczne, farmakokinetyczne oraz toksykologiczne. Większość tych badań wykonywana była dotychczas na zwierzętach laboratoryjnych. Jednak różnice międzygatunkowe w ekspresji i aktywności enzymów odpowiedzialnych za metabolizm leków, głównie enzymów cytochromu P450, powodują, że wyniki badań przeprowadzonych na zwierzętach nie będą w sposób wiarygodny odzwierciedlać metabolizmu leku w organizmie ludzkim. Z tego powodu stworzono nowe modele badawcze bliższe człowiekowi. Myszy transgeniczne z ekspresją ludzkich izoenzymów cytochromu P450 (m.in. CYP2D6, CYP3A4, CYP1A2) oraz myszy chimeryczne, u których część mysich hepatocytów została zamieniona na hepatocyty ludzkie, stanowią nowoczesny i obiecujący model badawczy, a wyniki badań wykonane z ich użyciem pozwolą z dużą dokładnością przewidzieć metabolizm oraz toksyczność leków w organizmie ludzkim.

Abstract

Extrapolation of the metabolic, pharmacokinetic and toxicological data obtained from animals to human is not always straightforward because of significant species differences in drug metabolizing enzymes. Expression of cytochrome P450 enzymes is known to be different in rodents and humans. Humanized transgenic mouse, in which the human drug-metabolizing enzymes are expressed in mouse tissue and chimeric mouse, in which some part of mice hepatocytes are replaced by human cells are valuable animal models to predict metabolism and toxicity of the drug in human. This review aims to summarize the development and application of the humanized transgenic mouse expressing human drug-metabolizing enzymes and chimeric mouse.

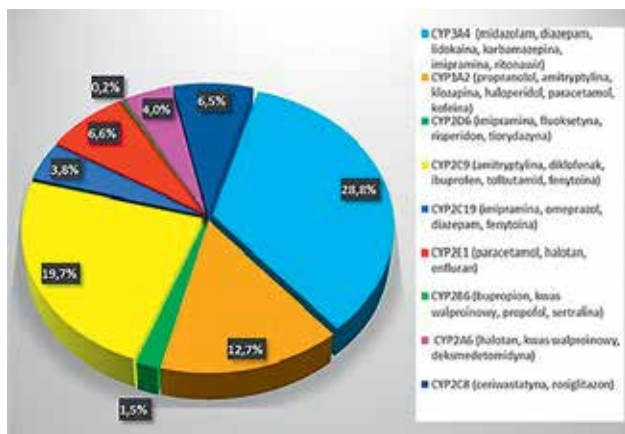
Każdy lek przed wprowadzeniem na rynek farmaceutyczny musi przejść szereg badań, które potwierdzą bezpieczeństwo jego stosowania u pacjentów. Bardzo ważnym etapem tych badań jest zbadanie metabolizmu leku w organizmie, jego ewentualnej toksyczności oraz możliwości wchodzenia w interakcje z innymi, jednocześnie podawanymi lekami.

Od wielu lat do badań tych wykorzystywane były zwierzęta laboratoryjne, przede wszystkim myszy i szczury. Jednak dziś już wiadomo, że metabolizm leków w organizmie gryzoni może znacząco różnić się od metabolizmu w organizmie człowieka. Może to wynikać w dużej mierze z różnic w ekspresji i aktywności katalitycznej enzymów cytochromu P450 (CYP). CYP jest głównym składnikiem systemu oksydazy o mieszanej funkcji, katalizującego metabolizm substratów endogennych i egzogennych (leki,

promutageny, prokancerogeny). CYP jest hemoproteiną pełniącą rolę końcowej oksydazy systemu. Jest on zakotwiczony głównie w podwójnej warstwie retikulum endoplazmatycznego gładkiego, przy czym miejsce wiązania substratu znajduje się od strony błony retikularnej, co stawia substratom warunek lipofilności, aby mogły zostać przez cytochrom zmetabolizowane. Najwięcej cytochromu znajduje się w wątrobie, ale jego izoenzymy są rozmieszczone niemal we wszystkich narządach i tkankach, z wyjątkiem mięśni prążkowanych i erytrocytów [3] (Ryc. 1).

Różnice międzygatunkowe w metabolizmie leków powodują, że wyniki badań uzyskane z eksperymentów na zwierzętach mogą nie w pełni odzwierciedlać metabolizm oraz toksyczność leku w organizmie człowieka. Z tego powodu poszukuje się innych, bardziej zbliżonych do człowieka modeli badawczych.

Najczęściej wykorzystywane są ludzkie mikrosomy wątrobowe (frakcja pochodząca z retikulum endoplazmatycznego wątroby) oraz ludzkie hepatocyty, czyli komórki wątroby. Zaletą mikrosomów jest to, że mogą być przechowywane przez bardzo długi okres czasu bez strat w aktywności enzymatycznej, jednak nie możemy ich zastosować do badania potencjału leku do zwiększania aktywności enzymów cytochromu P450, czyli potencjału indukcyjnego leku. Najlepszym modelem badawczym wykorzystywanym powszechnie wydają się być więc ludzkie hepatocyty, świeże lub kriokonserwowane. W hepatocytach zachodzi ekspresja wszystkich enzymów zaangażowanych w metabolizm leków, możemy też badać indukcję poszczególnych izoenzymów CYP. Dużym minusem hepatocytów jest ich wysoki koszt. Ponadto dostęp do hepatocytów świeżych jest ograniczony, a enzymy w hepatocytach kriokonserwowanych po procedurze rozmrażania tracą część swojej aktywności [4, 12].



Ryc.1. Schemat przedstawiający procentowy udział izoenzymów cytochromu P450 w wątrobie człowieka. W nawiasach podane zostały najważniejsze leki będące substratami dla poszczególnych izoenzymów (na podst. Wójcikowski i wsp. 2014).

Naukowcy poszukują więc wciąż modelu idealnego do badania metabolizmu i toksyczności nowych leków. Przy pomocy technik inżynierii genetycznej oraz inżynierii tkankowej stworzono myszy transgeniczne wykazujące ekspresję ludzkich enzymów cytochromu P450 oraz myszy, którym przeszczepiono ludzkie komórki wątroby.

Terminem zwierzę transgeniczne określa się takie zwierzę, które w swoim genomie posiada egzogeny DNA w postaci:

- losowo zintegrowanego fragmentu liniowego DNA
- zmodyfikowanego własnego genu w wyniku wprowadzenia egzogeny DNA (technika „knock out” oraz „knock-in”)
- wprowadzonej całej sztucznej jednostki genetycz-

nej, np. sztucznego chromosomu bakteryjnego BAC (ang. *Bacterial Artificial Chromosome*) lub sztucznego chromosomu drożdżowego YAC (ang. *Yeast Artificial Chromosome*) [8]. Sztuczne chromosomy bakteryjne to typowe wektory molekularne, mające postać kolistej cząsteczki DNA z chromosomu bakteryjnego, pozwalające wstawiać i powielać fragmenty DNA o wielkości kilkuset tysięcy par zasad. Sztuczne chromosomy drożdżowe są wektorami stworzonymi z chromosomu drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. Zarówno wektory BAC, jak i YAC pozwalają na tworzenie klonów danego genu, czyli stworzenie dużej ilości kopii wprowadzonego fragmentu DNA.

Humanizacja mysich modeli polega najczęściej na zamianie genu mysiego jego ludzkim odpowiednikiem. cDNA enzymów cytochromu P450 może być umieszczane za promotorem, czyli odcinkiem sygnalizującym początek genu, w wektorze ekspresyjnym (takim, który warunkuje ekspresję wprowadzanego fragmentu DNA lub jego integrację z materiałem genetycznym biorcy) i wprowadzane do myszy przez standardową procedurę mikroiniekcji dojądrowej. Stosuje się tkankowo specyficzne promotory, aby ekspresja zachodziła tylko w wątrobie zwierzęcia. Alternatywną metodą jest umieszczanie genu docelowego, zawierającego wszystkie ważne elementy regulatorowe, w organizmie myszy z wykorzystaniem klonów genomowych uzyskanych w fagach λ (czyli bakteriofagach, które wykorzystują naturalne właściwości wirusów do wbudowywania swojego materiału genetycznego w genom zainfekowanej komórki) lub sztucznych chromosomach bakteryjnych BAC [1].

U człowieka jednym z najważniejszych izoenzymów cytochromu P450 jest izoenzym CYP3A4. Stanowi on główną część białka cytochromowego w wątrobie ludzkiej (30–50%), a jego aktywność wykazano również w jelicie cienkim, płucach, żołądka czy jelicie grubym. Ekspresja genu *CYP3A* w odpowiedzi na ksenobiotyki, czyli obce dla organizmu substancje, regulowana jest przez receptory jądrowe pełniące funkcje regulatorów transkrypcji: receptor pregnanu X (PXR) oraz receptor androstanu (CAR). Pod wpływem ksenobiotyków, które są ligandami dla receptorów PXR i CAR, dochodzi do aktywacji transkrypcji genu *CYP3A* i zwiększenia ilości białka *CYP3A*, a tym samym pobudzenia jego aktywności enzymatycznej. CYP3A4 jest odpowiedzialny za metabolizm ponad 50% obecnie stosowanych leków, katalizując wiele procesów oksydacji (np. N-demetylacja, S-oksydacja). Do substratów tego izoenzymu należą między innymi leki psychotropowe (przeciwdepresyjne, neuroleptyki, przeciwłękowe

benzodiazepiny), antagoniści kanałów wapniowych, cyklosporyna, liczne antybiotyki oraz inhibitory proteazy HIV. Izoenzym ten bierze także udział w metabolizmie wielu ważnych związków endogennych, takich jak testosteron, kortyzol, estradiol i progesteron. Zmiany aktywności CYP3A4 pod wpływem indukcji lub inhibicji tego izoenzymu mają kluczowe znaczenie w powstawaniu interakcji pomiędzy jednocześnie zażywanymi przez pacjentów lekami [3, 6, 10, 11].

Do stworzenia myszy wykazujących ekspresję ludzkiego CYP3A4 (myszy hCYP3A4) wykorzystuje się najczęściej sztuczne chromosomy bakteryjne (BAC) zawierające kompletny gen kodujący izoenzym CYP3A4. Co ciekawe, myszy te wykazują niską aktywność CYP3A4 w wątrobie, natomiast wysoką w jelicie cienkim. Późniejsze badania wykazały, że poziom ekspresji CYP3A4 w wątrobie jest zależny od wieku zwierzęcia oraz płci. Również u ludzi wykazano wyższą ekspresję CYP3A4 u kobiet [2]. Linia myszy hCYP3A4 oprócz aktywnego ludzkiego CYP3A4 posiadała aktywny również myszy gen *CYP3A*. Idealnym rozwiązaniem byłoby stworzenie myszy transgenicznej z knock-outem mysiego genu *CYP3A*, zawierającej cały ludzki gen *CYP3A4* z ekspresją białka enzymatycznego głównie w wątrobie [1].

Ostatnim osiągnięciem jest stworzenie myszy transgenicznej wykazującej ekspresję CYP3A4 z wykorzystaniem wektora adenowirusowego podanego zwierzętom dożylnie. Dużą zaletą tego typu wektorów jest to, iż wykazują one wysoki hepatotropizm, tzn. większość (nawet 90%) wstrzykniętych wektorów lokuje się w wątrobie, co zapewnia ekspresję transgenu właśnie w tym narządzie docelowym. Ponadto wykazano, że poziom ekspresji ludzkiego CYP3A4 może być dobrze kontrolowany poprzez dobranie odpowiedniej ilości wektorów z interesującym nas genem do wstrzyknięcia. Możliwe jest również wprowadzanie jednocześnie kilku genów kodujących różne izoenzymy cytochromu P450 [9].

Izoenzym CYP2D6 odpowiedzialny jest za metabolizm ponad 25% klinicznie ważnych leków, w tym m.in. leków psychotropowych (leki przeciwdepresyjne, neuroleptyki), leków naskórkowych (β -blokery, leki przeciwartmyczne), pochodnych morfiny (leki przeciwbólowe i przeciwkaszlowe). U człowieka podrodzina CYP2D ma jeden aktywny izoenzym CYP2D6, który jest wysoce polimorficzny, natomiast u myszy i szczurów występuje aż pięć różnych genów *CYP2D* kodujące białka o innej aktywności niż ludzki *CYP2D6*. Polimorfizm ludzkiego CYP2D oznacza, że występują osobniki o dużej aktywności danego enzymu oraz osobniki o zmniejszonej aktywności, co może powodować znaczące różnice w metabolizmie

jego substratów. Obniżenie aktywności enzymu prowadzi do zwiększenia stężenia leku we krwi i tym samym do wydłużenia i nasilenia jego działania, wzrost aktywności enzymu powoduje natomiast zmniejszenie jego stężenia, a w konsekwencji skrócenie i osłabienie siły działania leku. W przypadku proleków hamowanie enzymów osłabia ich działanie, a indukcja enzymów – nasila [5]. Myszy transgeniczne *hCYP2D6* są najlepszym dostępnym obecnie modelem do badania polimorfizmu genu *CYP2D*. Myszy te stworzono z wykorzystaniem fagów λ jako wektorów zawierających cały ludzki gen *CYP2D6* razem z sekwencjami regulatorowymi [1, 3].

Podrodzina CYP1A cytochromu P450 składa się u wszystkich gatunków ssaków z dwóch izoform CYP1A1 i CYP1A2. Niektóre formy CYP są stale obecne w określonych tkankach, inne zaś pojawiają się w odpowiedzi na określony induktor. W pierwszym przypadku mówi się o konstytutywnej ekspresji genów, w drugim o ekspresji niekonstytutywnej (indukowanej) [10]. Izoenzym CYP1A (niekonstytutywny) u człowieka ulega ekspresji głównie w tkankach pozawątrobowych, w tym w płucach pod wpływem indukcji przez prokancerogenne składniki dymu papierosowego, co wydaje się być istotnym czynnikiem rozwoju raka tego organu. CYP1A1 hydrolizuje dużą liczbę wielocyklicznych węglowodorów do kancerogennych półproduktów (np. związków zawartych w dymie papierosowym, zwęglonym mięsie, spalinach silników wysokoprężnych). Izoenzym CYP1A2 (konstytutywny) stanowi około 13% całkowitej puli białka cytochromowego będąc jedną z kluczowych form w metabolizmie leków. CYP1A2 katalizuje metabolizm estradiolu, uroporfirynogenu, niektórych leków (teofiliny, kofeiny, amitryptyliny, imipraminy, propranololu, klozapiny), a także wielu dostarczanych z pożywieniem heterocyklicznych amin, związków N-heterocyklicznych znajdujących się w dymie papierosowym, difuranokumarynu (np. aflatoksyna B1) i arylaminy (np. ludzki kancerogen 4-aminofenyl) [3, 6, 11].

Myszy *hCYP1A2* oraz *hCYP1A1* stworzono wykorzystując sztuczne chromosomy bakteryjne BAC zawierające obydwa geny. Oba białka w myszach transgenicznych okazały się być funkcjonalne oraz indukowalne. Najwyższy poziom ekspresji białka CYP1A2 zaobserwowano w wątrobie, znacznie niższy natomiast w tkankach pozawątrobowych, płucach, nerkach i sercu. Myszy te stanowią odpowiedni model do badania zarówno leków będących substratami izoformy CYP1A2, ale także do badania stopnia narażenia człowieka na toksyny i mutageny środowiskowe.

Stworzono również myszy transgeniczne wykazujące ekspresję receptorów odpowiedzialnych za transkrypcyjną regulację enzymów cytochromu P450 przez ksenobiotyki. Są to m.in. myszy *hPXR*, wykazujące ekspresję receptora pregnanu X oraz myszy *hPPAR α ^{PAC}* z ekspresją receptora jądrowego PPAR.

Szczególnym zainteresowaniem naukowców zajmujących się metabolizmem leków oraz badaniami farmakokinetycznymi cieszą się myszy chimeryczne. Zamiast wprowadzania pojedynczych ludzkich genów kodujących enzymy metabolizujące leki, część hepatocytów wątroby mysiej zostaje zamieniona hepatocytami ludzkimi. Zwierzęta, którym przeszczepia się hepatocyty muszą mieć uszkodzony układ immunologiczny, co zapobiega odrzuceniu przez ich organizm obcych komórek. Ponadto niezbędne jest wyłączenie ekspresji jednego z genów mysich lub wstawienie obcego genu, co spowoduje uszkodzenie mysich komórek wątroby, ułatwiając zagnieżdżenie komórek ludzkich [12].

Pierwszy raz mysz taka została stworzona w roku 1991 przez Brinster'a i współpracowników. Mysiom SCID (z ang. *Severe Combined Immunodeficiency*) z uszkodzonym systemem immunologicznym wszczepiono transgen aktywatora plazminogenu typu urokinazy. Ekspresja transgenu w wątrobie indukowała stopniowe obumieranie mysich hepatocytów. Badania wykazały, że myszy te nazwane w skrócie *uPA/SCID* są bardzo dobrym modelem zwierzęcym do przeszczepiania ludzkich hepatocytów (możliwa jest zamiana nawet 80% hepatocytów mysich na ludzkie) [7, 12, 13].

Użycie myszy chimerycznych do badań metabolizmu leków jest korzystne, gdyż zwierzęta te wykazują ekspresję nie tylko enzymów cytochromu P450, ale również enzymów odpowiedzialnych za II fazę metabolizmu leków oraz transporterów leków. Ponadto dzięki nim możemy *in vivo* badać polimorfizm genów enzymów odpowiedzialnych za metabolizm leków. Pomimo, że do stworzenia myszy chimerycznych potrzebna jest relatywnie niewielka ilość ludzkich hepatocytów, znalezienie odpowiedniego, zdrowego donora wciąż stanowi duży problem. Ponadto populacja donorów jest bardzo zróżnicowana pod względem płci, wieku czy przebytych chorób, co również należy uwzględnić podczas tworzenia zwierząt chimerycznych. Dużym minusem takich myszy jest również to, że za każdym razem muszą być tworzone *de novo*.

Stworzenie myszy transgenicznych i chimerycznych pomogło rozwiązać problem różnic międzygatunkowych w metabolizmie leków wynikających przede wszystkim z różnic genów kodujących enzymy cytochromu P450 oraz różnic w receptorach odpowiedzi na ksenobiotyki. Myszy transgeniczne wydają się być modelem stabilnym, wiele z linii zachowuje wprowadzony obcy gen przez wiele pokoleń. Zwierzęta chimeryczne wykazują zbliżony do ludzkiego profil metabolizmu leków, indukcję oraz inhibicję enzymów metabolizujących leki. Obydwa typy zwierząt stanowią doskonały i obiecujący model do badań farmakokinetycznych, badań toksyczności leków oraz przewidywania interakcji pomiędzy lekami.

Bibliografia

1. Cheung C., Gonzalez F.J. Humanized mouse lines and their application for prediction of human drug metabolism and toxicological risk assessment. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008, 327(2), 288–299.
 2. Cheung C., Yu A.M., Chen C.S., Krausz K.W., Byrd L.G., Feigenbaum L., Edwards R.J., Waxman D.J., Gonzalez F.J. Growth hormones determines sexual dimorphism of hepatic cytochrome P450 CYP3A4 expression in transgenic mouse. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006, 316, 1328–1334.
 3. Daniel W.A. Farmakogenetyka. *Biologia molekularna w medycynie – Elementy genetyki klinicznej.* Red. Jerzy Bal, Wydawnictwo Naukowe PWN, 2011, 290–307.
 4. Gomez-Lechon M.J., Donato M.T., Castell J.V., Jover R. Human hepatocytes as a tool for studying toxicity and drug metabolism. *Curr. Drug Metab.* 2008, 4, 292–312.R
 5. Jeleń A., Sałagacka A., Balcerczak E. Charakterystyka wybranych mechanizmów molekularnych wpływających na farmakokinetykę i farmakodynamikę leków przeciwdepresyjnych. *Postepy Hig Med. Dosw.* 2015, 69, 753–762.
 6. Katoh M., Tateno Ch., Yoshizato K., Yokoi T. Chimeric mice with humanized liver. *Toxicology.* 2008, 246(1), 9–17.
 7. Kitamura S., Sugihara K. Current status of prediction of drug disposition and toxicity in humans using chimeric mice with humanized liver. *Xenobiotica.* 2014, 44(2), 123–134.
 8. Konopka W. Zwierzęta transgeniczne w neurobiologii. Konferencja „Nowe metody w neurobiologii”. Warszawa 2004, s. 21–26.
-

9. Kuno S., Sakurai F., Shimizu K., Matsumura N., Kim S., Watanabe H., Tashiro K., Tachibana M., Mizuguchi H. Development of mice exhibiting hepatic microsomal activity of human CYP3A4 comparable to that in human liver microsomes by intravenous administration of adenovirus vector expressing human CYP3A4. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2014, 29(4), 296–304.
10. Palut D., Kostka G., Struciński P. Rola receptorów jądrowych w indukcji form molekularnych cytochromu P450 pod wpływem substancji obcych. *Roczn. PZH.* 2002, 53(4), 321–332.
11. Pelkonen O., Maenpaa J., Taavitsainen P., Rautio A., Raunio H. Inhibition and induction of human cytochrome P450 (CYP) enzymes. *Xenobiotica.* 1998, 28, 1203–1253.
12. Peltz G. Can 'humanized' mice improve drug development in the 21st century? *Trends Pharmacol Sci.* 2013, 34(5), 255–260.
13. Rodrigues A.D., Rushmore T.H. Cytochrome P450 pharmacogenetics in drug development: in vitro studies and clinical consequences. *Curr Drug Metab.* 2002, 3, 289–309.
14. Tateno Ch. Yoshizane Y., Saito N., Kataoka M., Utoh R., Yamasaki Ch., Tachibana A., Soeno Y., Asahina K., Hino H., Asahara T., Yokoi T., Furukawa T., Yoshizato K. Near completely humanized liver in mice shows human-type metabolic responses to drugs. *Am J Pathol.* 2004, 165(3), 901–912.
15. Wójcikowski J., Basińska A., Daniel W.A. The cytochrome P450-catalyzed metabolism of levomepromazine: a phenothiazine neuroleptic with a wide spectrum of clinical application. *Biochem Pharmacol.* 2014, 90, 188–195.

■ Agnieszka Basińska-Ziobroń. E-mail: agabasinaska@gmail.com

POCZET MODELOWYCH ORGANIZMÓW BADAWCZYCH

Jolanta Górską-Andrzejak, Paweł Grzmił, Marta Labocha-Derkowska, Joanna Rutkowska, Wojciech Strzałka, Katarzyna Tomala, Dominika Włoch-Salamon (Kraków)

Streszczenie

Przedstawiamy przegląd siedmiu organizmów modelowych, szczególnie ważnych dla badań biologicznych. Poszczególne portrety zarysowują biologię danego organizmu, czynniki decydujące o jego wykorzystaniu w badaniach naukowych oraz główne odkrycia naukowe, które przyczyniły się do jego popularności. Portrety te zostały przygotowane przez badaczy na co dzień pracujących z opisywanymi organizmami.

Abstract

We present seven model organisms, which are highly important in biological studies. Each sketch describes the biology of the species, factors responsible for its use in scientific research and most important scientific discoveries, which made the species popular and even famous. Each description was written by a researcher who uses the species in his/her own studies.

Wprowadzenie

Świat przyrody zachwyca nas swoją ogromną różnorodnością. Część badań naukowych poświęcona jest właśnie bogactwu gatunków i procesom zachodzącym w dużych skalach przestrzennych i czasowych. Nie można ich jednak dogłębnie zrozumieć bez poznania sposobu funkcjonowania niższych poziomów organizacji biologicznej. Do tego często wykorzystuje się tzw. organizmy modelowe. Organizm modelowy to gatunek reprezentatywny dla innych gatunków ze swojej grupy taksonomicznej (rodzaju, rodziny, rzędu lub królestwa), posiadający

cechy, które ułatwiają badanie określonych procesów biologicznych. Celem badań naukowych prowadzonych na organizmach modelowych jest więc nie tyle samo poznanie tych organizmów, co poznawanie na ich przykładzie mechanizmów podstawowych procesów biologicznych, w tym również mechanizmów zachodzących w organizmie człowieka. Prowadzenie badań na tych samych organizmach modelowych, z wykorzystaniem opracowanych dla nich procedur, w wielu ośrodkach na świecie równocześnie, przez zespoły badawcze o różnej wiedzy, umiejętnościach i pomysłach, podnosi jakość badań i znacznie je przyspiesza.