

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΜΣ «ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**In Vitro ΜΟΝΤΕΛΟ ΓΙΑ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ
ΗΠΑΤΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΑΠΟ ΦΑΡΜΑΚΑ**

ΓΕΩΡΓΙΑ Μ. ΔΙΑΚΟΥΔΗ

Επιβλέπων Καθηγητής:

**Αλεξόπουλος Λεωνίδας, Επίκουρος Καθηγητής
Εργαστήριο Εμβιομηχανικής & Συστημικής Βιολογίας**

Σχολή Μηχανολόγων Μηχανικών

Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο

ΑΘΗΝΑ 2017

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΠΜΣ «ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**In Vitro ΜΟΝΤΕΛΟ ΓΙΑ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ
ΗΠΑΤΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΑΠΟ ΦΑΡΜΑΚΑ**

ΓΕΩΡΓΙΑ Μ. ΔΙΑΚΟΥΔΗ

Επιβλέπων Καθηγητής:

Αλεξόπουλος Λεωνίδας, Επίκουρος Καθηγητής
Εργαστήριο Εμβιομηχανικής & Συστημικής Βιολογίας
Σχολή Μηχανολόγων Μηχανικών
Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο

ΑΘΗΝΑ 2017

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

In Vitro ΜΟΝΤΕΛΟ ΓΙΑ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΗΠΑΤΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΑΠΟ ΦΑΡΜΑΚΑ

ΓΕΩΡΓΙΑ Μ. ΔΙΑΚΟΥΔΗ

Επιβλέπων Καθηγητής:

Αλεξόπουλος Λεωνίδας, Επίκουρος Καθηγητής
Εργαστήριο Εμβιομηχανικής & Συστημικής Βιολογίας
Σχολή Μηχανολόγων Μηχανικών
Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο

Εξεταστική Επιτροπή:

Αλεξόπουλος Λεωνίδας, Επίκουρος Καθηγητής (επιβλέπων), Εργαστήριο
Εμβιομηχανικής & Συστημικής Βιολογίας, Σχολή Μηχανολόγων Μηχανικών,
Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο

Ντούνη Ελένη, Επίκουρος Καθηγήτρια, Τμήμα Βιοτεχνολογίας, Γεωπονικό
Πανεπιστήμιο Αθηνών

Λάμπρου Νικόλαος, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Βιοτεχνολογίας,
Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΑΘΗΝΑ 2017

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι εξελίξεις στη σημερινή φαρμακολογία και τεχνολογία των φαρμάκων έχουν βελτιώσει και σώσει πολλές ανθρώπινες ζωές. Ωστόσο, οι δυσμενείς αντιδράσεις των φαρμάκων αποτελούν μία μεγάλη πρόκληση για τους επαγγελματίες στον τομέα της υγείας, τις ρυθμιστικές αρχές των φαρμάκων και τη φαρμακοβιομηχανία. Το ήπαρ είναι ένα ετερογενές όργανο που επιτελεί πολλές βασικές βιολογικές λειτουργίες, όπως τον μεταβολισμό των φαρμάκων, και είναι πολύ ευαίσθητο σε βλάβες που μπορεί να προκληθούν από χημικές ουσίες ή/και τα προϊόντα του μεταβολισμού τους, μετά την είσοδό τους στον οργανισμό. Η ηπατοτοξικότητα προκαλούμενη από φάρμακα (DILI) αποτελεί ένα σοβαρό και ανησυχητικό πρόβλημα για τη δημόσια υγεία.

Η DILI αποτελεί την κύρια αιτία εμφάνισης οξείας ηπατικής ανεπάρκειας που χρήζει μεταμόσχευσης οργάνων, απόσυρσης φαρμάκων από την παγκόσμια αγορά, μη έγκρισης καινοτόμων εφαρμογών των φαρμάκων, καθώς και σημαντικές αποτυχίες στην ανάπτυξη και εξέλιξη των φαρμάκων όλων των μεγάλων φαρμακοβιομηχανιών. Περίπου 1000 φάρμακα, φυτικά προϊόντα, βιταμίνες και αθέμιτες ενώσεις έχουν συσχετιστεί με ηπατικές βλάβες και ηπατοτοξικότητα. Προκειμένου να περιοριστεί η εμφάνιση της DILI, καθώς επίσης και η απόσυρση φαρμάκων από την αγορά, έχει θεσπιστεί μία σειρά από στάδια ελέγχων και προδιαγραφών που θα πρέπει να ικανοποιούν τα φάρμακα και τα ξενοβιοτικά προτού γίνουν διαθέσιμα στην αγορά.

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης είναι να μελετηθεί η βιβλιογραφία που αναφέρεται στην ηπατοτοξικότητα από φάρμακα και στα κυριότερα και καινοτόμα 2D και 3D *in vitro* μοντέλα που χρησιμοποιούνται προκειμένου να εκτιμηθεί. Επιπλέον, θα αναφερθεί η προσπάθεια ανάπτυξης ενός high throughput 2D *in vitro* μοντέλου εκτίμησης της ηπατοτοξικότητας με τη χρήση πρωτογενών ανθρώπινων ηπατοκυττάρων (pHH) και μικροσκοπίας φθορισμού (high content screening) για την απεικόνιση ζωντανών κυττάρων.

Λέξεις-Κλειδιά: ήπαρ, φάρμακο, ηπατοτοξικότητα, DILI, 2D, 3D, *in vitro* μοντέλο, πρωτογενή ανθρώπινα ηπατοκύτταρα, high throughput, high content screening

ABSTRACT

The advances in pharmacology and drug development have improved and saved a lot of human lives. Nevertheless, the adverse drug reactions consist a big challenge in health professionals, the drug regulatory authorities and the drug industry. The liver is a heterogenous organ that induces a lot of the most important biological functions, like drug metabolism, it is very sensitive to hepatic injuries that can be provoked by chemical entities or/and by the products of their metabolism, after their entry in the organism. Drug-induced liver injury is a severe and very concerning problem for public health.

Drug-induced liver injury (DILI) is the most common cause cited of acute liver failure that requires liver transplantation, withdrawal of drugs from the global market, non-approval of innovative applications of drugs, as well as significant failures in the development and evolution of drugs in all the big pharmaceutical companies. About 1000 drugs, herbal products, vitamins and illicit compounds have been correlated with liver injuries and hepatotoxicity. In order to reduce the causes of DILI, as well as the drug withdrawal from the market, there has been established a series of control stages and conditions that the drugs and the xenobiotics will have to suffice, before they are available for public use.

The purpose of the present Master thesis is to study the literature reviews concerning the drug-induced liver injury and the most important and state-of-the-art 2D and 3D *in vitro* models used in the estimation of DILI. Moreover, there will be mentioned a trial of the development of a high-throughput 2D *in vitro* DILI model with the use of primary human hepatocytes (pHH) and fluorescent imaging (high content screening) for live cells.

Key words: *liver, drug-induced liver injury, DILI, drugs, 2D, 3D, in vitro model, primary human hepatocytes, high throughput, high content screening*

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	8
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
1.1. ΗΠΑΡ	9
1.1.1. ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΚΑΙ ΔΟΜΗ ΗΠΑΤΟΣ.....	9
1.1.2. ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΗΠΑΤΟΣ	12
1.1.3. ΗΠΑΤΟΚΥΤΤΑΡΑ.....	14
1.2. ΗΠΑΤΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΠΡΟΚΑΛΟΥΜΕΝΗ ΑΠΟ ΦΑΡΜΑΚΑ (DILI) 15	
1.2.1. ΠΑΘΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ	16
1.2.2. ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΤΗΣ DILI	20
1.2.2.1. <i>In vitro</i> βιοδείκτες της ηπατοτοξικότητας	21
1.3. <i>In vitro</i> ΜΟΝΤΕΛΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ DILI	22
1.3.1. 2D <i>in vitro</i> ΜΟΝΤΕΛΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ DILI	23
1.3.1.1. Πρωτογενή Ανθρώπινα Ηπατοκύτταρα (pHH)	23
1.3.1.2. Ηπατοκυτταρικές σειρές (π.χ. HepG2, HepaRG, HuH7)	23
1.3.1.3. Ηπατοκύτταρα που προκύπτουν από επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα (iPS)	24
1.3.2. 3D <i>in vitro</i> ΜΟΝΤΕΛΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ DILI	24
1.3.2.1. Πρωτογενή Ανθρώπινα Ηπατοκύτταρα (pHH)	25
1.3.2.2. Πρωτογενή Ανθρώπινα Ηπατοκύτταρα (pHH) ή Συγκαλλιέργεια Κυττάρων σε Σφαιροειδή διαμόρφωση.....	26
1.3.2.3. Πρωτογενή Ανθρώπινα Ηπατοκύτταρα (pHH) ή Συγκαλλιέργεια Κυττάρων σε Βιοαντιδραστήρες και Microfluidic συσκευές (Liver-on-a-chip).....	26
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	27
2.1. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ.....	27
2.2. ΕΠΑΓΩΓΗ ΗΠΑΤΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΠΡΟΚΑΛΟΥΜΕΝΗΣ ΑΠΟ ΦΑΡΜΑΚΑ	27
2.3. ΜΕΘΟΔΟΣ LDH ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ-ΚΑΜΠΥΛΕΣ EC50	29

2.4. HIGH CONTENT SCREENING ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΗΠΑΤΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ	30
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	33
3.1. ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΕ 96 ΚΑΙ 384 WELL PLATES	33
3.2. ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΩΝ ΧΡΩΣΤΙΚΩΝ Hoechst 33258, MitoTracker Red CMX Ros & CM-H2DCFDA.....	35
3.3. ΠΡΟΚΑΤΑΡΚΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΠΟΥ ΠΡΟΚΥΠΤΟΥΝ ΑΠΟ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ CytoTox-ONE™	39
3.4. ΠΡΟΚΑΤΑΡΚΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΟΥ ΠΡΟΚΥΠΤΟΥΝ ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΠΑΓΩΓΗ ΤΗΣ DILI ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ HIGH CONTENT SCREENING ΚΑΙ ΤΩΝ ΧΡΩΣΤΙΚΩΝ Hoechst 33258 & MitoTracker Red CMX Ros	40
4. ΕΠΙΛΟΓΟΣ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ	41
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	43

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Καταρχήν, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Λεωνίδα Αλεξόπουλο, Επίκουρο Καθηγητή της Σχολής Μηχανολόγων Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου, για τη δυνατότητα που μου προσέφερε να εκπονήσω την μεταπτυχιακή μου μελέτη στο εργαστήριο Εμβιομηχανικής και Συστημικής Βιολογίας. Τον ευχαριστώ πολύ για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε με την ανάθεση της συγκεκριμένης εργασίας και για τις συμβουλές που μου έδωσε.

Θερμές ευχαριστίες οφείλω στην κα. Ελένη Ντούνη, Επίκουρη Καθηγήτρια του Τμήματος Βιοτεχνολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, και στον κ. Νικόλαο Λάμπρου, Αναπληρωτή Καθηγητή του Τμήματος Βιοτεχνολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, για το χρόνο που αφιέρωσαν στην μελέτη της μεταπτυχιακής μου εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω πολύ την οικογένειά μου που με φροντίζει και με στηρίζει όλα αυτά τα χρόνια με όλους τους πιθανούς τρόπους. Επιπλέον, θα ήθελα να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ στη Δανάη Ζαρέιφη και το Δημήτριο Μεσσήνη, γιατί χωρίς τη δική τους βοήθεια, εντός και εκτός του εργαστηριακού χώρου, δεν θα είχα καταφέρει να ολοκληρώσω τη συγκεκριμένη μεταπτυχιακή εργασία.

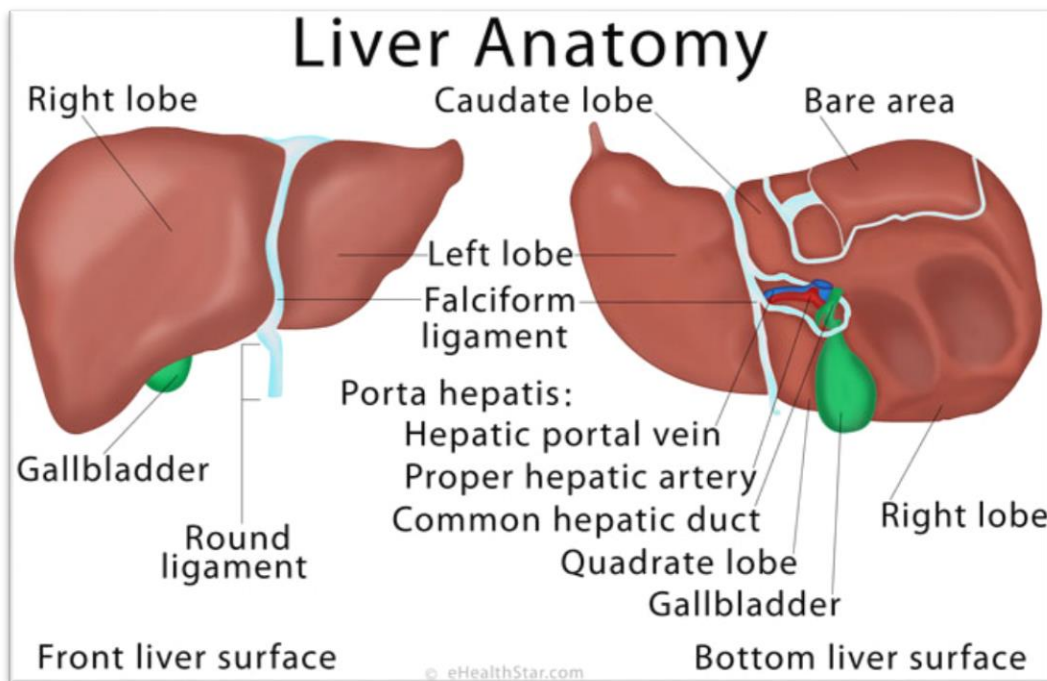
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. ΗΠΑΡ

1.1.1. ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΚΑΙ ΔΟΜΗ ΗΠΑΤΟΣ

Το ήπαρ είναι το δεύτερο σε μέγεθος όργανο, μετά το δέρμα, του ανθρώπινου οργανισμού και αποτελεί περίπου το 2-3% του μέσου σωματικού βάρους. Το ήπαρ αποτελείται από 4 λοβούς (Εικόνα 1), οι οποίοι περιγράφονται με δύο τρόπους: με βάση την μορφολογία τους και με βάση την λειτουργικότητά τους. Πρόκειται για ένα όργανο με πάρα πολλά αγγεία, καθώς δέχεται την μεγαλύτερη καρδιακή παροχή σε σχέση με τα υπόλοιπα όργανα, ενώ η παροχή του αίματος από το ήπαρ γίνεται με δύο τρόπους, μέσω της ηπατικής αρτηρίας και της πυλαίας φλέβας. Το αρτηριακό και πυλαίο αίμα περνάει από τα ηπατικά κολποειδή πριν καταλήξει στη συστηματική κυκλοφορία μέσω του ηπατικού φλεβικού συστήματος και την κοίλη φλεβα ([1]). Εντός του ήπατος συναντάται το χοληφόρο δέντρο, το οποίο είναι το δίκτυο των αγγείων μέσα στο οποίο ρέει η χολή, και αποτελείται από ενδοηπατικά και εξωηπατικά χοληφόρα ([2]).

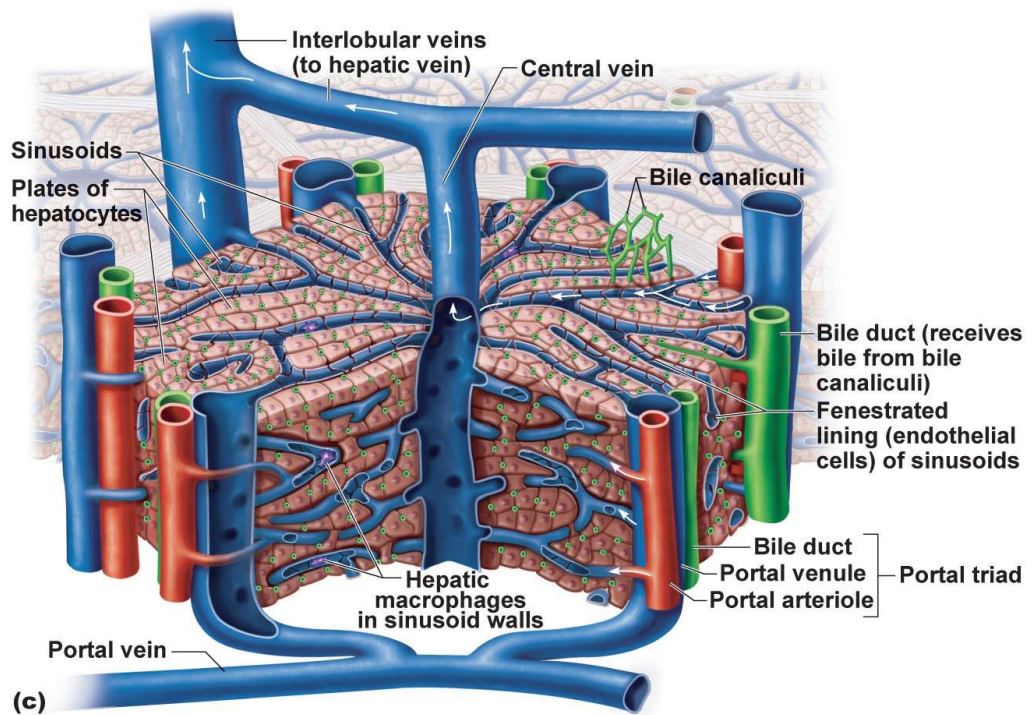
Την ιστολογική δομική μονάδα του ήπατος αποτελούν τα ηπατικά λοβία. Τα ηπατικά λοβία έχουν εξαγωνική δομή, με διάμετρο περίπου 1mm και πάχος περίπου 2mm. Το ήπαρ αποτελείται από περίπου 1 εκατομμύριο λοβία. Στους ενήλικες, τα ηπατικά λοβία αποτελούνται από ηπατοκύτταρα στενά συνδεδεμένα μεταξύ τους που σχηματίζουν ηπατικές πλάκες. Τα ηπατοκύτταρα αυτά περιορίζουν τα χοληφόρα αγγεία ενώ εκτίθενται και από τις δύο μεριές στα ηπατικά κολποειδή. Σε κάθε κορυφή του εξαγωνικού λοβίου υπάρχει μια «τριαδική πύλη». Η «τριαδική πύλη» αποτελείται από μία αρτηρία, μία φλέβα και ένα χοληφόρο αγγείο που συγκρατούνται μεταξύ τους με συνδετικό ιστό. Έτσι σχηματίζεται η μικρότερη λειτουργική μονάδα του ήπατος, η ηπατική αδενοκυψέλη, η οποία ορίζεται από τον πληθυσμό των ηπατοκυττάρων που τροφοδοτούνται από μια «τριαδική πύλη» (Εικόνα 2).



Εικόνα 1: Ανατομία ήπατος – Πρόσθια και οπίσθια όψη.

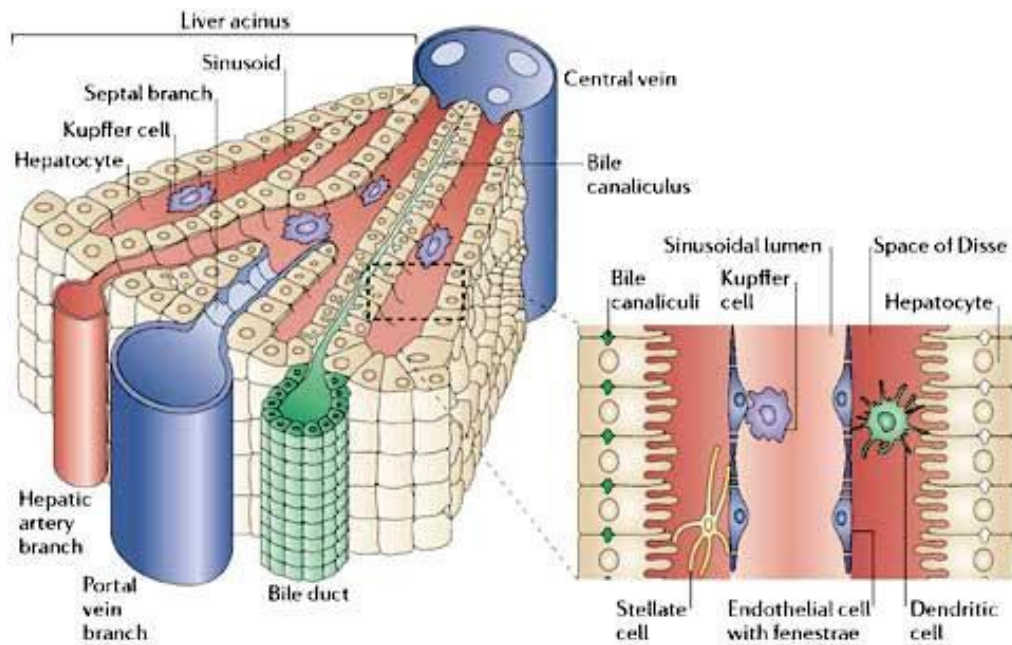
Πηγή: <http://www.ehealthstar.com/>

Η δομή του ήπατος συντίθεται από 60% παρεγχυματικά κύτταρα όπως τα ηπατοκύτταρα και 40% από μη παρεγχυματικά κύτταρα (NPCs) τα οποία βρίσκονται σε διαφορετικά σημεία στα ηπατικά λοβία. Τα μη παρεγχυματικά ηπατικά κύτταρα περιλαμβάνουν αστεροειδή κύτταρα, κολποειδικά κύτταρα, κύτταρα Kupffer (τα οποία λειτουργούν ως *in situ* μακροφάγα), επιθηλιακά κύτταρα και ανοσοκύτταρα (Εικόνα 3). Σε αντίθεση με άλλα όργανα, το ήπαρ δεν είναι ιδιαίτερα πλούσιο σε εξωκυττάρια μήτρα, παρόλ' αυτά διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση του διαφοροποιημένου φαινοτύπου των ηπατοκυττάρων και των NPCs ([3]; [4]; [5]). Η εξωκυττάρια μήτρα του ήπατος συντίθεται κυρίως από φιβρονεκτίνη-η οποία είναι μια γλυκοπρωτεΐνη-και λίγο κολλαγόνο τύπου I, καθώς και από κολλαγόνο τύπου III, IV, V και VI σε ελάχιστες ποσότητες ([3]; [5]).



© 2011 Pearson Education, Inc.

Εικόνα 2: Δομή ηπατικού λοβίου. Πηγή: <https://cms.webstudy.com/>



Εικόνα 3: Θέση και απεικόνιση των παρεγχυματικών και των μη παρεγχυματικών κυττάρων εντός των ηπατικών λοβίων. Πηγή: <http://www.eclinpath.com/>

1.1.2. ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΗΠΑΤΟΣ

Το ήπαρ αποτελεί το μεταβολικό κέντρο του ανθρώπινου σώματος και είναι γνωστό ότι εμπλέκεται σε πολλές ζωτικές λειτουργίες. Το ήπαρ, εκτός από τη διαδικασία του μεταβολισμού, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο κατά τη διαδικασία της πέψης, της αποτοξίνωσης, της ανοσολογικής απόκρισης, καθώς και στην αποθήκευση θρεπτικών συστατικών και στην παραγωγή αρκετών πρωτεϊνών ζωτικής σημασίας. Στον Πίνακα 1 αναφέρονται οι κυριότερες γνωστές λειτουργίες του ήπατος ([6]).

ΚΥΡΙΕΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΤΟΥ ΗΠΑΤΟΣ	
Μεταβολικό κέντρο	<ul style="list-style-type: none">• Παροχή ενέργειας στον οργανισμό• Δέσμευση και αποδέσμευση της γλυκόζης• Δέσμευση και αποδέσμευση των αμινοξέων• Σχηματισμός ουρίας• Επεξεργασία και σύνθεση λιπιδίων• Σύνθεση κετονικών σωμάτων• Βιοσύνθεση και βιοδιάσπαση• Σύνδεση και αποδόμηση των πρωτεϊνών του πλάσματος• Σχηματισμός χολής (έκκριση ενδοβιοτικών και ξενοβιοτικών)
Κέντρο άμυνας	<ul style="list-style-type: none">• Μεταβολισμός ξενοβιοτικών• Εξάλειψη των αντιδραστικών ειδών οξυγόνου (ROS)• Φαγοκυττάρωση

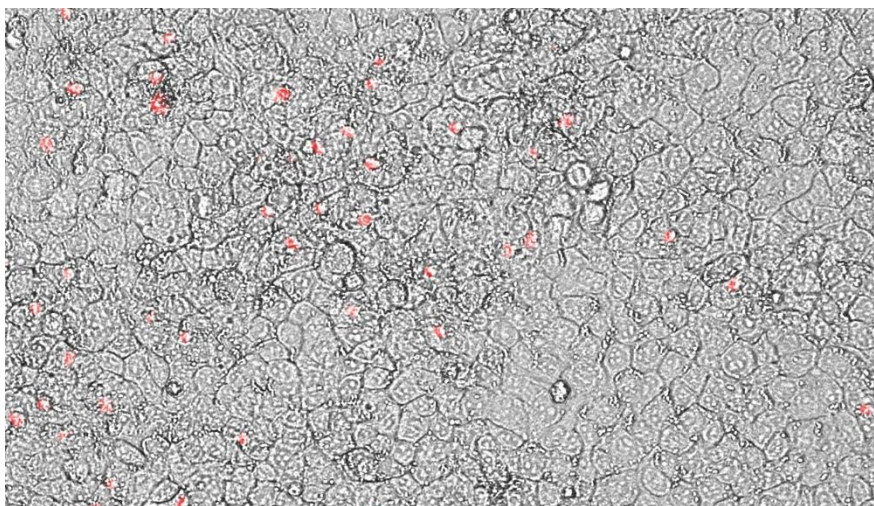
<p>Έλεγχος του ορμονικού συστήματος</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Δέσμευση και εξάλειψη βακτηρίων, ιών, παρασίτων, σωματιδιακών υλικών και μακρομορίων • Εξάλειψη καρκινικών κυττάρων • Αντίδραση οξείας φάσης
<p>Λειτουργίες που σχετίζονται με το αιμοποιητικό σύστημα</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Αδρανοποίηση και εξάλειψη ορμονών και μεσολαβητών • Σύνθεση και απελευθέρωση των προ-ορμονών • Σύνθεση των πρωτεϊνών δέσμευσης των ορμονών
<p>Ανοσορυθμιστικές λειτουργίες</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Παθητική και ενεργητική αποθήκευση αίματος • Ρύθμιση του pH του αίματος • Αιμοποιητική λειτουργία στην εμβρυϊκή και πιθανώς στην μεταγεννητική ζωή
<p>Σχηματισμός και διατήρηση της οργανικής δομής</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Παρουσία αντιγόνων στα λεμφοκύτταρα • Απομάκρυνση αποπτωτικών λεμφοκυττάρων • Επαγωγή ανοχής ως προς τα αντιγόνα που εισέρχονται από τη στοματική κοιλότητα <p>Σύνθεση και αποδόμηση των στοιχείων της εξωκυττάριας μήτρας</p>

Πίνακας 1: Κύριες λειτουργίες του ήπατος. ([7]; [6])

1.1.3. ΗΠΑΤΟΚΥΤΤΑΡΑ

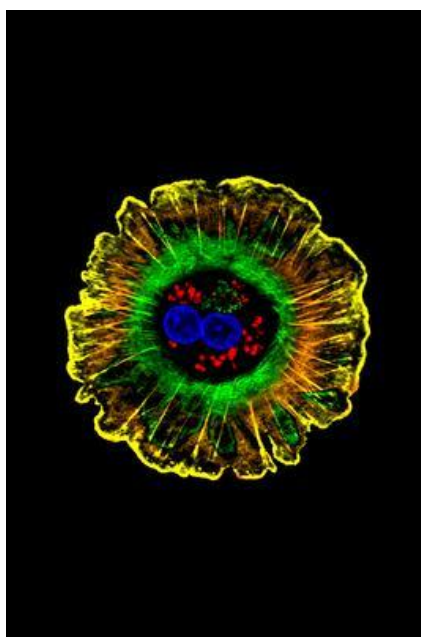
Όπως αναφέρθηκε, τα ηπατοκύτταρα όντας τα παρεγχυματικά επιθηλιακά κύτταρα του ήπατος, αποτελούν δομικό στοιχείο των ηπατικών λοβίων και κατά συνέπεια των ηπατικών αδενοκυψελών. Τα ηπατοκύτταρα έχουν κυβικό σχήμα (Εικόνα 4) και μέγεθος που κυμαίνεται μεταξύ 16-27 μm ([8]). Είναι συνήθως πολυπλοειδή κύτταρα με στρογγυλούς πυρήνες, λείο και αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο και πολλές μεμβράνες Golgi (Εικόνα 5) ([9]).

Στα ηπατοκύτταρα επιτελούνται οι περισσότερες από τις βασικές βιοχημικές λειτουργίες του ήπατος. Η πλειοψηφία των πρωτεϊνών του πλάσματος, όπως η αλβουμίνη και το ινωδογόνο, οι αναστολείς πρωτεασών και οι ρυθμιστές ανοσοσυμπλεγμάτων και φλεγμονής εκκρίνονται από τα ηπατοκύτταρα. Ελέγχουν την ομοιόσταση πολλών μορίων όπως η γλυκόζη και το γλυκογόνο, τα τριγλυκερίδια, η χοληστερόλη, τα χολικά οξέα, καθώς επίσης συνεισφέρουν στον μεταβολισμό των αμινοξέων, στην ρύθμιση του pH και στην αποτοξίνωση της αμμωνίας με τη σύνθεση της ουρίας, κ. ά. Επιπλέον, τα ηπατοκύτταρα προσλαμβάνουν ή συνθέτουν τις ουσίες που προορίζονται για το σχηματισμό της χολής και την εκκρίνουν στους χοληφόρους πόρους, μέσω των οποίων εισέρχεται στο χοληφόρο δέντρο ([5]; [10]; [11]; [12]).



Εικόνα 4: Πρωτογενή ανθρώπινα ηπατοκύτταρα (pHH) σε 2D *in vitro* καλλιέργεια. Η εικόνα αποκτήθηκε με τη χρήση του JuLI™ Stage Real-Time CHR (Cell History Recorder).

Τέλος, στα ηπατοκύτταρα επιτελείται η διαδικασία του μεταβολισμού των ξενοβιοτικών, κατά την οποία τα υδρόφοβα στοιχεία μετατρέπονται σε υδατοδιαλυτά προϊόντα τα οποία εκκρίνονται εύκολα από τον οργανισμό. Η διαδικασία αυτή είναι ο κύριος στόχος πολλών φαρμάκων και άλλων ξενοβιοτικών, τα οποία είναι δυνητικά ηπατοτοξικά είτε άμεσα είτε συνήθως μετά τη βιο-ενεργοποίησή τους, που οδηγεί στο σχηματισμό δραστικών μεταβολιτών ή στην παραγωγή αντιδραστικών ειδών οξυγόνου ([13]).



Εικόνα 5: Ανθρώπινο ηπατοκύτταρο.
Πηγή: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>

1.2. ΗΠΑΤΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΠΡΟΚΑΛΟΥΜΕΝΗ ΑΠΟ ΦΑΡΜΑΚΑ (DILI)

Η ηπατοτοξικότητα προκαλούμενη από φάρμακα (DILI) είναι μία κλινική κατάσταση η οποία μπορεί να συσχετιστεί με σοβαρές καταστάσεις, όπως η οξεία ηπατική ανεπάρκεια ([14]). Τα αντιβιοτικά παραμένουν τα πιο συνήθη φάρμακα που προκαλούν ηπατοτοξικότητα ([15]), αλλά οι φαρμακευτικές ουσίες και τα ξενοβιοτικά που είναι συνδεδεμένα με ηπατικές βλάβες είναι πάρα πολλά, αν και η εμφάνισή τους δεν είναι

αρκετά συχνή και τις περισσότερες φορές εξαρτάται από το χρήστη και την ιδιοσυγκρασία του ([16]; [17]; [18]). Η DILI είναι επίσης η πιο συχνή αιτία διακοπής προγραμμάτων για ανάπτυξη φαρμάκων ([19]). Περισσότερα από 50 φάρμακα που είχαν εγκριθεί έχουν αποσυρθεί από την αγορά ορισμένων χωρών εξαιτίας της DILI ([20]; [21]; [22]).

Η τοξικότητα που προκαλείται από φάρμακα μπορεί να «μιμηθεί» όλες τις μορφές της οξείας αλλά και της χρόνιας ηπατικής ανεπάρκειας, ενώ πολλά από τα φάρμακα αυτά τείνουν να έχουν χαρακτηριστικό μοτίβο με βάση τα κλινικά και παθολογικά συμπτώματα, αλλά και την λανθάνουσα περίοδο (Πίνακας 2) ([23]). Εκτός από ορισμένες εξαιρέσεις, η DILI υποχωρεί με τη διακοπή της χορήγησης του φαρμάκου που την προκάλεσε, παρ' αυτά παραμένει μία διαγνωστική και θεραπευτική πρόκληση ([24]) καθώς δεν έχουν όλα τα φάρμακα χαρακτηριστικό μοτίβο και σε πολλές περιπτώσεις εμφανίζουν περισσότερα από ένα. Ο μηχανισμός με τον οποίο εκδηλώνονται δεν είναι πάντα κατανοητός, αλλά μπορεί να είναι αποτέλεσμα της «αργοπορημένης» ανοσολογικής απόκρισης του οργανισμού στο φάρμακο, σε συνδυασμό με την παρατεταμένη κατακράτησή του στον οργανισμό ([25]).

Signature disease	Drug(s) causing the feature
Acute hepatitis	Acetaminophen, bromfenac, isoniazid, nevirapine, ritonavir, troglitazone
Chronic hepatitis	Dantrolene, diclofenac, methyldopa, minocycline, nitrofurantoin
Acute cholestasis	ACE inhibitors, amoxicillin/clavulanic acid, chlorpromazine, erythromycins, sulindac
Mixed pattern or atypical hepatitis	Phenytoin, sulfonamides
Nonalcoholic steatohepatitis	Amiodarone, tamoxifen
Fibrosis/cirrhosis	Methotrexate
Microvesicular steatosis	NRTIs, valproic acid
Veno-occlusive disease	Busulfan, cyclophosphamide

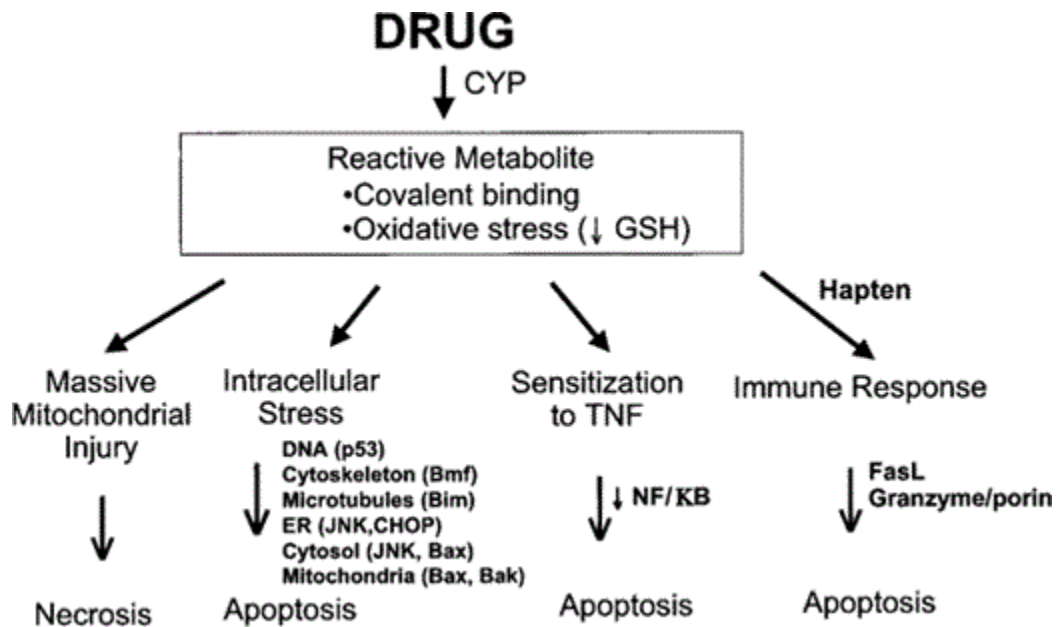
NOTE. ACE, angiotensin-converting enzyme; NRTI, nucleoside reverse-transcriptase inhibitor.
Πίνακας 2: Παραδείγματα κλινικών και παθολογικών συμπτωμάτων της DILI ([25]).

1.2.1. ΠΑΘΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ

Οι ανεπιθύμητες ηπατικές παρενέργειες που προκαλούνται από φάρμακα μπορεί να θεωρηθούν είτε αναμενόμενες (υψηλή συχνότητα) είτε απρόβλεπτες (χαμηλή συχνότητα) ([24]). Τα φάρμακα που προκαλούν αναμενόμενες ηπατικές βλάβες, όπως η παρακεταμόλη, συνήθως εμφανίζουν συμπτώματα σε μικρό χρονικό διάστημα (μερικές ημέρες) και είναι αποτέλεσμα της άμεσης ηπατοτοξικότητας που προκάλεσε το αρχικό φάρμακο ή οι μεταβολίτες του. Από την άλλη, τα φάρμακα που προκαλούν απρόβλεπτες παρενέργειες, όπως η ισονιαζίδη, εκδηλώνουν εμφανείς ή συμπτωματικές ασθένειες αλλά σε μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, από 1 εβδομάδα έως 1 χρόνο. Η πλειοψηφία των DILIs είναι απρόβλεπτες και είναι είτε αντιδράσεις υπερευαισθησίας του ανοσοποιητικού συστήματος είτε ιδιοσυγκρασιακές ([16]; [25]).

Το κύριο μεταβολικό μονοπάτι για την πλειοψηφία των φαρμάκων είναι το ενζυμικό σύστημα του κυτοχρώματος P450 (CYP450), μια υπεροικογένεια ενζύμων οξειδάσης με πολλές λειτουργίες που περιέχουν αίμη ([19]). Η παθογένεση της DILI συνήθως περιλαμβάνει τη συμμετοχή ενός τοξικού φαρμάκου ή του μεταβολίτη του, οι οποίοι είτε προκαλούν την ανοσολογική απόκριση του οργανισμού ή επηρεάζουν τη βιοχημεία του κυττάρου. Το κυτταρικό στρες που προκαλείται μπορεί να οδηγήσει σε απόπτωση ή νέκρωση των κυττάρων, με βάση την έκταση της μιτοχονδριακής συμμετοχής, και της ισορροπίας των παραγόντων που ενεργοποιούν ή αναστέλλουν την Bcl-2 πρωτεϊνική οικογένεια και τις κασπάσες (Διάγραμμα 1). Σε κάθε περίπτωση, ο κυτταρικός θάνατος των ηπατοκυττάρων που προκύπτει προκαλεί ηπατικές βλάβες ([16]; [26]), ενώ μπορεί επίσης να επηρεάσει τα κολποειδικά ενδοθηλιακά κύτταρα και τους χοληδόχους πόρους του επιθηλίου ([25]).

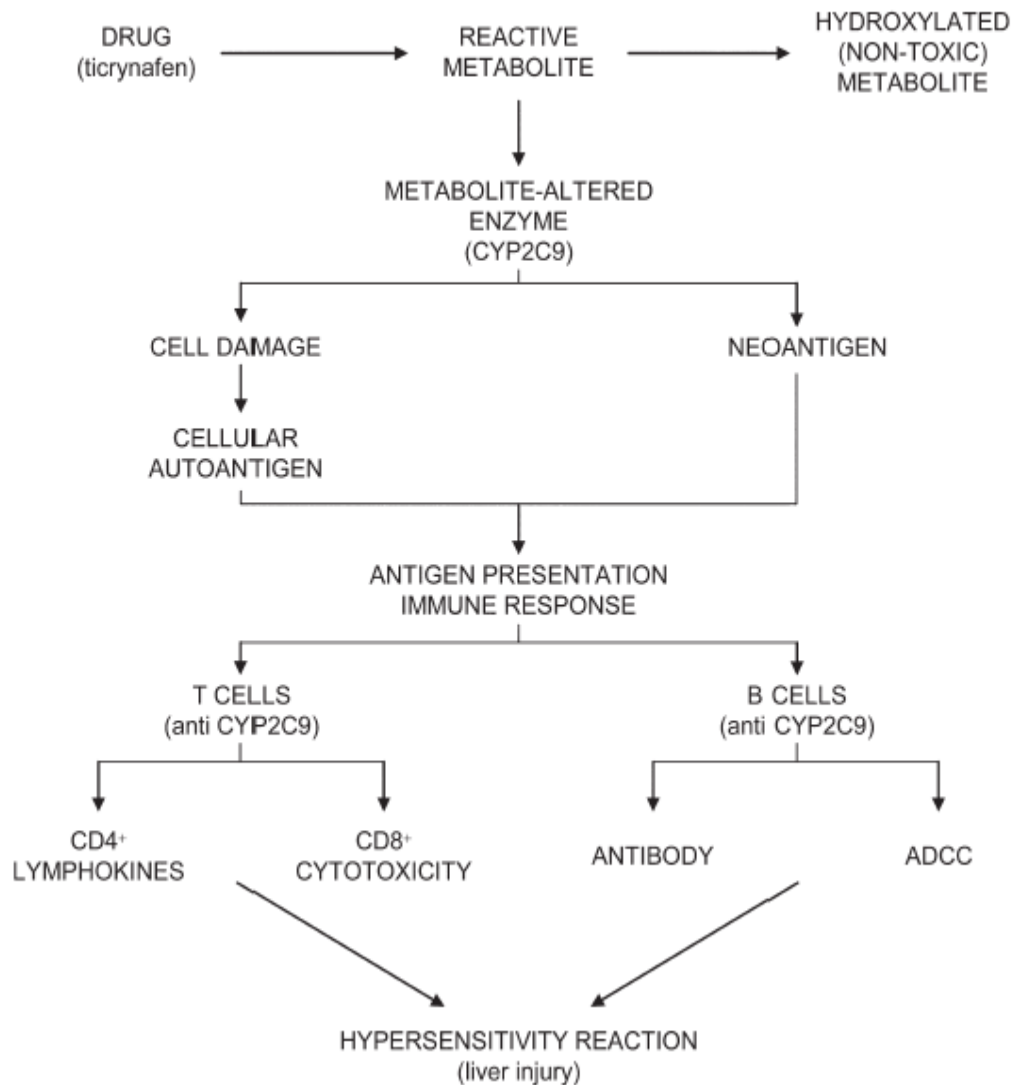
Η παθογένεση της DILI είναι δυνατό να εκδηλωθεί με πάρα πολλούς τρόπους ([19]). Οι μεταβολίτες των φαρμάκων μπορούν να προκαλέσουν πολλές χημικές αντιδράσεις, όπως ομοιοπολικές ενώσεις, μείωση της ανηγμένης γλουταθειόνης ή οξειδωτικό στρες με επακόλουθες συνέπειες σε πρωτεΐνες, λιπίδια και DNA. Όλες οι χημικές αυτές αντιδράσεις έχουν άμεσες συνέπειες στον οργανισμό επηρεάζοντας οργανίδια όπως τα μιτοχόνδρια και οι πυρήνες, αλλά και έμμεσες επιδράσεις ενεργοποιώντας ή αναστέλλοντας σηματοδοτικές κινάσες, μεταγραφικούς παράγοντες και γονιδιακή έκφραση ([26]).



Διάγραμμα 1: Κυτταρικοί μηχανισμοί ηπατοτοξικότητας ([25]).

Εναλλακτικά, ο ενεργός μεταβολίτης του φαρμάκου μπορεί να προσδεθεί ή να αλλοιώσει ορισμένες ηπατικές πρωτεΐνες, όπως τα ένζυμα του κυτοχρώματος P450, προκαλώντας ανοσολογική απόκριση και ανοσο-διαμεσολαβούμενο τραυματισμό ([27]; [28]). Ο μηχανισμός με τον οποίο προκαλείται η συγκεκριμένη αντίδραση δεν είναι ξεκάθαρος, αλλά υπάρχει πιθανότητα τα χαμηλού μοριακού βάρους οργανικά χημικά ή τα φάρμακα που δεν είναι ανοσογόνα να γίνουν όταν προσδεθούν σε κάποιο μακρομόριο, όπως μία πρωτεΐνη, αλλοιώνοντάς το με συνέπεια να ενεργοποιείται η ανοσολογική απόκριση του οργανισμού (Διάγραμμα 2) ([29]; [30]). Ορισμένοι άλλοι πιθανοί τρόποι παθόγενεσης της DILI είναι αλλαγές στην ιοντική ομοιόσταση και μιτροχονδριακή δυσλειτουργία προκαλώντας μείωση των επιπέδων της ATP, καθώς και αναστολή έκκρισης της χολερυθρίνης οδηγώντας σε χολόσταση και ίκτερο ([19]).

A mechanism for im-DILI



Διάγραμμα 2: Ένα από τα πιθανά μονοπάτια μέσω του οποίου προκαλείται ανοσο-διαμεσολαβούμενη ηπατοτοξικότητα ([31]).

Οι παράγοντες κινδύνου εμφάνισης της DILI περιλαμβάνουν τη δόση του φαρμάκου, τις χημικές του ιδιότητες π.χ. λιποφιλικότητα και την έκταση του ηπατικού μεταβολισμού. Επιπλέον, σε ορισμένες περιπτώσεις παράγοντες που σχετίζονται με το χρήστη του φαρμάκου, όπως φύλο, ηλικία, διατροφή και ύπαρξη άλλων ασθενειών, μπορεί να επηρεάσουν την εξέλιξη της ηπατοτοξικότητας, καθώς επίσης για συγκεκριμένα φάρμακα υπάρχουν ενδείξεις ότι μπορεί να υπάρχει και γενετική

προδιάθεση ([19]; [24]). Για λόγους που δεν είναι γνωστοί, οι γυναίκες φαίνεται να είναι πιο ευπαθείς στην ηπατοτοξικότητα, ενώ η ηλικία είναι πιθανό να σχετίζεται με τον μεταβολισμό και τον τρόπο που τον επηρεάζει ([19]).

1.2.2. ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΤΗΣ DILI

Με βάση τον ορισμό του FDA «ένας βιοδείκτης είναι ένα καθορισμένο χαρακτηριστικό που μετρείται ως δείκτης φυσιολογικών βιολογικών διεργασιών, παθολογικών διεργασιών, ή αποκρίσεων σε μία έκθεση ή παρέμβαση, συμπεριλαμβανομένων και των θεραπευτικών παρεμβάσεων». Οι βιοδείκτες είναι βιολογικές ουσίες, χαρακτηριστικά ή εικόνες που παρέχουν μία ένδειξη για τη βιολογική κατάσταση του οργανισμού και μπορεί να περιλαμβάνουν φυσιολογικούς δείκτες, όπως η αρτηριακή πίεση, μοριακούς δείκτες, όπως τα ηπατικά ένζυμα, και δείκτες απεικόνισης, όπως εκείνοι που προκύπτουν από την απεικόνιση μαγνητικού συντονισμού και την αγγειογραφία.

Σε επίπεδο έρευνας, οι βιοδείκτες παρέχουν ενδείξεις για την πιθανή αποτελεσματικότητα και τους δυνητικούς κινδύνους που σχετίζονται με μία θεραπευτική παρέμβαση. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν προκειμένου να γίνει κατανοητός ο μηχανισμός ή το βιολογικό μονοπάτι με βάση τον οποίο λειτουργεί ένα φάρμακο, να ληφθούν αποφάσεις για την ανάπτυξη ή όχι ενός φαρμάκου, να ελεγχθούν ενώσεις για τοξικότητα πριν εισέλθουν στο στάδιο των κλινικών δοκιμών και να γίνει πρόβλεψη ανεπιθύμητων συμβάντων που προκύπτουν από μεγαλύτερη έκθεση. Με αυτούς τους τρόπους, οι βιοδείκτες είναι δυνατό να μειώσουν το κόστος της ανάπτυξης φαρμάκων, να συμβάλλουν στην ασφάλεια των φαρμάκων και να επισπεύσουν την είσοδο ορισμένων φαρμάκων στην αγορά.

Η χρήση των βιοδεικτών στην ανάπτυξη των φαρμάκων παρουσιάζει ορισμένα προβλήματα σχετικά με την προγνωστική τους αξία, καθώς τα κριτήρια αξιολόγησής τους μεταβάλλονται συνεχώς. Τα κριτήρια που καθορίζουν την προγνωστική αξία ενός βιοδείκτη είναι η ειδικότητα, η ευαισθησία, η αξιοπιστία και η διακριτική του ικανότητα. Κανένας βιοδείκτης από μόνος του δε φαίνεται να έχει όλα τα απαραίτητα

χαρακτηριστικά που είναι ικανά να προσφέρουν την πλήρη κατανόηση μίας απόκρισης, γι' αυτό και προβλέπεται η μελλοντική χρήση συνδυαστικών βιοδεικτών προκειμένου να αυξηθεί η αποτελεσματικότητα και η ασφάλεια των φαρμάκων.

Η λανθασμένη χρήση ή ερμηνεία των βιοδεικτών μπορεί να είναι επιζήμια τόσο σε κλινικό όσο και σε ερευνητικό επίπεδο κατευθύνοντας εσφαλμένα τις θεραπευτικές και τις ερευνητικές ενέργειες. Προκειμένου οι βιοδείκτες να χρησιμοποιηθούν σωστά, πρέπει να κατανοηθεί η ειδικότητα και η ευαισθησία τους, το πώς και πού πρέπει να χρησιμοποιούνται, το πώς ερμηνεύονται σε κάθε περίπτωση και πώς πρέπει να επικυρωθούν σωστά ([5]; [32]; [33]).

1.2.2.1. *In vitro* βιοδείκτες της ηπατοτοξικότητας

Ομάδα Υψηλής Κινητικότητας B1 (HMGB1): Πρόκειται για μία πρωτεΐνη που προσδένεται στη χρωματίνη και απελευθερώνεται από τα κύτταρα που υπόκεινται στη νέκρωση. Δρα ως μόριο που σχετίζεται με βλάβες μοριακού μοτίβου (DAMP) στοχεύοντας τους υποδοχείς τύπου toll (TLR) και τον υποδοχέα τελικών προϊόντων της προηγμένης γλυκοζυλίωσης (RAGE). Εκκρίνεται ενεργά ως φλεγμονώδης μεσολαβητής από τα ανοσοκύτταρα σε υπερακετυλιωμένη μορφή (Acetyl-HMGB1), με συνέπεια να αποτελεί δείκτη ενεργοποίησης φλεγμονωδών διεργασιών που σχετίζονται με την ηπατοτοξικότητα από φάρμακα ([33]).

Γλουταμική Αφυδρογονάση (GLDH): Η γλουταμική αφυδρογονάση βρίσκεται στην εξωκυτάρια μήτρα των ηπατικών μιτοχονδρίων. Πρόκειται για ένα βιοδείκτη με σχετική ηπατο-ειδικότητα, ο οποίος συμβάλλει ως ένδειξη διαρροής των μιτοχονδριακών «περιεχομένων» στην κυκλοφορία. Σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις εμφανίζεται στα κεντρικά ηπατικά λοβία και απελευθερώνεται περισσότερο σε συνθήκες που σχετίζονται με τη νέκρωση της συγκεκριμένης περιοχής ([33]).

Κερατίνη-18 (K18): Είναι μία πρωτεΐνη τύπου I των ενδιάμεσων ινιδίων των απλών επιθηλίων και εκφράζεται από τα επιθηλιακά κύτταρα. Αποτελεί βιοδείκτη και της νέκρωσης αλλά και της απόπτωσης κυττάρων. Στην πρώτη περίπτωση

εκφράζεται όλο το μήκος της πρωτεΐνης, ενώ στη δεύτερη εκφράζεται ένα τμήμα της «κομμένο» από κασπάσες ([34]).

MicroRNA-122 (miR-122): Το miR-122 αντιπροσωπεύει το 70% του ολικού ηπατικού miRNA και εκφράζεται αποκλειστικά στο ήπαρ, γεγονός που το καθιστά ηπατο-ειδικό βιοδείκτη. Πρόκειται για ένα δείκτη ηπατοκυτταρικής νέκρωσης που προκαλείται από την ακεταμινοφένη ([33]; [34]).

Αφυδρογονάση της Σορβιτόλης (SDH): Πρόκειται για ένα κυτοσολικό ένζυμο, το οποίο αποτελεί ειδικό βιοδείκτη της οξείας ηπατοκυτταρικής βλάβης και είναι δείκτης της κυτταρικής νέκρωσης ([35]).

α-Γλουταθειόνη-S-Τρανσφεράση (α-GST): Η α-GST είναι ένα ενδοκυττάριο ένζυμο αποτοξίνωσης της φάσης II του ηπατικού μεταβολισμού. Βρίσκεται σε συγκέντρωση 2-5% στα ηπατοκύτταρα και αποτελεί δείκτη νέκρωσης των ηπατοκυττάρων. Πρόκειται για έναν ειδικό και ευαίσθητο βιοδείκτη της ηπατοτοξικότητας ([35]).

Αργινάση I: Είναι ένα ηπατικό ένζυμο καταβολισμού αργινίνης και αποτελεί βιοδείκτη κυτταρικής νέκρωσης που μπορεί να οφείλεται και σε ηπατοτοξικότητα ([35]).

Καρβαμοϋλοτρανσφεράση Ορνιθίνης (OCT): Είναι μία μιτοχονδριακή πρωτεΐνη του ήπατος και αποτελεί βιοδείκτη τραυματισμένων ηπατοκυττάρων, γεγονός που την καθιστά ηπατο-ειδική ([35]).

1.3. *In vitro* ΜΟΝΤΕΛΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ DILI

Ένα *in vitro* μοντέλο ηπατοτοξικότητας από φάρμακα είναι μία μη-κλινική μέθοδος πρόβλεψης ηπατικής βλάβης κατά τη διάρκεια ανάπτυξης φαρμάκων. Τα *in vitro* μοντέλα χρησιμοποιούνται για την έγκυρη διάγνωση πιθανής ηπατοτοξικότητας και συμβάλλουν σημαντικά στην ασφάλεια και αποτελεσματικότητα των φαρμάκων, καθώς παρέχουν τη δυνατότητα εκτίμησης και αναγνώρισης αρνητικών ενώσεων. Οι νέες μοριακές οντότητες (NME) με θετικά *in vitro* ευρήματα θα συνεχίσουν σε κλινικές δοκιμές και περαιτέρω ανάλυση, αλλά είναι σημαντικό τα *in vitro* μοντέλα να παρέχουν

πληροφορίες σχετικά με τα NMEs με αρνητικές επιδράσεις και να εκτιμηθεί το πλήρες δυναμικό τους.

Η μεγαλύτερη αδυναμία των περισσότερων *in vitro* μοντέλων είναι η έλλειψη δυνατότητας εκτίμησης και πρόβλεψης όλων των πτυχών της DILI. Ο στόχος των περισσότερων τοξικολογικών δοκιμών ήταν η ταξινόμηση των φαρμάκων/τοξινών ως οξείες τοξίνες εντός του ευρέως φάσματος ενώσεων, με τη χρήση απλών κυτταροτοξικών δοκιμών σε καθιερωμένες κυτταρικές σειρές όπως η HepG2, η HepaRG ή τα πρωτογενή ηπατοκύτταρα τρωκτικών. Παρολ' αυτά η συγκεκριμένη προσέγγιση δεν δύναται να εκτιμήσει τις ιδιοσυγκρατικές ηπατοτοξίνες. ([36])

Στη συνέχεια αναφέρονται τα κυριότερα 2D και 3D *in vitro* μοντέλα εκτίμησης της ηπατοτοξικότητας.

1.3.1. 2D *in vitro* ΜΟΝΤΕΛΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ DILI

1.3.1.1. Πρωτογενή Ανθρώπινα Ηπατοκύτταρα (pHH)

Τα πρωτογενή ανθρώπινα ηπατοκύτταρα θεωρούνται το βασικότερο μοντέλο, αλλά η ποσότητα του κατάλληλου ιστού είναι πολύ μικρή και η μειωμένη διάρκεια ζωής των κυττάρων στην καλλιέργεια είναι σημαντικό πρόβλημα στη συστηματική χρήση τους σε δοκιμές τοξικότητας. Επιπλέον, τα pHH φαίνεται ότι έχουν την τάση να αποδιαφοροποιούνται σε συνθήκες κυτταροκαλλιέργειας, γεγονός που φαίνεται ότι είναι ανάλογο της έκφρασης των ενζύμων κυτοχρώματος P450, η οποία μειώνεται δραματικά σχεδόν αμέσως μετά την απομόνωσή τους. Τέλος, τα pHH φαίνεται ότι παρουσιάζουν μεγάλη μεταβλητότητα ανάλογα με το δότη και την ιδιοσυγκρασία του.

1.3.1.2. Ηπατοκυτταρικές σειρές (π.χ. HepG2, HepaRG, HuH7)

Οι αδυναμίες που παρουσιάζουν τα pHH έγινε προσπάθεια να καλυφθούν από αθανατοποιημένες ανθρώπινες ηπατοκυτταρικές σειρές, όπως τα HepG2, τα HuH7 και τα HepaRG (από ανθρώπινο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα) κύτταρα.

Η ηπατοκυτταρική σειρά HepG2 παρουσιάζει ορισμένα από τα χαρακτηριστικά των ρΗΗ, όπως η έκφραση ορισμένων μεταβολικών ενζύμων και πυρηνικών υποδοχέων, και χρησιμοποιούνται κυρίως για τον έλεγχο ηπατοτοξικότητας καινούριων χημικών ενώσεων. Ωστόσο, τα χαμηλά επίπεδα έκφρασης των CYP450 ενζύμων τα καθιστούν ακατάλληλα για χρήση σε έλεγχο τοξικότητας μεταβολιτών, γεγονός που μειώνει την προγνωστική τους ικανότητα.

Προκειμένου να καλυφθούν οι περιορισμοί των HepG2, δημιουργήθηκε η κυτταρική σειρά HepRG που παρουσιάζει μεγαλύτερη έκφραση των CYP450 ενζύμων. Παρόλ' αυτά και αυτή η κυτταρική σειρά είναι λιγότερο ευαίσθητη στην ηπατοτοξικότητα από φάρμακα σε σύγκριση με τα ρΗΗ.

1.3.1.3. Ηπατοκύτταρα που προκύπτουν από επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα (iPS)

Τα iPS κύτταρα και τα ανθρώπινα εμβρυονικά βλαστοκύτταρα προσφέρουν τη δυνατότητα ανάπτυξης όλων των κυττάρων του ήπατος. Οι φαινότυποι αυτών των κυττάρων διαφέρουν πολύ με εκείνο των ώριμων ηπατοκυττάρων, υποδηλώνοντας ότι η διαφοροποίηση και η καλλιέργεια των κυττάρων αυτών απαιτεί βελτίωση. Επιπλέον, δεν είναι γνωστό εάν ο συγκεκριμένος φαινότυπος και τα λειτουργικά χαρακτηριστικά του δότη, διατηρούνται ή χάνονται κατά την καλλιέργειά τους ([5]; [36]; [37]; [38]; [39]).

1.3.2. 3D *in vitro* ΜΟΝΤΕΛΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ DILI

Τα παραδοσιακά 2D *in vitro* μοντέλα που βασίζονται στην καλλιέργεια μονοστοιβάδας δεν αντιπροσωπεύουν τις *in vivo* συνθήκες των κυττάρων. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι τα κύτταρα δεν έχουν την ίδια μορφολογία και δεν αναπαράγονται με τον ίδιο τρόπο. Για τον λόγο αυτό έχει γίνει η προσπάθεια δημιουργίας 3D μοντέλων που βελτιώνουν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων και μεταξύ των κυττάρων και της εξωκυττάριας μήτρας, όπως επίσης και της πολικότητας των ηπατοκυττάρων.

1.3.2.1. Πρωτογενή Ανθρώπινα Ηπατοκύτταρα (pHH)

Υπάρχουν 3 διαθέσιμοι τρόποι καλλιέργειας pHH σε 3D διάταξη: 1. οι υδρογέλες (φυσικές και συνθετικές), 2. τα ικριώματα και 3. 3D διαμόρφωση των κυττάρων χωρίς τη χρήση ικριωμάτων.

Οι φυσικές υδρογέλες που χρησιμοποιούνται, είναι συνήθως από κολλαγόνο (I, IV και rat tail derived) και Matrigel®, και αποτελούνται από εξωκυττάρια μήτρα και άλλες πρωτεΐνες. Το καλύτερο περιβάλλον για τα pHH προκύπτει όταν καλλιεργούνται μεταξύ δύο στρωμάτων κολλαγόνου ή συνδυασμού κολλαγόνου και Matrigel®, γνωστές και ως τεχνικές sandwich, οι οποίες προσομοιάζουν τον *in vivo* pHH φαινότυπο και διατηρούν μακροπρόθεσμα τις ηπατοκυτταρικές λειτουργίες όπως των CYP450 ενζύμων και της σύνθεσης ουρίας και αλβουμίνης. Οι συνθετικές υδρογέλες περιλαμβάνουν γέλες πεπτιδικών νανοϊνιδίων (όπως η PuraMatrix™), υδρογέλες πολυαιθυλενογλυκόλης (PEG), υδρογέλες υαλουρονικού οξέος (HA) και υδρογέλες ηπαρίνης. Η PEG υδρογέλη είναι εκείνη που χρησιμοποιείται συχνότερα διότι συμβάλλει στη διατήρηση της σύνθεσης της ουρίας και της λειτουργίας του CYP3A4 ενζύμου ([40]; [41]; [42]; [43]; [44]).

Τα φυσικά ικριώματα που χρησιμοποιούνται για την καλλιέργεια ηπατοκυττάρων σε 3D διαμόρφωση βασίζονται σε μακρομοριακούς φορείς όπως χιτίνη, αλγινικό, χιτοσίνη και ζελατίνη καθώς και σε συνδυασμούς τους. Αυτά που διατηρούν καλύτερα τις *in vivo* λειτουργίες των ηπατοκυττάρων είναι τα αλγινικά ικριώματα, τα ικριώματα με συνδυασμό χιτοσίνης-ζελατίνης και τα ικριώματα χιτοσίνης συνδυασμένα με αλγινικό ή ηπαρίνη. Τα συνθετικά ικριώματα που χρησιμοποιούνται βασίζονται σε πολυλακτικό οξύ (PLA), πολυλακτικό-συν-γλυκολικό οξύ (PGLA), πολυγλυκολικό οξύ (PGA), πολυστυρόλιο (PS) και πολυδιμεθυλοσιλοξάνιο (PDMS). Τα συνθετικά αυτά ικριώματα παρέχουν ένα καλύτερο περιβάλλον για την καλλιέργεια και τις υψηλές απαιτήσεις των pHH, καθώς συντελούν στην μακροπρόθεσμη διατήρηση των μεταβολικών τους λειτουργιών ([40]; [45]; [46]).

Η 3D διαμόρφωση των κυττάρων χωρίς τη χρήση ικριωμάτων αναφέρεται στις παραγράφους 1.3.2.2. και 1.3.2.3.

1.3.2.2. Πρωτογενή Ανθρώπινα Ηπατοκύτταρα (pHH) ή Συγκαλλιέργεια Κυττάρων σε Σφαιροειδή διαμόρφωση

Η καλλιέργεια των pHH και η συγκαλλιέργεια τους με μη παρεγχυματικά κύτταρα σε σφαιροειδή μορφή έχει ως αποτέλεσμα την υψηλή διατήρηση των μεταβολικών λειτουργιών των ηπατοκυττάρων, καθώς και τη διατήρηση της πολικότητάς τους. Η σφαιροειδής αυτή διαμόρφωση επιτρέπει στα ηπατοκύτταρα να αναπτύσσονται και να οργανώνονται όπως σε *in vivo* συνθήκες, αλλά η έλλειψη μηχανισμού διάχυσης δεν καλύπτει τις υψηλές ανάγκες των ηπατοκυττάρων σε οξυγόνο ([36]; [40]; [47]).

1.3.2.3. Πρωτογενή Ανθρώπινα Ηπατοκύτταρα (pHH) ή Συγκαλλιέργεια Κυττάρων σε Βιοαντιδραστήρες και Microfluidic συσκευές (Liver-on-a-chip)

Η καλλιέργεια των pHH και η συγκαλλιέργειά τους με NPCs σε βιοαντιδραστήρες και microfluidic συσκευές αποτελεί μία αρκετά δύσκολη και σύνθετη προσέγγιση για την μοντελοποίηση της ηπατοτοξικότητας από φάρμακα. Πρόκειται για το μοντέλο που μιμείται καλύτερα το *in vivo* περιβάλλον, διατηρώντας όλες τις μεταβολικές διεργασίες των ηπατοκυττάρων έως και 4 εβδομάδες χωρίς την αλλοίωσή τους. Αυτά τα μοντέλα είναι ικανά να παράγουν τα πιο αξιόπιστα δεδομένα σχετικά με την εκτίμηση της DILI. Παρόλ' αυτά, αυτές οι κατασκευές έχουν αρκετά μειονεκτήματα όπως η ανάγκη μεγάλων ποσοτήτων κυττάρων που είναι απαραίτητη προκειμένου να λειτουργήσουν, η αναγκαιότητα χρήστη υψηλής εξειδίκευσης και πολύς χρόνος προκειμένου να υπάρχουν ικανοποιητικά και αξιόπιστα αποτελέσματα ([36]).

Συμπερασματικά, τα τελευταία 10 χρόνια έχουν σημειωθεί δραματικές εξελίξεις στον τομέα των *in vitro* μοντέλων τοξικότητας, κυρίως για τη διάγνωση οξείας

ηπατοτοξικότητας από φάρμακα, αλλά ακόμα δεν υπάρχει διαθέσιμο μοντέλο που να προβλέπει οξεία ηπατοτοξικότητα από μία ουσία όπως η ακεταμινοφένη. Η διάγνωση της χρόνιας ηπατοτοξικότητας είναι λιγότερο ανεπτυγμένη, και μέχρις ώτου γίνει δυνατή η προσαρμογή των έμφυτων και των προσαρμοσμένων ανοσολογικών στοιχείων στα μοντέλα αυτά, είναι αρκετά δύσκολο να γίνει πρόβλεψη των συγκεκριμένων τύπων τοξικότητας πριν τις κλινικές μελέτες ([48]; [49]).

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Πρωτογενή Ανθρώπινα Ηπατοκύτταρα απομονώθηκαν από δείγματα βιοψίας ενήλικων ασθενών (Γενικό Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Αθηνών «Λαϊκό», Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, ProtaVio Ltd) με διπλή αιμάτωση και διατηρήθηκαν σε υγρό άζωτο σύμφωνα με πρωτόκολλα της Biopredic International (Saint-Gregoire France).

Τα κύτταρα παγολύθηκαν και επιστρώθηκαν, σύμφωνα με τα πρωτόκολλα της Biopredic International, σε 96-well plate και 384-well plates (Corning® Costar®) επιστρωμένες με Rat Tail Collagen I (BD Biosciences) σε πυκνότητα 50000 κύτταρα/well και 12500 κύτταρα/well (αντιστοίχως) σε θρεπτικό υλικό Williams' E με GlutaMAX™ (Thermo Fisher Scientific, 32551020) με προσθήκη 10% v/v Fetal Bovine Serum (Biosera, FB-1001/500), 10% πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη (Gibco Life Technologies, 15140122) και 1 μg/mL ινσουλίνη (Gibco Life Technologies, 12585014).

2.2. ΕΠΑΓΩΓΗ ΗΠΑΤΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΠΡΟΚΑΛΟΥΜΕΝΗΣ ΑΠΟ ΦΑΡΜΑΚΑ

Η επαγωγή της ηπατοτοξικότητας από φάρμακα έγινε με τη χρήση Triton-X (Appllichem) και των φαρμάκων Melatonin, Propranolol, Indomethacin και Rofecoxib (LOPAC 1280™). Η επιλογή των φαρμάκων έγινε με χρήση της βάσης δεδομένων LiverTox.

Τα φάρμακα Melatonin και Propranolol επιλέχθηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες, καθώς πρόκειται για επιβεβαιωμένα αρνητικά DILI φάρμακα, «Known NO» DILI αρνητικά φάρμακα, ενώ τα φάρμακα Indomethacin και Rofecoxib επιλέχθηκαν προς μελέτη διότι οι μηχανισμοί με τους οποίους υπάρχει η δυνατότητα επαγωγής DILI δεν είναι γνωστοί και πρόκειται για δύο μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα που χρησιμοποιούνται ευρέως για την αντιμετώπιση της χρόνιας αρθρίτιδας. Τέλος, το Triton-X χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας, καθώς προκαλεί λύση των κυττάρων.

Επαγωγή της ηπατοτοξικότητας από φάρμακα

Όλα φάρμακα ήταν εξαρχής διαλυμένα σε DMSO 100%. Τα κύτταρα εκτέθηκαν για 24 ώρες σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις (C_{max} , $20 * C_{max}$, $40 * C_{max}$, $60 * C_{max}$, $80 * C_{max}$, $100 * C_{max}$) των φαρμάκων και DMSO (ανάλογες με εκείνες των φαρμάκων) σε 0,1% v/v και 1% v/v στο θρεπτικό υλικό. 20 λεπτά πριν την χρώση των κυττάρων έγινε προσθήκη του Triton-X σε ορισμένα βοθρία με untreated κύτταρα. Η επαγωγή της DILI έγινε μόνο σε 384 well plates επιστρωμένα με Rat tail collagen I.

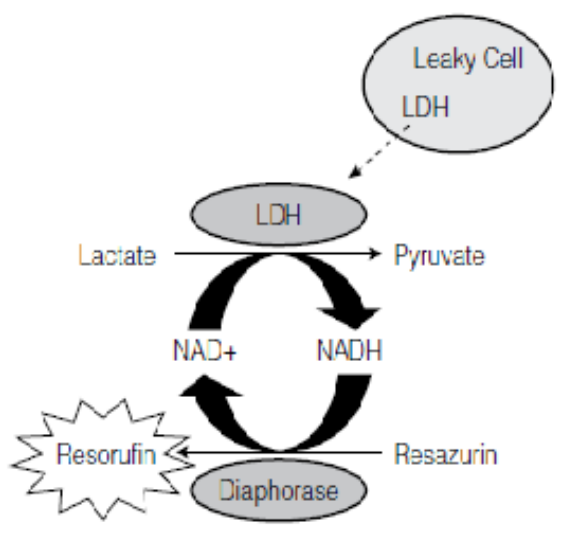
Φάρμακο	C_{max}*
Melatonin	0.006 ug/ml
Propranolol	0.05 ug/ml
Rofecoxib	0.21±0.1 ug/ml
Indomethacin	0.9 ug/ml

** C_{max} είναι η μέγιστη συγκέντρωση ενός φαρμάκου στον ορό σε ένα συγκεκριμένο σημείο ελέγχου στο σώμα, αφού το φάρμακο έχει χορηγηθεί και πριν τη δεύτερη δόση.*

2.3. ΜΕΘΟΔΟΣ LDH ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ-ΚΑΜΠΥΛΕΣ EC50

Η CytoTox-ONE™ Homogenous Membrane Integrity Assay είναι μία ομογενής φλουορομετρική μέθοδος για την εκτίμηση των μη ζωτικών κυττάρων σε πλάκες πολλαπλών βοθρίων. Η βιωσιμότητα των κυττάρων καθορίζεται κυρίως με βάση την ακεραιότητα της κυτταρικής μεμβράνης και η μέτρηση της διαρροής των στοιχείων του κυτταροπλάσματος στο θρεπτικό υλικό των κυττάρων αποτελεί μία έγκυρη μέθοδο για την εκτίμηση του αριθμού των μη ζωτικών κυττάρων.

Το CytoTox-ONE™ Assay είναι μία γρήγορη, φθορίζουσα μέτρηση της γαλακτικής αφυδρογονάσης (LDH) που απελευθερώνεται από τα κύτταρα με κατεστραμμένη μεμβράνη. Η LDH που απελευθερώνεται στο θρεπτικό υλικό μετριέται με μία 10λεπτη συζευγμένη ενζυματική δοκιμή που είναι αποτέλεσμα της μετατροπής του resazurin σε resorufin (Εικόνα 6). Η συγκεκριμένη μέθοδος δεν επηρεάζει τα υγιή κύτταρα, με αποτέλεσμα να μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε «μικτούς» πληθυσμούς με ζωντανά και νεκρά κύτταρα.



Εικόνα 6: Η απελευθέρωση του LDH από τα κατεστραμμένα κύτταρα μετριέται με τη χορήγηση λακτάσης, NAD⁺ και resazurin ως υποστρώματα, υπό την παρουσία diaphorase.

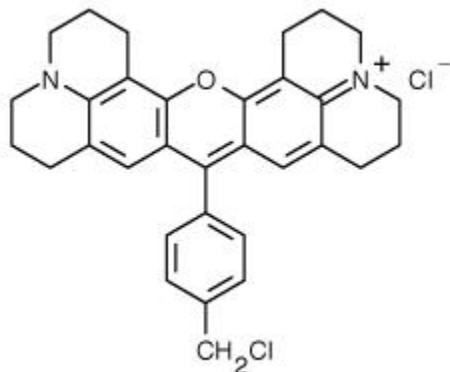
Η δοκιμή αυτή έγινε μετά από την 24ωρη έκθεση των pHH στη διαδικασία επαγωγής της DILI. Τα κύτταρα επώαστηκαν για 10 λεπτά σε θερμοκρασία 22°C και η 384-well plate ήταν προστατευμένη από το φως καθ' όλη τη διάρκεια της επώασης και της μέτρησης. Η μέτρηση του φθορισμού έγινε σε μήκος κύματος διέγερσης 560nm και μήκος κύματος εκπομπής 590nm στο Varioskan™ LUX multimode microplate reader (Thermo Scientific™). Η κυτταροτοξικότητα υπολογίστηκε με βάση τον τύπο:

$$\text{Percent Cytotoxicity} = 100 \times [(\text{Experimental} - \text{Culture Medium Background}) / (\text{Maximum LDH Release} - \text{Culture Medium Background})]$$

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή καμπύλης δόσης-τοξικότητας για τις ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν για την επαγωγή της DILI στα κύτταρα, με σκοπό να προσδιοριστούν οι συγκεντρώσεις που δεν μειώνουν τη βιωσιμότητα των κυττάρων κάτω από 50%. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό GraphPad Prism 6.0.

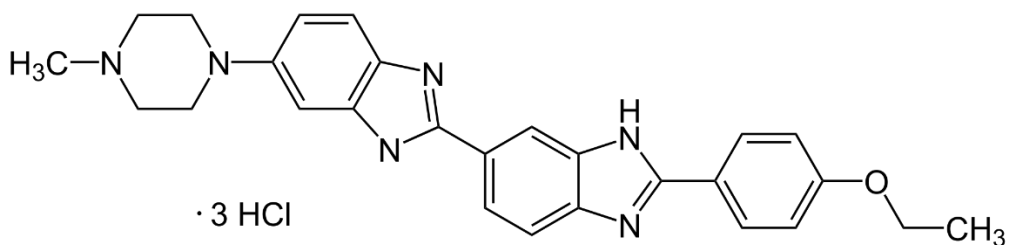
2.4. HIGH CONTENT SCREENING ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΗΠΑΤΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ

Για τη χρώση των μιτοχονδρίων χρησιμοποιήθηκε η κόκκινη φθορίζουσα χρωστική MitoTracker Red CMX Ros (Thermo Fisher Scientific, M7512). Ως αντιχρωματισμός χρησιμοποιήθηκε η μπλε φθορίζουσα χρωστική Hoechst 33342 (Thermo Fisher Scientific, H3570). Η MitoTracker Red CMX Ros χρησιμοποιείται για την χρώση των μιτοχονδρίων σε ζωντανά κύτταρα και η συσσώρευσή της εξαρτάται από μεμβράνη των μιτοχονδρίων. Φθορίζει σε περιβάλλοντα με μήκος κύματος διέγερσης 579nm και μήκος κύματος εκπομπής 599nm.



Εικόνα 7: Οργανική δομή MitoTracker Red CMX Ros

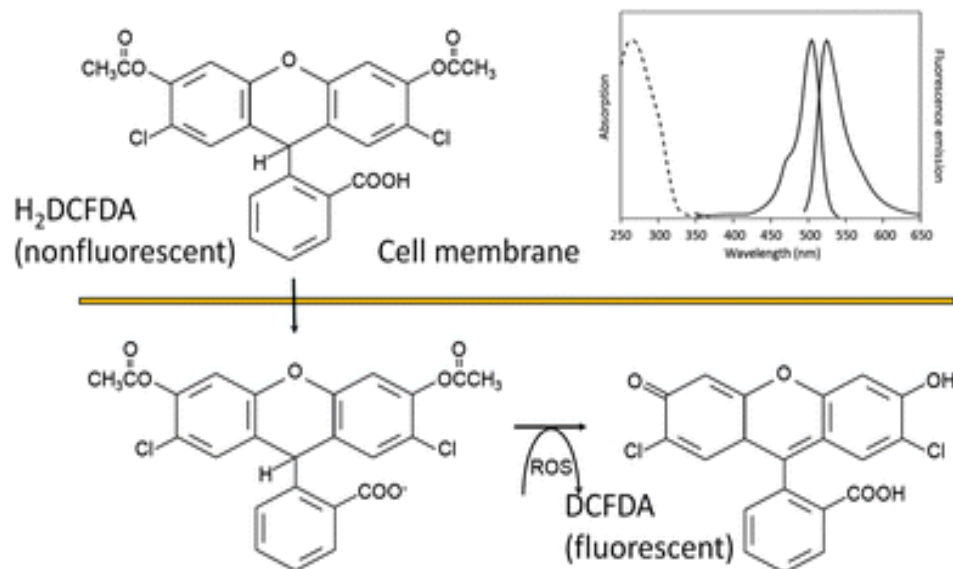
Το Hoechst 33342 είναι μία κυτταρικά διαπερατή χρωστική που εκπέμπει μπλε φθορισμό όταν προσδεθεί στο dsDNA (μήκος κύματος διέγερσης 392nm και μήκος κύματος εκπομπής 440nm).



Εικόνα 8: Οργανική δομή Hoechst 33342

Η απεικόνιση της ενδοκυτταρικής παραγωγής δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS) έγινε με χρήση του κυτταρικά διαπερατού φθορίζοντος υποστρώματος CM-H₂DCFDA (ThermoFisher Scientific, C6827).

Το CM-H₂DCFDA μεταφέρεται παθητικά στο εσωτερικό των κυτάρων, όπου οι ομάδες οξικού άλατος διασπώνται από τις ενδοκυτταρικές εστεράσες και η θειο-ενεργή χλωρομεθυλική ομάδα αντιδρά με την ενδοκυτταρική γλουταθειόνη και άλλες θειόλες. Η επακόλουθη οξειδωση δημιουργεί το φθορίζον προϊόν 2', 7'-dichlorofluorescein (DCF) που παγιδεύεται στο εσωτερικό του κυτάρου. Ο φθορισμός του DCFDA μπορεί να μετρηθεί σε μήκος κύματος διέγερσης 492-495nm και μήκος κύματος εκπομπής 517-527nm.



Εικόνα 9: Αντίδραση αναγωγής του CM-H₂DCFDA σε DCFDA μέσα στο κύτταρο

Χρώση των κυττάρων με MitoTracker Red CMX Ros: Μετά την έκθεση των κυττάρων στις επαγωγικές ουσίες για 24 ώρες, έγινε προσθήκη MitoTracker Red CMX Ros σε συγκέντρωση 200nM και επωάστηκαν για 30 λεπτά σε επωαστήριο 37°C, 5.0 CO₂, 90% υγρασία.

Χρώση των κυττάρων με Hoechst 33342: Μετά την έκθεση των κυττάρων στις επαγωγικές ουσίες για 24 ώρες, έγινε προσθήκη Hoechst 33342 σε συγκέντρωση 5ug/ml και επωάστηκαν για 15 λεπτά σε επωαστήριο 37°C, 5.0 CO₂, 90% υγρασία.

Χρώση των κυττάρων με CM-H₂DCFDA: Μετά την έκθεση των κυττάρων στις επαγωγικές ουσίες για 24 ώρες, έγινε αφαίρεση του θρεπτικού υλικού και πλύση των κυττάρων με PBS. Στη συνέχεια τα κύτταρα εκτέθηκαν σε 10μM CM-H₂DCFDA διαλυμένο σε PBS για 15 λεπτά σε επωαστήριο 37°C, 5.0 CO₂, 90% υγρασία.

Η λήψη των εικόνων έγινε με χρήση του JuLI™ Stage Real-Time CHR (Cell History Recorder) (NanoEnTek), με χρήση των καναλιών DAPI (Excitation 390/40, Emission 452/45), GFP (Excitation 466/40, Emission 525/50) και RFP (Excitation 525/50, Emission 580) και 10x και 20x οπτικού φακού.

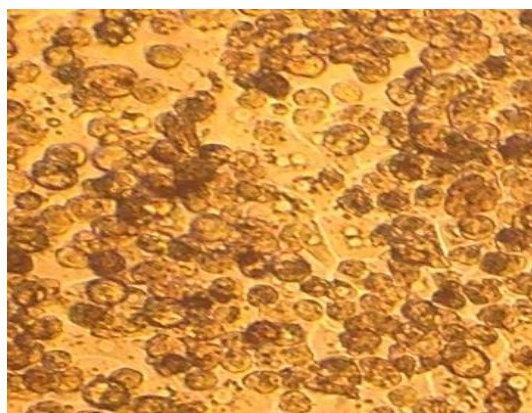
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΕ 96 ΚΑΙ 384 WELL PLATES

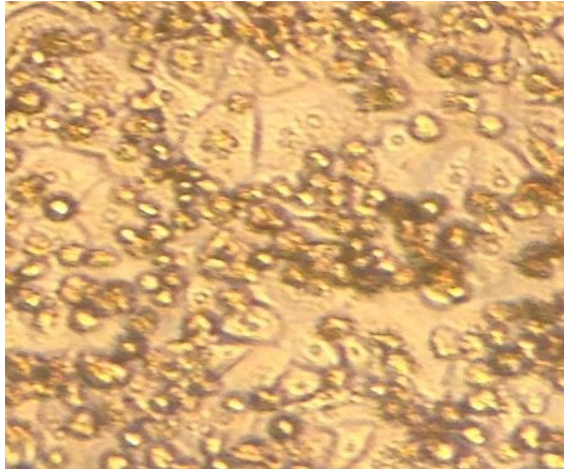
Για τη βελτιστοποίηση της πυκνότητας της καλλιέργειας των πρωτογενών ανθρώπινων ηπατοκυττάρων τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα. Επιπλέον, έγινε δοκιμή καλλιέργειας των κυττάρων σε πλάκες επιστρωμένες με Rat tail collagen I και χωρίς.

96-well plate (cells/well)	384-well plate (cells/well)
100000	50000
75000	25000
50000	12500
12500	6250
6250	-

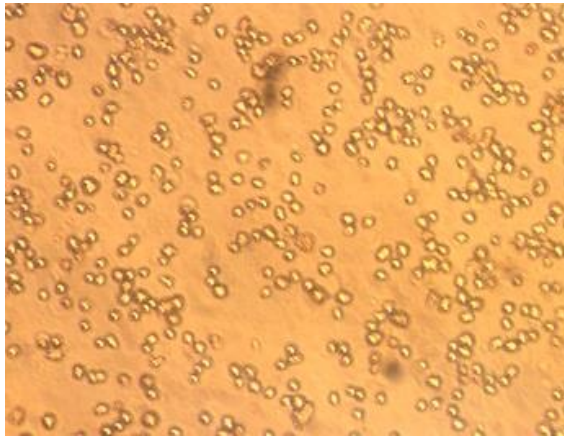
Με βάση τις εικόνες που λήφθηκαν από οπτικό μικροσκόπιο, διαπιστώθηκε ότι τα ρΗΗ παρουσιάζουν τον καλύτερο δυνατό φαινότυπο και την υψηλότερη βιωσιμότητα σε πλάκες επιστρωμένες με Rat tail collagen I και στις συγκεντρώσεις 50000 κυττάρων/well για την 96-well plate και 12500 κύτταρα/well για την 384-well plate.



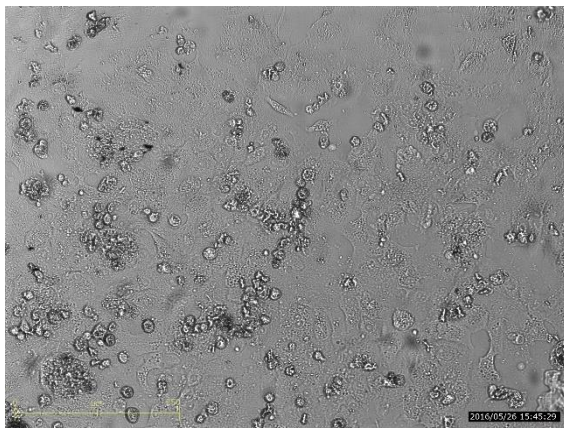
100000 cells/well in 96 well plate (rat tail collagen I)



50000 cells/well in 96 well plate (rat tail collagen I)



75000 cells/well in 96 well plate (without rat tail collagen I)



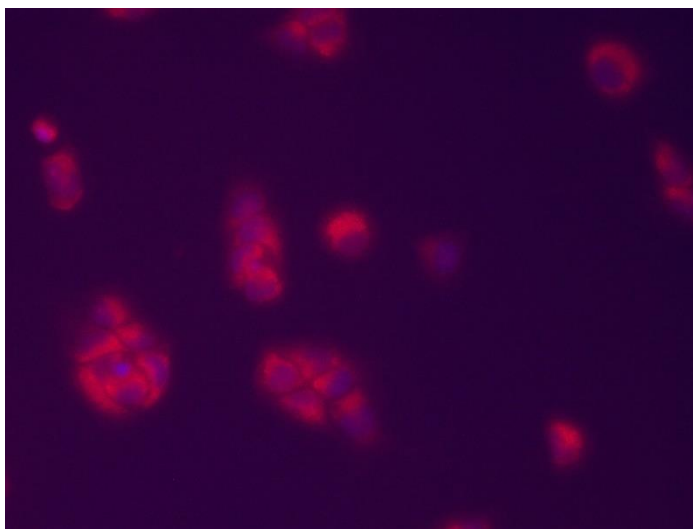
*12500 cells/well in 384 well plate (rat tail collagen I) -
Image acquired with JuLI™ Stage Real-Time CHR (10x)*

3.2. ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΩΝ ΧΡΩΣΤΙΚΩΝ Hoechst 33258, MitoTracker Red CMX Ros & CM-H2DCFDA

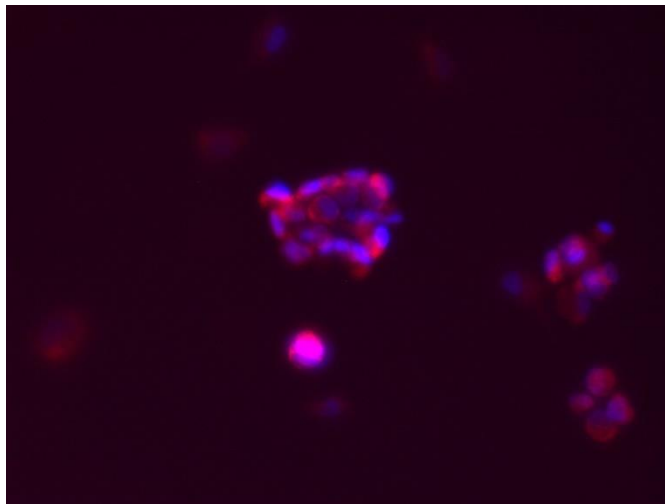
Για τη βελτιστοποίηση της χρωστικής MitoTracker Red CMX Ros χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις της χρωστικής σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα επώασης σε επωαστήρα 37°C, 5.0 CO₂, 90% υγρασία, όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

Συγκεντρώσεις MitoTracker Red CMX Ros (nM)	25, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500
Χρόνος επώασης (min)	15, 30, 45

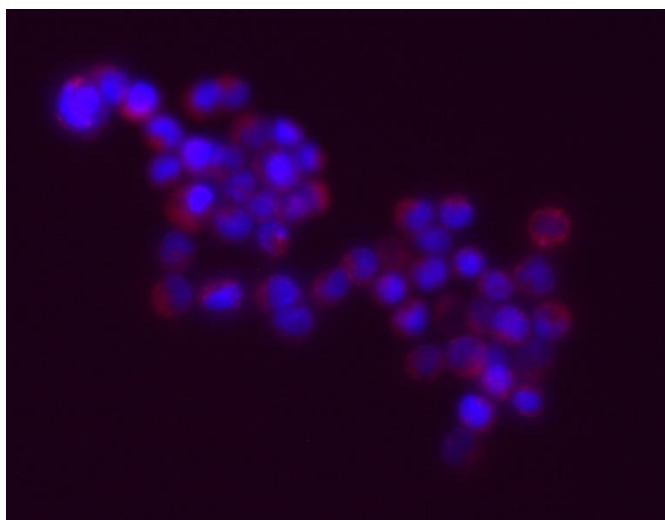
Με βάση τις εικόνες που λήφθηκαν με τη χρήση του JuLI™ Stage Real-Time CHR βρέθηκε ότι η καλύτερη δυνατή συγκέντρωση της χρωστικής είναι 200nM και ο χρόνος επώασης 30 λεπτά.



Συγκέντρωση 500nm για 30min



Συγκέντρωση 400nm για 45min

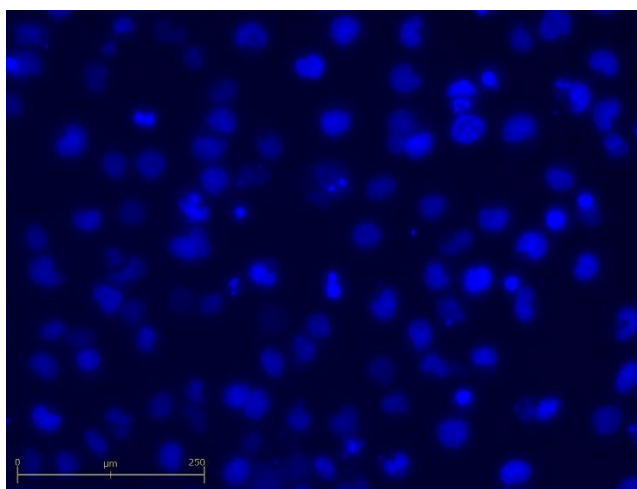


Συγκέντρωση 200nm για 30min

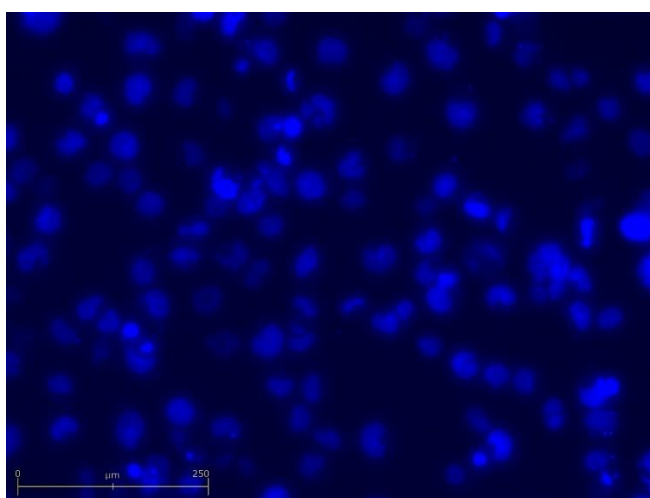
Για τη βελτιστοποίηση της χρωστικής Hoechst 33342 χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις της χρωστικής σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα επώασης σε επωαστήρα 37°C, 5.0 CO₂, 90% υγρασία, όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

Συγκεντρώσεις Hoechst 33342 (ug/ml)	5, 6, 7, 8, 9, 10
Χρόνος επώασης (min)	15, 20, 25, 30, 35

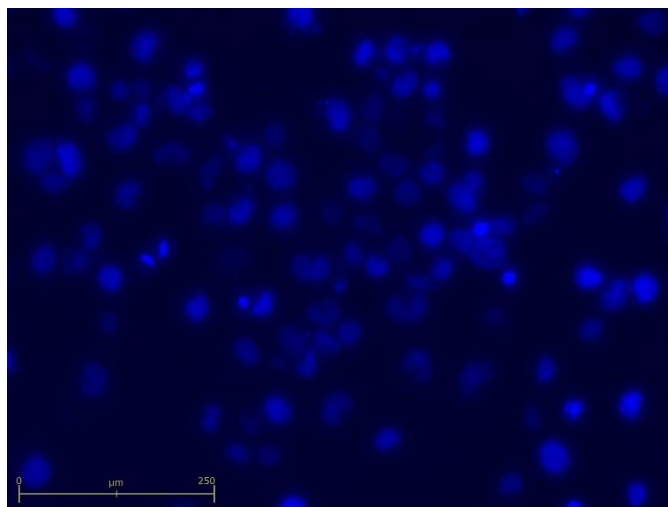
Με βάση τις εικόνες που λήφθηκαν με τη χρήση του JuLI™ Stage Real-Time CHR βρέθηκε ότι η καλύτερη δυνατή συγκέντρωση της χρωστικής είναι 5ul/ml και ο χρόνος επώασης 15 λεπτά.



Συγκέντρωση 10ug/ml για 30min



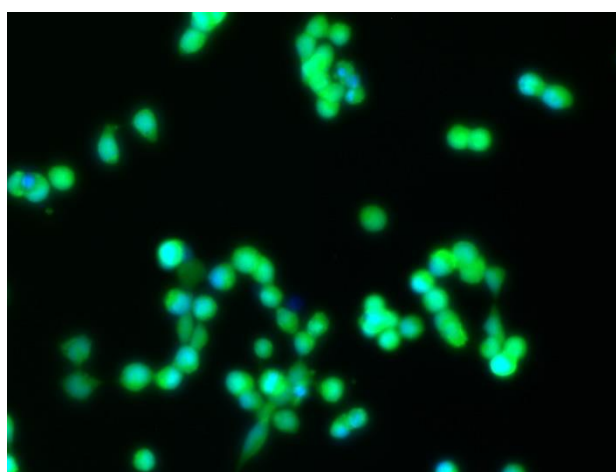
Συγκέντρωση 8ug/ml για 25min



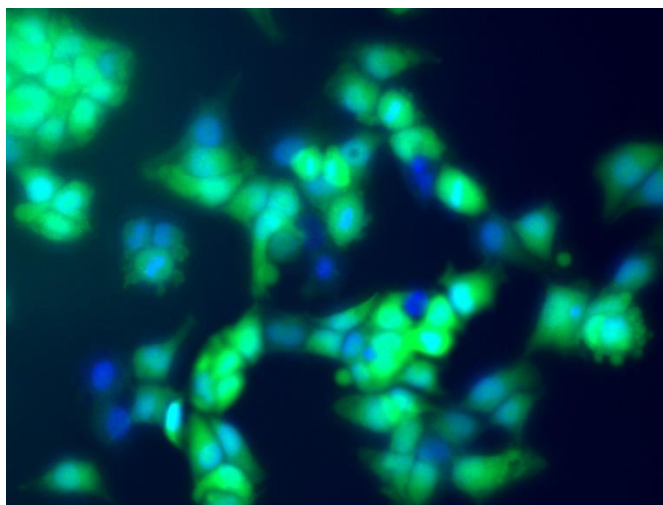
Συγκέντρωση 5ug/ml για 15min

Για τη βελτιστοποίηση της χρωστικής CM-H₂DCFDA χρησιμοποιήθηκαν 2 διαφορετικές συγκεντρώσεις της χρωστικής, 9uM και 10uM, σε 2 διαφορεικά μέσα, στο θρεπτικό υλικό των κυττάρων και σε PBS. Ως θετικός μάρτυρα επαγωγής της ROS χρησιμοποιήθηκε H₂O₂ σε 2 διαφορετικές συγκεντρώσεις, 1uM και 10uM, και έγινε επώαση για 30 λεπτά σε επωαστήρα 37°C, 5.0 CO₂, 90% υγρασία, πριν την προσθήκη της χρωστικής.

Με βάση τις εικόνες που λήφθηκαν με τη χρήση του JuLI™ Stage Real-Time CHR βρέθηκε ότι η καλύτερη δυνατή συγκέντρωση του H₂O₂ για επαγωγή της ROS είναι 10uM και της CM-H₂DCFDA είναι 10uM σε PBS.



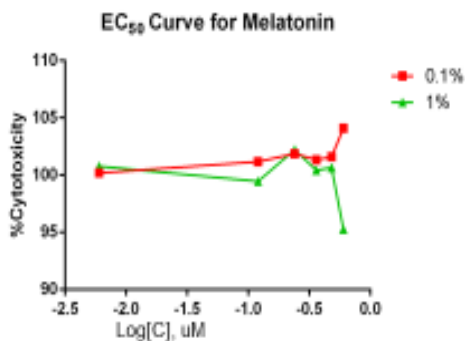
Αρνητικός μάρτυρας σε PBS



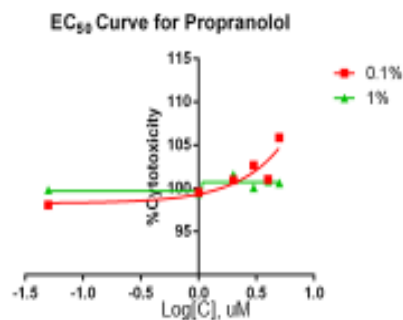
H2O2 10μM & CM-H2DCFDA 10μM σε PBS

3.3. ΠΡΟΚΑΤΑΡΚΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΠΟΥ ΠΡΟΚΥΠΤΟΥΝ ΑΠΟ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ CytoTox-ONE™

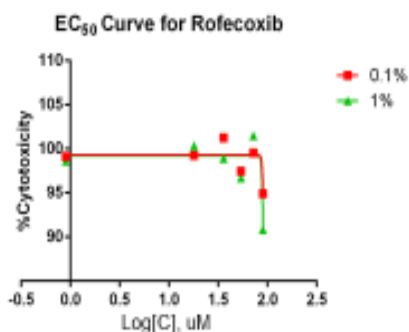
Με βάση το ποσοστό της κυτταροτοξικότητας μετά την επαγωγή της DILI στα κύτταρα σε συγκέντρωση 0,1% v/v και 1% v/v στο θρεπτικό υλικό των κυττάρων, δημιουργήθηκαν οι EC50 καμπύλες δόσης-βιωσιμότητας. Η μέτρηση έγινε σε 384-well plates και φάνηκε ότι τα αποτελέσματα είχαν αρκετό «θόρυβο», ενώ είναι πιθανό αυτό να οφείλεται στη μικρή συγκέντρωση των κυττάρων στα βοθρία μετά την επαγωγή της νόσου. Οι καμπύλες που προέκυψαν μετά την επεξεργασία των αποτελεσμάτων παρουσιάζονται στην παρακάτω εικόνα:



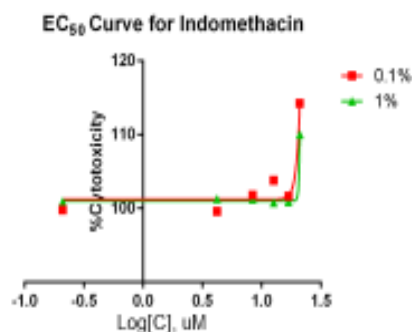
0,1% v/v EC₅₀ = 1.292
 1% v/v EC₅₀ = 0.641



0,1% v/v EC₅₀ = 1.742
 1% v/v EC₅₀ = 1.073



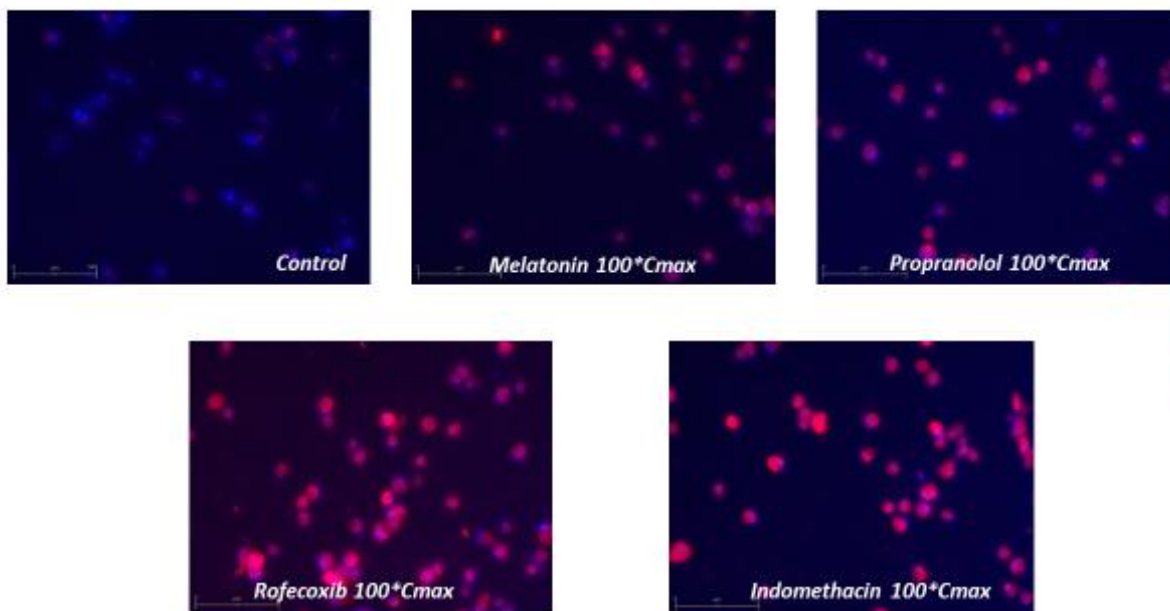
0,1% v/v EC₅₀ = 1.292
 1% v/v EC₅₀ = 0.641



0,1% v/v EC₅₀ = 1.292
 1% v/v EC₅₀ = 0.641

3.4. ΠΡΟΚΑΤΑΡΚΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΟΥ ΠΡΟΚΥΠΤΟΥΝ ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΠΑΓΩΓΗ ΤΗΣ DILI ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ HIGH CONTENT SCREENING ΚΑΙ ΤΩΝ ΧΡΩΣΤΙΚΩΝ Hoechst 33258 & MitoTracker Red CMX Ros

Μετά την επαγωγή της DILI στα κύτταρα έγινε χρώση των κυττάρων με τις χρωστικές και με τον τρόπο που αναφέρθηκε στο 3.2. Με τις εικόνες που λήφθηκαν με τη χρήση του JuLI™ Stage Real-Time CHR έγινε αντιληπτό ότι η χρήση του CM-H₂DCFDA δεν έδωσε τα αναμενόμενα αποτελέσματα, πιθανώς λόγω της μικρής συγκέντρωσης των κυττάρων μετά την επαγωγή της νόσου. Στην παρακάτω εικόνα εμφανίζονται κάποια προκαταρκτικά αποτελέσματα επαγωγής της DILI στο 2D *in vitro* μοντέλο:



4. ΕΠΙΛΟΓΟΣ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη έγινε βιβλιογραφική μελέτη της ηπατοτοξικότητας από φάρμακα (DILI) και αναφορά στα κυριότερα 2D και 3D *in vitro* μοντέλα για την εκτίμησή της. Μετά τη μελέτη της βιβλιογραφίας, επιλέχθηκε η καλλιέργεια των πρωτογενών ανθρώπινων ηπατοκυττάρων για την ανάπτυξη του 2D *in vitro* μοντέλου της DILI.

Κατά την πειραματική διαδικασία έπρεπε αρχικά να γίνει η βελτιστοποίηση των συνθηκών καλλιέργειας των ρΗΗ και η επιλογή κατάλληλων ρΗΗ για χρήση σε συνθήκες καλλιέργειας (πριν από κάθε πείραμα). Κατά τη βελτιστοποίηση της συγκέντρωσης των ηπατοκυττάρων σε 96-well plates και σε 384-well plates και διαπιστώθηκε ότι οι ιδανικές συγκεντρώσεις καλλιέργειας είναι 50000 κύτταρα/well και 12500 κύτταρα/well αντιστοίχως. Οι συγκεντρώσεις αυτές επιλέχθηκαν επειδή τα κύτταρα παρουσίαζαν το υψηλότερο ποσοστό βιωσιμότητας και τον καλύτερο δυνατό φαινότυπο, ενώ σε περίπτωση που τα κύτταρα παρότι είχαν καλλιεργηθεί σε αυτές τις συγκεντρώσεις δεν

παρουσίαζαν τα αναμενόμενα χαρακτηριστικά τότε δε συνεχιζόταν η πειραματική διαδικασία.

Στη συνέχεια έγινε βελτιστοποίηση της συγκέντρωσης και του χρόνου επώασης των κυριότερων φθορίζουσων χρωστικών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες μέτρησης της ηπατοτοξικότητας από φάρμακα: της Hoechst 33258, της MitoTracker Red CMX Ros και της CM-H₂DCFDA. Τέλος, έγινε επαγωγή ηπατοτοξικότητας από φάρμακα σε κατάλληλα πρωτογενή ανθρώπινα ηπατοκύτταρα σε 384-well plate σε μία προσπάθεια δημιουργίας ενός high throughput 2D *in vitro* μοντέλου. Από την προσπάθεια αυτή προέκυψαν κάποια πρωταρχικά αποτελέσματα, αλλά περαιτέρω πειράματα είναι αναγκαία για την ολοκλήρωση και τη βελτιστοποίηση του συγκεκριμένου μοντέλου.

Κατά την πειραματική διαδικασία διαπιστώθηκαν ορισμένες διαφορές των 96-well plates και των 384-well plates. Οι 96-well plates ήταν πολύ εύκολες στο χειρισμό με αποτέλεσμα η καλλιέργεια κ η ανάπτυξη των ρΗΗ να είναι περισσότερο αποδοτική, όπως και η συγκέντρωσή τους αρκετά μεγάλη ώστε να μπορούν να χρησιμοποιηθούν όλες οι τεχνικές εκτίμησης της ηπατοτοξικότητας ικανοποιητικά και να είναι δυνατή η συλλογή ποιοτικά καλύτερων εικόνων και στατιστικά σημαντικών αποτελεσμάτων. Τα μειονεκτήματα της 96-well plate είναι ότι απαιτεί μεγαλύτερη ποσότητα ρΗΗ και φαρμάκων προκειμένου να πραγματοποιηθεί η επαγωγή της DILI, όπως επίσης δεν προσφέρει τη δυνατότητα να γίνει το μοντέλο high throughput.

Σε αντίθεση, οι 384-well plates προσφέρουν τη δυνατότητα ενός high throughput μοντέλου, καθώς είναι δυνατή η μελέτη πολλών διαφορετικών φαρμάκων και σε πολλές διαφορετικές συγκεντρώσεις ταυτόχρονα, όπως επίσης είναι δυνατή η χρήση πολλών φθορίζουσων χρωστικών και σε διαφορετικούς συνδυασμούς στην ίδια πλάκα. Επιπλέον, απαιτεί σημαντικά μικρότερη ποσότητα ρΗΗ και φαρμάκων. Παρόλ' αυτά, η χρήση των 384-well plates δεν είναι εύκολη, απαιτεί υψηλή συγκέντρωση και ιδιαίτερο χειρισμό από το χρήστη και δεν διευκολύνει την καλλιέργεια ρΗΗ που είναι αρκετά ευαίσθητα στον χειρισμό. Διαπιστώθηκε επίσης, ότι η πυκνότητα των ρΗΗ μετά την επαγωγή της νόσου δεν ήταν αρκετή ώστε να μπορεί να χρησιμοποιηθεί η φθορίζουσα χρωστική CM-H₂DCFDA, καθώς επίσης και τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την δοκιμή τοξικότητας παρουσίασαν αρκετό «θόρυβο» πιθανότατα εξαιτίας του ίδιου προβλήματος.

Συμπερασματικά, η χρήση των pHH ως 2D *in vitro* μοντέλο για την εκτίμηση της DILI παρουσιάζει αρκετά προβλήματα. Πρόκειται για κύτταρα με μεγάλη ποικιλομορφία σε σχέση με το δότη, οπότε προτείνεται η δημιουργία «pools» ηπατοκυττάρων πριν την καλλιέργειά τους, δηλαδή μίγμα από ηπατοκύτταρα από διαφορετικούς δότες, προκειμένου τα αποτελέσματα που θα προκύψουν να είναι περισσότερο αντιπροσωπευτικά και να μην εξαρτώνται από την ιδιοσυγκρασία ενός μόνο δότη. Επιπλέον, προτείνεται η χρήση 96-well plates με επίστρωση Rat tail collagen I για την καλλιέργεια και την επαγωγή της νόσου, προκειμένου τα κύτταρα που υποβάλλονται στη δοκιμασία να είναι σε επαρκή συγκέντρωση ώστε να είναι δυνατή η χρήση περισσότερων τοξικολογικών δοκιμών, χρωστικών και ελέγχων που είναι αναγκαίοι για την επιβεβαίωση των επιδράσεων ενός φαρμάκου στα ηπατοκύτταρα. Τέλος, με την επιλογή 96-well plates αντί για 384-well plates περιορίζονται τα λάθη που μπορεί να προκύψουν από το χειρισμό, προσδίδοντας μεγαλύτερη αξιοπιστία στα αποτελέσματα που προκύπτουν από το μοντέλο.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Abdel-Misih, S.R.Z. and M. Bloomston, "Liver Anatomy", *Surgical Clinics of North America*, vol. 90, no. 4, pp. 643-653, 2010.
2. T. A. Roskams, N. D. Theise, C. Balabaud, G. Bhagat, P. S. Bhathal, *et al.*, "Nomenclature of the finer branches of the biliary tree: Canals, ductules, and ductular reactions in human livers", *Hepatology.*, vol. 39, no. 6, pp. 1739-1745, 2004.
3. A. Martinez-Hernandez, and P.S. Amenta, "The hepatic extracellular matrix. I. Components and distribution in normal liver", *VirchowsArchiv A, Pathological Anatomy and Histopathology*, vol. 423, no. 1, pp. 1-11, 1993.
4. D. Schuppan, M. Ruehl, R. Somasundaram, and E. G. Hahn, "Matrix as a modulator of hepatic fibrogenesis", *Seminars in Liver Disease.*, vol. 21, no. 351-372, 2001.
5. P. Godoy, N.J. Hewitt, U. Albrecht, M.E. Andersen, N. Ansari, *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”, *Archives of Toxicology*, vol. 87, pp. 1315-1530, 2013.
6. Z. Kmiec, “Cooperation of liver cells in health and disease”, *Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology*, vol. 161, pp. 1-151, 2001.
 7. K. Jungermann, “Zonation of metabolism and gene expression in liver”, *Histochemistry and Cell Biology*, vol. 103, pp. 81-91, 1995.
 8. K. Overturf, M. Al-Dhalimy, M. Finegold, and M. Grompe, “The repopulation potential of hepatocyte populations differing in size and prior mitotic expansion”, *The American Journal of Pathology*, vol. 155, no. 6, pp. 2135-2143, 1999.
 9. S. Celton-Morizur, G. Merlen, D. Couton, and C. Desdouets, “Polyploidy and liver proliferation: central role of insulin signaling”, *Cell Cycle*, vol. 9, no. 3, pp. 460-466, 2010.
 10. K.N. Jeejeebhoy, J. Ho, G.R. Greenberg, M.J. Phillips, A. Bruce-Robertson, and U. Sodtke, “Albumin, fibrinogen and transferrin synthesis in isolated rat hepatocyte suspensions. A model for the study of plasma protein synthesis”, *Biochemical Journal*, vol. 146, no. 1, pp. 141-155, 1975.
 11. J.V. Castell, M.J. Gómez-Lechón, M. David, T. Andus, T. Geiger, R. Trullenque, R. Fabra, and P.C. Heinrich, “Interleukin-6 is the major regulator of acute phase protein synthesis in adult human hepatocytes”, *FEBS Letters*, vol. 242, no. 2, pp. 237-239, 1989.
 12. A.F. Hofmann, “The enterohepatic circulation of bile acids in mammals: form and functions”, *Frontiers in Bioscience*, vol. 14, pp. 2584-2598, 2009.
 13. C. Guguen-Guillouzo, and A. Guillouzo, “General review on in vitro hepatocyte models and their applications”, *Methods in Molecular Biology*, vol. 640, pp. 1-40, 2010.
 14. G. Ostapowicz, R. J. Fontana, F. V. Schiødt, A. Larson, T. J. Davern *et al.*, “Results of a prospective study of acute liver failure at 17 tertiary care centers in the United States”, *Annals of Internal Medicine*, vol. 137, no. 12, pp. 947-954, 2002.
 15. L.M. Grant, and D.C. Rockey, “Drug-induced liver injury”, *Current Opinion in Gastroenterology*, vol. 28, no. 3, pp. 198-202, 2012.
 16. H. J. Zimmerman, “Drug-induced liver disease”, *Clinical Liver Disease*, vol. 4, no. 1, pp. 73-96, 2000.
 17. J. R. Senior, “What is idiosyncratic hepatotoxicity? What is it not?”, *Hepatology*, vol. 47, no. 6, pp. 1813-1815, 2008.
 18. A. Reuben, D.G. Koch, and W.M. Lee, “Drug-induced acute liver failure: results of a U.S. multicenter, prospective study”, *Hepatology*, vol. 52, no. 6, pp. 2065-2076, 2010.
 19. M. Holt, and C. Ju, “Drug-induced liver injury”, *Adverse Drug Reactions*, vol. 196, pp. 3-27, 2009.
 20. F. Ballet, “Hepatotoxicity in drug development: detection, significance and solutions”, *Journal of Hepatology*, vol. 26, no. 2, pp. 26-36, 1997.

21. M. Fung, T. Anna, M. Kathy, J. Wu, H. Ken, and M. Edmundo, "Evaluation of the characteristics of safety withdrawal of prescription drugs from worldwide pharmaceutical markets – 1960 to 1999", *Drug Information Journal*, vol. 35, no. 1, pp. 293-317, 2001.
22. M. Chen, H. Bisgin, L. Tong, H. Hong, H. Fang, J. Borlak, and W. Tong, "Toward predictive models for drug-induced liver injury in humans: are we there yet?", *Biomarkers in Medicine*, vol. 8, no. 2, pp. 201-213, 2014.
23. N. Kaplowitz, "Drug-induced liver disorders: implications for drug development and regulation", *Drug Safety*, vol. 24, no. 7, pp. 483-490, 2001.
24. M.D. Leise, J.J. Poterucha, and J.A. Talwalkar, "Drug-induced liver injury", *Mayo Clinic Proceedings*, vol. 89, no. 1, pp. 95-106, 2014.
25. N. Kaplowitz, "Drug-induced liver injury", *Clinical Infectious Diseases*, vol. 30, no. 2, pp. S44-S48, 2004.
26. N. Kaplowitz, "Biochemical and cellular mechanisms of toxic liver injury", *Seminars in Liver Disease*, vol. 22, no. 2, pp. 137-144, 2002.
27. Beune, PH and J. Lecoeur, "Immunotoxicity of the liver: adverse reactions to drugs", *Journal of Hepatology*, vol. 26, no. 2, pp. 37-42, 1997.
28. M. A. Robin, M. Le Roy, V. Descatoire, and D. Pessayre, "Plasma membrane cytochromes P450 as neoantigens and autoimmune targets in drug-induced hepatitis", *Journal of Hepatology*, vol. 26, no. 1, pp. 23-30, 1997.
29. N. R. Kitteringham B., and K. Park, "Drug-protein conjugation and its immunological consequences", *Drug Metabolism Reviews*, vol. 22, no. 1, pp. 87-144, 1990.
30. S. Knowles, J. Uetrecht, and N. Shear, "Idiosyncratic drug reactions: the reactive metabolite syndrome", *Lancet*, vol. 356, pp. 1587-1591, 2000.
31. I.R. Mackay, "Contemporary liver immunology and immunopathology: Obstacles and Opportunities", *Liver Immunology, New Jersey: Humana Press Inc.*, pp. 1-15, 2007.
32. IOM (Institute of Medicine), "Accelerating the Development of Biomarkers for Drug Safety: Workshop Summary", *Washington, DC: The National Academies Press*, 2009.
33. C. Goldring, A. Norris, N. Kitteringham, M. D. Aleo, D. J. Antoine *et al.*, "Mechanism-Based Markers of Drug-Induced Liver Injury to Improve the Physiological Relevance and Predictivity of In Vitro Models", *Applied in Vitro Toxicology*, vol. 1, no. 3, pp. 175-186, 2015.
34. L. M. Grant, and D. C. Rockey, "Drug-induced liver injury.", *Current opinion in gastroenterology*, vol. 28, no. 3, pp. 198-202, 2012.
35. J. Ozer, M. Ratner, M. Shawc, W. Bailey, and S. Schomaker, "The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity", *Toxicology*, vol. 245, pp. 194-205, 2008.
36. S. S. Bale, L. Verneti, N. Senutovitch, R. Jinda, M. Hegde, *et al.*, "In vitro platforms for evaluating liver toxicity", *Experimental Biology and Medicine*, vol. 239, pp. 1180-1191, 2014.

37. F. Yi, G.H. Liu, and J.C. Izpisua Belmonte, "Human induced pluripotent stem cells derived hepatocytes: rising promise for disease modeling, drug development and cell therapy.", *Protein Cell*, vol. 3, pp. 246-250, 2012.
38. M. Subba Rao, M. Sasikala, R. D. Nageshwar, "Thinking outside the liver: induced pluripotent stem cells for hepatic applications.", *World Journal of Gastroenterology*, vol. 19, pp. 3385-3396, 2013.
39. J. Shan, R.E. Schwartz, N.T. Ross, D.J. Logan, D. Thomas, S.A. Duncan, T.E. North, W. Goessling, A.E. Carpenter, S.N. Bhatia, "Identification of small molecules for human hepatocyte expansion and iPS differentiation.", *Nat. Chem. Biol.*, vol. 9, pp. 514-520, 2013.
40. A. Bachmann, M. Moll, E. Gottwald, C. Nies, R. Zantl, *et al.*, "3D Cultivation Techniques for Primary Human Hepatocytes", *Microarrays*, vol. 4, no. 1, pp. 64-83, 2015.
41. G. Mehta, C.M. Williams, L. Alvarez, M. Lesniewski, R.D. Kamm, and L.G. Griffith, "Synergistic effects of tethered growth factors and adhesion ligands on DNA synthesis and function of primary hepatocytes cultured on soft synthetic hydrogels", *Biomaterials*, vol.31, no. 17, pp. 4657-4671, 2010.
42. A. Skardal, L. Smith, S. Bharadwaj, A. Atala, S. Soker, and Y. Zhang, Y, "Tissue specific synthetic ECM hydrogels for 3-D *in vitro* maintenance of hepatocyte function", *Biomaterials*, vol. 33, no. 18, pp. 4565-4575, 2012.
43. M. Kim, J.Y. Lee, C.N. Jones, A. Revzin, and G. Tae, "Heparin-based hydrogel as a matrix for encapsulation and cultivation of primary hepatocytes", *Biomaterials*, vol. 31, no. 13, pp. 3596-3603, 2010.
44. E. Foster, J. You, C. Siltanen, D. Patel, A. Haque, L. Anderson, and A. Revzin, "Heparin hydrogel sandwich cultures of primary hepatocytes", *European Polymer Journal*, Article in Press, 2015.
45. D. Huh, G.A. Hamilton, and D.E. Ingber, "From 3D cell culture to organs-on-chips", *Trends in Cell Biology*, vol. 21, no. 12, pp. 745-754, 2011.
46. S. March, V. Ramanan, K. N. S. Trehan, Galstian, Gural, N, Scull, MA, Shlomai, A, Mota, MM, Fleming, HE, Khetani, SR, Rice, CM & Bhatia, SN, "Micropatterned coculture of primary human hepatocytes and supportive cells for the study of hepatotropic pathogens", *Nature Protocols*, vol. 10, no. 12, pp. 2027-2053, 2015
47. C.C. Bell, D.F.G. Hendriks, S.M.L. Moro, E. Ellis, J. Walsh, *et al.*, "Characterization of primary human hepatocyte spheroids as a model system for drug-induced liver injury, liver function and disease.", *Nature Scientific Reports*, vol.6, no. 25187, 2016.
48. D.A. Groneberg, C. Grosse-Siestrup, and A. Fischer, "*In vitro* models to study hepatotoxicity", *Toxicologic Pathology*, vol. 30, no. 3, pp. 394-399, 2002.
49. Zheiiang University, Hangzhou, "Prediction of cytochrome 450 mediated drug-drug interaction by three-dimensional cultured hepatocytes" in *Hemeproteins—*

Advances in Research and Application: 2013 Edition, ed. Q.A. Acton, Scholarly Editions, Atlanta, pp. 290, 2013.