

VU Research Portal

Inter-individual variation in hepatic drug metabolism

den Braver-Sewradj, S.P.

2018

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

citation for published version (APA)

den Braver-Sewradj, S. P. (2018). *Inter-individual variation in hepatic drug metabolism: The potential of in vitro assays in unraveling the role of metabolism in drug induced liver toxicity*. [PhD-Thesis - Research and graduation internal, Vrije Universiteit Amsterdam].

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

E-mail address:

vuresearchportal.ub@vu.nl

Nederlandse Samenvatting

Geneesmiddel-geïnduceerde leverschade (DILI) blijft een belangrijk volksgezondheidsprobleem, omdat het een van de belangrijkste redenen is voor het stopzetten van potentiële geneesmiddelen tijdens preklinische en klinische onderzoek in de ontwikkeling van geneesmiddelen. Bovendien is DILI voor op de markt gebrachte geneesmiddelen de belangrijkste oorzaak van acuut leverfalen en de introductie van veiligheidsmaatregelen die het gebruik limiteren. De meeste DILI-gevallen betreffen intrinsieke toxiciteit (voornamelijk paracetamol overdosering), wat betekent dat het geneesmiddel dosisafhankelijke en voorspelbare lever toxische effecten veroorzaakt. De meeste geneesmiddelen zijn veilig bij normaal gebruik, maar sommige geneesmiddelen veroorzaken zogenoemde idiosyncratische DILI (IDILI). De onderliggende mechanismen van IDILI zijn grotendeels onbekend. Deze vorm van leverschade kan daarom nog niet worden voorspeld op basis van preklinische en klinische studies. IDILI is vermoedelijk te wijten aan een combinatie van factoren die gerelateerd zijn aan het geneesmiddel, maar ook aan het individu. Veranderde metabolisme of afbraak van een geneesmiddel in een individu, met name de vorming van chemisch reactieve metabolieten (CRMs), wordt gepostuleerd als een belangrijke factor. De rol van enzymen betrokken in metabolisme van geneesmiddelen in (I)DILI is beschreven in **hoofdstuk 1**. Hiertoe worden leverenzymen betrokken in geneesmiddelmetabolisme (fase I en fase II) en geneesmiddeltransport (fase III) besproken. De rol van CRMs bij het ontstaan van leverbeschadiging en de vorming van CRMs door fase I of fase II metabolisme wordt beschreven aan de hand van voorbeelden uit de literatuur. De detoxificatie van CRMs is ook belangrijk, maar wordt soms nauwelijks in aanmerking genomen. De uiteindelijke cellulaire blootstelling aan CRMs is derhalve afhankelijk van de balans tussen vorming (bioactivatie) en detoxificatie. Verandering van dit evenwicht kan de gevoeligheid van een individu verhogen of verlagen om (I)DILI te ontwikkelen. Een kort overzicht wordt daarom gegeven van genetische en niet-genetische factoren die de interindividuele variabiliteit in geneesmiddelmetabolisme en bijwerkingen veroorzaken. Gegevens uit *in vitro* modellen dragen aanzienlijk bij aan het mechanistisch begrip van (I)DILI en hebben een groot potentieel om vroeg in het ontwikkelingsproces te contribueren aan het minimaliseren van het risico op (I)DILI voor potentiële geneesmiddelen. Een korte samenvatting wordt verstrekt van de huidige niet-cellulaire en cellulaire *in vitro* modellen die gebruikt worden om het metabolisme van een geneesmiddel en de toxiciteit die hieruit voortvloeit te onderzoeken. Het hoofdstuk wordt afgesloten met een korte bespreking over het nut van *in vitro* data om een patiënt / geneesmiddel combinatie met een hoog risico voor (I)DILI te identificeren.

Het onderzoek dat in dit proefschrift wordt beschreven is uitgevoerd in het kader van het IMI-ondersteunde MIP-DILI project. Het primaire doel van dit werk was het onderzoeken van de invloed van fase I en fase II metabolisme in de uitkomst van *in vitro* cytotoxiciteit analyses. Het eerste deel van dit proefschrift (**hoofdstukken 2 en 3**) focust op primaire humane hepatocyten (PHH). PHH worden beschouwd als de gouden standaard in *in vitro* onderzoek met betrekking tot geneesmiddel metabolisme in de lever en de daaruit volgende toxiciteit. De veranderingen in activiteiten van fase I en fase II enzymen als gevolg van specifieke kweekcondities zijn geëvalueerd. Het tweede deel (**hoofdstukken 4 tot en met 7**) is gericht op de evaluatie van interindividuele variatie in geneesmiddelmetabolisme als een risicofactor voor CRM-gerelateerde geneesmiddel toxiciteit.

De fase I-enzymfamilie cytochroom P450's (CYPs) en de fase II-enzymfamilies UDP-glucuronosyltransferasen (UGTs) en sulfotransferasen (SULTs) zijn het meest betrokken bij geneesmiddelmetabolisme. Deze drie enzymfamilies zijn actief in geïsoleerde PHH, hoewel activiteiten sterk afhankelijk zijn van de kweekcondities. PHH worden veelal gebruikt in suspensie (voor korte incubatietijden, meestal tot 4 uur) of in cultuur (voor langere incubatietijden, meestal 1 tot 7 dagen). In **hoofdstuk 2** werden drie model hepatotoxische geneesmiddelen, gekozen als trainingsverbindingen in het MIP-DILI-project (paracetamol, diclofenac en tolcapone), en een algemeen UGT / SULT-substraat (7-hydroxycoumarine) gebruikt om CYP-, UGT- en SULT-activiteiten in PHH in suspensie te vergelijken met PHH in cultuur. Donor-afhankelijke effecten van kweekcondities werden geëvalueerd in dit hoofdstuk door het metabolisme in PHH afkomstig van vijf donoren te evalueren. Zoals op basis van de literatuur werd verwacht, waren CYP-activiteiten significant lager in PHH in cultuur voor alle substraten en alle donoren. De exacte daling in CYP-activiteit was sterk afhankelijk van het substraat en, in mindere mate, van de donor. UGT-activiteiten waren voor sommige donor / substraatcombinaties vergelijkbaar tussen kweekcondities, maar in de meeste gevallen verlaagd in PHH in cultuur. Desalniettemin was de exacte daling in activiteit over het geheel genomen minder in vergelijking met CYP-activiteiten. De SULT-activiteiten daarentegen hadden geen duidelijke trend wanneer vergelijkingen gemaakt werden van kweekcondities voor specifieke substraat- / donorcombinaties. Tezamen tonen deze gegevens een veranderde verhouding tussen fase I / fase II metabolisme in PHH in cultuur ten opzichte van PHH in suspensie, en een substraat- en donorafhankelijkheid van deze verandering. Bovendien wordt de noodzaak van een goede karakterisering van relevante metabolische activiteiten in cellulaire *in vitro* modellen voor een correcte interpretatie van resultaten benadrukt.

Gerennommeerde methoden voor de bepaling van de activiteiten van de belangrijkste CYP-isovormen in intacte cellen *in vitro* zijn beschikbaar, maar soortgelijke benaderingen zijn niet geoptimaliseerd voor UGT's. Daarom beschrijft **hoofdstuk 3** de ontwikkeling van een methode voor de karakterisatie van de activiteiten van de belangrijkste hepatische UGT-isovormen (UGT1A1, UGT1A3, UGT1A4, UGT1A6, UGT1A9 en UGT2B7) in intacte PHH. Voor dit doel werden isovorm-selectieve substraten geselecteerd uit de literatuur welke karakterisatie van UGT-isovorm activiteiten in humane levermicrosomen (HLM) beschrijft. Het gebruik van een cocktail van substraten, zoals die over het algemeen wordt toegepast voor CYP-substraten, was niet mogelijk door cytotoxiciteit en interferentie van substraten die tegelijkertijd aanwezig waren in de PHH-incubaties. De optimalisatie van de methode werd daarom voortgezet met incubaties met afzonderlijke substraten. UGT-activiteiten werden bepaald in intacte PHH in suspensie en in cultuur, afkomstig van vijf donoren, en werden vergeleken met activiteiten in HLM van de respectievelijke donoren. De activiteiten van de belangrijke hepatische CYPs (CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 en CYP3A) werden analoog bepaald. De donorvariabiliteit van UGT- en CYP-activiteiten was vergelijkbaar tussen PHH en HLM, wat aangeeft dat metaboliëtvorming in PHH voornamelijk de enzymactiviteit weerspiegelde. In overeenstemming met **hoofdstuk 2** waren de UGT-activiteiten van de meeste isovormen vergelijkbaar in PHH in suspensie en cultuur, terwijl de activiteit van de meeste CYP-isovormen gedaald was in PHH in cultuur. Een belangrijke aanvullende bevinding was het aanzienlijke verlies van CYP2B6- en CYP2C19-activiteiten in HLM, wat verder benadrukt dat de bijdrage van specifieke CYP-isovormen aan het totale geneesmiddel metabolisme afhankelijk is van de keuze van het *in vitro* model. Samenvattend beschrijft **hoofdstuk 3** een relatief eenvoudige standaardanalyse voor het

bepalen van UGT- en CYP-activiteitsprofielen in intacte cellen. Een belangrijke additionele conclusie van **hoofdstukken 2 en 3** is het feit dat PHH een goed *in vitro* model vertegenwoordigt voor het onderzoeken van de interindividuele variabiliteit van fase I en II metabolisme van geneesmiddelen.

Vanaf **hoofdstuk 4** verschuift de focus van dit proefschrift van de verschillen in activiteiten van relevante enzymen tussen *in vitro* modellen naar interindividuele variabiliteit van geneesmiddelmetabolisme in de menselijke lever. Het is algemeen erkend dat variabiliteit in enzymactiviteiten resulteert in heterogeniteit van geneesmiddel werkzaamheid en veiligheid binnen de populatie. Hoewel variabiliteit in CYP-niveaus en activiteiten, en in zekere mate ook in UGT-niveaus, goed onderzocht is, zijn gegevens beperkt voor de resterende belangrijke enzymen, zoals SULTs en CRM-ontgiftende enzymen, zoals quinonereductases en glutathion S-transferasen (GSTs). Het doel van **hoofdstuk 4** was daarom om isovorm-specifieke activiteiten van CYPs, UGTs, quinonereductases, GSTT1 en GSTT2 en niet-specifieke activiteiten van SULTs en GSTs te bepalen in leverhomogenaten afkomstig van 20 donoren. Het werk wordt aangevuld door kwantificatie van cytosolische GST-isovormen (behalve GSTT1 en GSTT2) op eiwitniveau. De gevonden variabiliteit van CYP en UGT isovormen was in overeenstemming met gepubliceerde data. Hoewel de twee leden van de quinonereductase familie (NAD (P) H: quinonoxidoreductase 1, NQO1 en NRH: quinone oxidoreductase 2, NQO2), structureel sterk vergelijkbaar zijn, was de variatie in activiteit niet vergelijkbaar: NQO1 activiteit had een hogere variatie in vergelijking met NQO2. Evenzo waren in de GST-familie de GSTA1-niveaus relatief geconserveerd, terwijl van alle onderzochte enzymen de GSTM3-niveaus het meest variabel waren. Tenslotte maakt deze uitgebreide parallelle bepaling van activiteiten van alle belangrijke geneesmiddel metaboliserende enzymen een analyse van correlaties mogelijk. De meeste correlaties werden gevonden binnen en tussen UGT en CYP isovormen. Correlaties tussen enzymen zijn vooral belangrijk voor *in silico* voorspellingen van farmacokinetiek.

Hoofdstuk 5 is gewijd aan de quinonereductase familie. NQO1 en NQO2 kunnen beiden reactieve cyclische onverzadigde structuren, zoals quinonen en quinone imines, reduceren en worden daarom beschouwd als detoxificerende enzymen. Er is al eerder aangetoond dat NQO1 gekatalyseerde reactieve quinone imines afkomstige van geneesmiddelen kan reduceren, terwijl dergelijke informatie niet beschikbaar was voor NQO2. Ook de hepatische concentraties van NQO1 en NQO2, en daarmee ook hun mogelijke participatie in geneesmiddel metabolisme in de lever, waren onbekend. Daarom werden tijdens de analyse van NQO1- en NQO2-activiteiten (zoals beschreven in **hoofdstuk 4**) ijklijnen met recombinant NQO1 en NQO2 meegenomen om de NQO1- en NQO2-eiwitconcentraties in de 20 leverhomogenaten te kwantificeren. De hepatische NQO1 concentraties varieerden van 10 nM tot 213 nM, terwijl de hepatische NQO2 concentraties veel hoger waren, variërend van 2,4 µM tot 30,6 µM. Incubaties met recombinant eiwit toonden tevens aan dat NQO2, zoals NQO1, CRMs (afkomstig van paracetamol, clozapine, diclofenac en mefenaminezuur) kan reduceren. Bovendien toonden incubaties met gesynthetiseerde reactieve metaboliëten (afkomstig van amodiaquine en carbamazepine) aan dat lage nM (NQO1) of µM (NQO2) concentraties voldoende zijn om deze CRMs volledig te reduceren. Dit resultaat suggereert dat de leverconcentraties van beide quinonereductases voldoende zijn om een bijdragen te leveren aan detoxificatie van CRMs.

GSTs hebben een centrale rol in **hoofdstuk 6**. De resultaten betreffende de interindividuele variabiliteit in hepatische GST-expressie, zoals beschreven in **hoofdstuk 4**, werden verder uitgewerkt door bepaling van absolute leverconcentraties van de GST-isovormen (GSTA1> GSTA2> GSTM1> GSTP1> GSTT1> GSTM3).

Ook de incidentie van polymorfismen in de set van 20 donoren werd bepaald. De GSTs (GSTA1, GSTA2, GSTM2, GSTM3 en GSTP1) werden geïsoleerd uit de 20 leverhomogenaten, en werden geïncubeerd met de model hepatotoxische geneesmiddelen clozapine en diclofenac. Beide geneesmiddelen worden door CYP geactiveerd, wat resulteert in een reactief nitreniumion (clozapine) of twee quinone imines (diclofenac). Incubaties werden zodanig samengesteld dat de GST-concentraties vergelijkbaar zijn met de cytosolische niveaus. De resultaten weerspiegelden derhalve de interindividuele variabiliteit van hepatische GST-activiteiten in detoxificatie van CRMs afkomstig van clozapine- en diclofenac. Interindividuele variabiliteit in de vorming van CRMs afkomstig van clozapine- en diclofenac werd tevens onderzocht in afzonderlijke incubaties met HLM van elke individuele donor. Het evenwicht tussen bioactivatie en detoxificatie werd significant beïnvloed door GSTs, zowel voor clozapine als diclofenac. Deze bijdrage was afhankelijk van GSH-concentratie (clozapine) en van de chemische kenmerken van het reactieve metaboliet (diclofenac).

De rol van GSTs als detoxifierende enzymen wordt verder geëvalueerd in **hoofdstuk 7**. *In vitro* studies hebben eerder aangetoond dat GSTP1 de GSH-conjugatie van quinone imines afkomstig van het hepatotoxische geneesmiddel amodiaquine katalyseert. Echter, de beschermende rol van GST-enzymen in de lever is in zekere mate onduidelijk, aangezien het ook cellulaire signaaltransductie beïnvloedt, waardoor cel proliferatie en overleving wordt bepaald. De beschermende capaciteit van GSTP1 werd *in vitro* onderzocht door gezuiverde quinone imines van amodiaquine te incuberen met HepG2-cellen waarin GSTP1 tot overexpressie was gebracht met behulp van transfectie. Analyse van gevormde metabolieten toonden een toename in de vorming van GSH-conjugaten in GSTP1-getransfecteerde cellen, waarmee de katalytische activiteit van GSTP1 werd bevestigd. Bovendien verminderde behandeling met quinone imines de levensvatbaarheid van GSTP1-getransfecteerde cellen significant minder in vergelijking met mock-getransfecteerde cellen. Evenzo was caspase 3-activiteit, wat een maat voor apoptose activatie is, minder geïnduceerd na quinone imine behandeling in GSTP1-getransfecteerde cellen. Door middel van adaptieve stressrespons HepG2 reporters werd verder aangetoond dat amodiaquine quinone imines de ER-CHOP stressrespons activeren. Opvallend was dat activatie van deze stressrespons niet significant verschilde in GSTP1- en mock-getransfecteerde cellen. Deze resultaten impliceren dat GSTP1 HepG2-cellen beschermt tegen amodiaquine quinonimine cytotoxiciteit op twee verschillende manieren. Afgezien van de katalytische activiteit van GSTP1 werd de bescherming via modulatie van cellulaire signaaltransductie door GSTP1 gesuggereerd.