

Streszczenie pracy doktorskiej

mgr Agnieszka Kołakowska–Kulesza

„Badanie potencjalnych inhibitorów replikacji wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV)
w unikalnym systemie *in vitro*”

Promotor: prof. dr hab. med. Włodzimierz Gut
Pracę wykonano w: Zakładzie Wirusologii
w Narodowym Instytucie Zdrowia Publicznego PZH–Państwowym
Instytucie Badawczym

Wprowadzenie

Wirus HCV (hepatitis C virus) został zidentyfikowany w 1989 roku jako czynnik etiologiczny powodujący wirusowe zapalenie wątroby typu C (wzw C). Wzw C stanowi obecnie jeden z najpoważniejszych problemów zdrowotnych. Według szacunków Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) w roku 2015 około 70 milionów osób na świecie (1% populacji) zmagало się z przewlekłym zakażeniem tym wirusem. W Polsce liczba ta jest określana na około 200 tysięcy.

Wirus HCV charakteryzuje się wysoką zmiennością genetyczną. Dotychczas poznano 7 genotypów i 67 subtypów wirusa zapalenia wątroby typu C. Wiadomo także, że wirusa charakteryzuje powstawanie tzw. form rzekomych (quasi-species), w trakcie trwania zakażenia. Wysoka zmienność genetyczna wirusa zapalenia wątroby typu C ma ogromne znaczenie dla skuteczności terapii i opracowywania nowych leków przeciwwirusowych, które byłyby skierowane przeciwko wszystkim głównym genotypom HCV. Mimo, iż wdrożenie nowych terapii znacznie poszerzyło możliwości terapeutyczne, ich stosowanie wiąże się w sposób bezpośredni z ryzykiem pojawiania się lekoopornych wariantów wirusa. Ponadto jest to związane ze wzrostem kosztów terapii, a także możliwym występowaniem dodatkowych działań niepożądanych. Uwzględniając powyższe ograniczenia niezbędnym staje się opracowanie kolejnych leków o bezpośredniej aktywności przeciwwirusowej, co stało się inspiracją do podjęcia bieżących badań. Interesujący cel terapeutyczny stanowi białko NS3 wirusa wykazujące aktywność helikazową. Inhibitory helikazy/NTPazy mają wysoki potencjał jako leki przeciwwirusowe, ponieważ mogą działać w szerokim spektrum mechanizmów.

Cel pracy

Celem pracy była adaptacja modelu *in vitro* opartego na pełno genomowej konstrukcji pJFH-1 i linii komórkowej Huh 7.5 do badania aktywności przeciwwirusowej związków o różnorodnym pochodzeniu, charakteryzujących się odmiennymi właściwościami fizyko–chemicznymi. Dodatkowym celem było wykazanie skuteczności testowanych amidynowych pochodnych antybiotyków antarcyklinowych, pochodnych tropolonów i tetrazoli oraz

oligonukleotydów RNA w hamowaniu helikazy NS3/NTPazy, a tym samym inhibicji replikacji wirusa zapalenia wątroby typu C.

Materialy i metody

Potencjał inhibicyjny w stosunku do replikacji wirusa zbadano z zastosowaniem modelu *in vitro* opartego o linię komórkową Huh 7.5 transfekowaną konstruktem pJFH-1 (HCV genotyp 2a). Przebadano trzy grupy związków: amidynowe pochodne antybiotyków antracyklinowych (32 pochodne), pochodne tropolonów (6 pochodnych) i tetrazoli (4 pochodne) oraz oligonukleotydy (2 cząsteczki). Łącznie eksperyment przeprowadzono dla 44 substancji/cząsteczek. Związkami kontrolnymi użytymi w doświadczeniu były związki powszechnie stosowane w schematach terapeutycznych wzw C, tj.: interferon α , ribawiryna oraz telaprevir. Etapy przeprowadzonego doświadczenia obejmowały:

- a) pozyskanie plazmidowego RNA wirusa zapalenia wątroby typu C (JFH1–Japanese Fulminant Hepatitis) oraz sprawdzenie jego infekcyjności względem hodowli komórkowej metodami biologii molekularnej (PCR, analiza restrykcyjna, transkrypcja *in vitro*, elektroforeza DNA).
- b) badanie potencjalnych inhibitorów replikacji wirusa HCV przeprowadzone w zaadaptowanym systemie *in vitro*
- c) potwierdzenie aktywności przeciwhelikazowej wybranych związków metodami immunofluorescencji i western blot z zastosowaniem różnych systemów detekcji (poliklonalna surowica ludzka o sprawdzonym profilu przeciwciał, monoklonalne przeciwciała skierowane przeciwko białku NS3 wirusa HCV)

Ocenę aktywności inhibicyjnej testowanych związków w stosunku do replikacji wirusa HCV przeprowadzono na podstawie obserwacji zmian ilości wirusowego RNA w zakażonej hodowli metodą real time RT–qPCR w odniesieniu do komórek kontrolnych.

Oznaczenie cytotoksyczności badanych związków względem linii komórkowej wykonano z zastosowaniem kolorymetrycznego testu XTT, określającego cytotoksyczność substancji na podstawie hamowania aktywności komórkowej dehydrogenazy mitochondrialnej.

Analizę statystyczną uzyskanych wyników obejmującą korelację, regresję, jedno- i wieloczynnikową analizę wariancji przeprowadzono przy pomocy programu komputerowego Statgraphics for Windows, Centurion, v.XV.StatPointTech.Inc.USA.

Wyniki

Wykazano, że w zaproponowanym modelu *in vitro* opartym o linię komórkową Huh 7.5 transfekowaną konstruktem pJFH-1 wirus HCV genotyp 2a ulega replikacji i charakteryzuje się określoną dynamiką zmian ilości RNA.

Wyniki analiz statystycznych, w których oceniano wysokość dawki efektywnej (ED_{50}), wartość determinacji (r^2) [określającej jaki procent (%) zmienności w ilości wirusowego RNA zależy od zakresu stężeń badanej substancji/cząsteczki], oraz indeks terapeutyczny (IdT) testowanych substancji, pozwoliły na wybranie najlepiej rokujących związków. Wśród przebadanych pochodnych antybiotyków antracyklinowych za najlepsze uznano: pochodną doksorubicyny DOX-Fpaz ($R=99\%$; $IdT = 3,32$), pochodną epidoksorubicyny EDOX-Ahex ($R=94\%$; $IdT=2,02$) oraz pochodną epidaunorubicyny EDAU-Fpir ($R=91\%$; $IdT= 4,75$). Wśród przebadanych pochodnych tropolonów i tetrazoli za najlepsze uznano odpowiednio TR13 ($R=85\%$; $IdT = 2,71$) i TB1 ($R=65\%$; $IdT = 4,13$). Cząsteczki OLIGO-X oraz OLIGO-X-Me charakteryzowały się jednymi z najniższych wartości ED_{50} . Ze względu jednak na zaledwie średnią wartość determinacji, nie zaliczono ich do grupy związków efektywnie hamujących wirusową replikację. Badane grupy związków/cząsteczek charakteryzowały się niską cytotoksycznością w stosunku do komórek linii Huh 7.5.

Wyniki badań przeprowadzonych z zastosowaniem metod immunofluorescencji oraz western blot potwierdziły obecność białek wirusa HCV we wszystkich testowanych systemach detekcji.

Podsumowanie i wnioski

Dzięki przeprowadzonym doświadczeniom uzyskano stworzony w oparciu o linię Huh 7.5 model badawczy, który może służyć testowaniu potencjalnych inhibitorów replikacji wirusa zapalenia wątroby typu C. Ten stabilny model daje możliwość badania aktywności przeciwwirusowej związków/cząsteczek o różnych właściwościach fizyko-chemicznych. Jednoznaczne określenie modelu działania związku/cząsteczki wyłącznie w oparciu o jego strukturę chemiczną nie jest możliwe, dlatego należy każdorazowo przeprowadzić procedurę weryfikującą potencjał inhibicyjny testowanego związku/cząsteczki.

Na podstawie parametrów R i IdT za najskuteczniej działającą grupę związków uznano pochodne antybiotyków antracyklinowych. Badane związki cechowała niska cytotoksyczność w stosunku do komórek Huh 7.5, co wpływa pozytywnie na ocenę ich przydatności jako potencjalnych leków przeciwwirusowych.

Analiza wyników otrzymanych dzięki badaniom przeprowadzonym metodami immunofluorescencji oraz western blot potwierdziła, że pochodne antybiotyków antracyklinowych wpływają na proces replikacji wirusa zapalenia wątroby typu C zarówno przez hamowanie procesów wewnątrzkomórkowych, jaki i swoiste hamowanie helikazy wirusa. Zjawisko inhibicji metabolizmu komórkowego słabiej niż w przypadku pochodnej antracyklinowej, ujawnia się podczas zastosowania pochodnej tropolonu.