

University of Groningen

Exploring anti-fibrotic drugs

Luangmonkong, Theerut

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:
2017

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Luangmonkong, T. (2017). *Exploring anti-fibrotic drugs: Focusing on an ex vivo model of fibrosis*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. University of Groningen.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

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.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

Summary – Samenvatting - សរុប

Exploring anti-fibrotic drugs: Focusing on an *ex vivo* model of fibrosis

Fibrosis is a pathophysiological state characterized by the excessive formation and deposition of fibrous extracellular matrix (ECM) in the affected organ due to unresolved injury. Since excessive deposition of ECM disrupts normal organ architecture and functionality, end-stage fibrosis ultimately leads to organ failure. Currently, clinically effective anti-fibrotic drugs remain an unmet clinical need. In this thesis, I strived to explore the anti-fibrotic drugs for the treatment of liver fibrosis and to develop novel disease models, using precision-cut tissue slices.

Exploring anti-fibrotic drugs for the treatment of liver fibrosis

In chapter A1, the therapeutic efficacy of galunisertib, a small molecule inhibitor of transforming growth factor beta (TGF- β), was evaluated using human and rat precision-cut liver slices. It was clearly shown that galunisertib could mitigate fibrogenesis in both human and rat liver slices, mainly via inhibition of SMAD2 phosphorylation. Furthermore, our results revealed that the mechanism of action of galunisertib was based on interference with the production, maturation, formation and degradation of ECM. Therefore, galunisertib is a promising candidate drug for the treatment of liver fibrosis.

In chapter A2, I tested the anti-fibrotic potency of another TGF- β inhibitor, namely LY2109761. Clear anti-fibrotic effects in LX-2 cells, a human hepatic stellate cell line, as well as human and rat precision-cut liver slices were observed. Moreover, this effect was associated with inhibition of SMAD1 phosphorylation and reduced expression of the inhibitor of DNA binding 1 (ID1), which are the components of bone morphogenetic protein (BMP) signaling. Interestingly, the impact of LY2109761 on SMAD1 and ID1 was opposite to that of galunisertib. Thus, it was obvious that different small molecule inhibitors against TGF- β can elicit assorted, and sometimes opposing, off-target effects. Additionally, these findings suggest that SMAD1 signaling and ID1 are potential therapeutic targets warranting further investigation.

In chapter A3, the anti-fibrotic efficacy of several putative drugs that target either TGF- β or platelet-derived growth factor (PDGF) in human precision-cut liver slices was compared. As described, compounds affecting TGF- β signaling appear to be more effective than PDGF inhibitors. Furthermore, this study illustrated that SB203580, a specific inhibitor of p38-mitogen-activated protein kinase (MAPK), exhibited anti-fibrotic effects. Thus, p38-MAPK may play an important role in liver fibrogenesis.

Next to TGF- β , reactive oxygen species (ROS) can negatively affect physiological functioning of liver cells and induce fibrosis, as delineated in chapter A4. In addition, mitochondrial dysfunction, endoplasmic reticulum stress, NADPH oxidases (NOX) and Toll-like receptors (TLR) are potential oxidative stress-related therapeutic targets. Nevertheless, all of the putative inhibitors targeting ROS-associated processes are still under development. Furthermore, it should be noted that ROS also play a key role in physiological processes. Thus, targeting oxidative stress for the treatment of liver fibrosis must be accomplished while maintaining physiological ROS functions.

Development of novel disease models

In chapter B1, it is detailed that non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) can be induced in rat precision-cut liver slices cultured in specific culture media that mimic the pathophysiological causes of NAFLD, as illustrated by the presence of microvesicular steatosis. Interestingly, steatosis was associated with a reduction in the gene expression of carnitine palmitoyltransferase 1 (Cpt1), which is an essential enzyme responsible for lipid transport across the mitochondrial membrane. These findings imply that disruption of mitochondrial β -oxidation is the main process driving steatosis in this model. This novel pathophysiological *ex vivo* model can be an effective tool to investigate NAFLD-associated conditions particularly non-alcoholic steatohepatitis (NASH) and aid in drug discovery. Moreover, the tested culture media might possibly induce NAFLD in human liver slices, thereby improving the translational character of the model.

In chapter B2, tissue slices prepared from human kidneys, namely precision-cut kidney slices, were validated as a model of renal fibrosis. In the kidney slices, up-regulation of fibrosis-related genes and proteins were apparent during culture. Thus, human precision-cut kidney slices are a suitable tool for evaluating putative anti-fibrotic drugs for the treatment of renal fibrosis.

Conclusion

This thesis has greatly improved the understanding of liver fibrosis and has demonstrated the applicability of precision-cut tissue slices for drug discovery. Overall, our results demonstrated that galunisertib is the most promising drug candidate for the treatment of liver fibrosis. However, additional (clinical) studies are needed to fully unveil the therapeutic potential of this compound. In addition, other pro-fibrogenic factors such as BMPs, PDGF, p38-MAPK and ROS-derived oxidative stress are interesting targets that require further investigation. Furthermore, this thesis has clearly shown that precision-cut tissue slices can also be used as a model of other pathologies including NAFLD and renal fibrosis. These newly established disease models vastly support future research efforts into fibroproliferative diseases as well as drug development.

OP ZOEK NAAR MEDICIJNEN TEGEN OVERMATIGE LITTEKENVORMING: EEN EX VIVO-ONDERZOEKSMODEL

Fibrose is een pathofysiologische status die wordt gekenmerkt door de overmatige vorming van littekenweefsel in een orgaan als gevolg van chronische schade. Op termijn leidt fibrose tot orgaanfalen en soms de dood. Helaas zijn er nog geen klinisch effectieve anti-fibrotische medicijnen voorhanden. In dit proefschrift onderzoeken we daarom potentiële geneesmiddelen voor de behandeling van leverfibrose met behulp van precisie gesneden weefselplakken (precision-cut tissue slices). Daarnaast hebben we de slices gebruikt om nieuwe ziektemodellen te ontwikkelen.

Potentiele anti-fibrotische geneesmiddelen voor de behandeling van leverfibrose

In hoofdstuk A1 werd de therapeutische werkzaamheid van galunisertib, een remmer van de pro-fibrotische factor TGF- β , geëvalueerd in humane en ratleverslices. Er kon worden aangetoond dat galunisertib in zowel menselijke als ratleverslices het ontstaan van fibrose vermindert, voornamelijk door het remmen van SMAD2 fosforylering. Bovendien bleek uit onze resultaten dat de werking van galunisertib voornamelijk beruiste op het modificeren van de productie, vorming en afbraak van extracellulaire matrix eiwitten, het voornaamste onderdeel van littekenweefsel. Galunisertib lijkt daarom een veelbelovend geneesmiddel voor de behandeling van leverfibrose.

In hoofdstuk A2 hebben we de anti-fibrotische effectiviteit van een andere TGF- β remmer, namelijk LY2109761, getest. We laten zien dat LY2109761 duidelijke anti-fibrotische effecten heeft in LX-2-cellen, een menselijke leverstellaatcellijn, evenals in humane en ratleverslices. Deze anti-fibrotische effecten waren gerelateerd aan de remming van SMAD1 fosforylering en de verminderde expressie van inhibitor of DNA binding 1 (ID1), beide onderdeel van de bone morphogenetic proteins (BMP) signaalroute. Daarnaast bleek dat het effect van LY2109761 op SMAD1 en ID1 tegengesteld is aan het effect van galunisertib. Dit maakt eens te meer duidelijk dat verschillende remmers van de TGF- β signaalroute diverse en soms tegengestelde off-target effecten kunnen hebben. Daarnaast suggereren deze bevindingen dat SMAD1-signalering en ID1 potentiële therapeutische doelen zijn die verder onderzoek behoeven.

In hoofdstuk A3 vergeleken we de anti-fibrotische effectiviteit van verschillende potentiële geneesmiddelen die invloed hebben op de TGF- β of PDGF (ook een pro-fibrotische factor) signaalroute. Zoals beschreven, blijken middelen die de TGF-signalering beïnvloeden effectiever te zijn dan PDGF-remmers. Bovendien laat deze studie zien dat SB203580, een specifieke remmer van p38-MAPK, anti-fibrotische eigenschappen heeft. Dit betekent dat p38-MAPK een belangrijke rol speelt in het ontstaan van leverfibrose.

Naast TGF- β kunnen zuurstofradicalen (ROS) het functioneren van levercellen negatief beïnvloeden en fibrose induceren, zoals beschreven in hoofdstuk A4. Bovendien zijn mitochondriale dysfunctie, endoplasmatisch reticulum-stress, NADPH oxidasen en toll-like receptoren potentiële therapeutische aangrijpingspunten gerelateerd aan oxidatieve stress. Desalniettemin bevinden alle remmers van ROS-geassocieerde processen zich nog in de experimentele fase. Verder moet opgemerkt worden dat ROS ook een sleutelrol spelen in normale fysiologische processen. Derhalve moeten eventuele medicijnen voor leverfibrose, gericht op oxidatieve stress, ervoor zorg dragen dat de fysiologische functies van ROS niet in het geding komen.

Ontwikkeling van nieuwe ziekte modellen

In hoofdstuk B1 is gedetailleerd beschreven hoe niet-alcoholische leververvetting (NAFLD) kan worden geïnduceerd in leverslices door gebruik te maken van een specifiek kweekmedium dat de pathofysiologische oorzaken van NAFLD nabootst. In leverslices is vetting geassocieerd met een verminderde genexpressie van carnitine palmitoyl transferase 1 (Cpt1), een essentieel enzym dat nodig is om vetzuren in het mitochondrion te brengen. Deze bevindingen geven aan dat verstoorde vetzuuroxidatie ten grondslag ligt aan de ontwikkeling van vetting in dit model. Dit nieuwe experimentele model is een effectief instrument om NAFLD-geassocieerde aandoeningen te bestuderen, in het bijzonder niet-alcoholische steatohepatitis (NASH), en geneesmiddelenonderzoek te ondersteunen.

In hoofdstuk B2 werden de nierslices, bereid uit menselijke nieren, gevalideerd als model van nierfibrose. In de nierslices was er een duidelijke toename van fibrose-gerelateerde genen en eiwitten waar te nemen tijdens de kweek. De resultaten beschreven in dit hoofdstuk laten zien dat nierslices een geschikt hulpmiddel zijn voor het evalueren van potentiële geneesmiddelen voor de behandeling van nierfibrose.

Conclusie

Dit proefschrift heeft ons begrip van leverfibrose aanzienlijk verbeterd en heeft aangetoond dat leverslices gebruikt kunnen worden voor geneesmiddelenonderzoek. Over het geheel genomen hebben onze resultaten aangetoond dat galunisertib een veelbelovend kandidaat-geneesmiddel is voor de behandeling van leverfibrose. Dit werk is een uitstekende fundering voor toekomstig onderzoek naar orgaanfibrose.

การค้นหายาต้านการเกิดพังผืดด้วยเทคนิคการศึกษาเนื้อเยื่อภายนอกร่างกาย

“พังผืด” เป็นพยาธิสภาพที่เกิดจากการสะสมสารภายนอกเยื่อหุ้มเซลล์มากกว่าสมดุลปกติ การสะสมสารนอกเยื่อหุ้มเซลล์นี้ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเนื้อเยื่อ ขัดขวางการทำงาน และอาจทำให้อวัยวะที่เกิดพังผืดล้มเหลวได้ในที่สุด สาเหตุหลักของการเกิดพังผืดคือความเสียหายของเนื้อเยื่อและอวัยวะเป็นระยะเวลานานโดยที่ไม่ได้รับการรักษาอย่างเหมาะสม เช่น พังผืดที่ตับมักเกิดจากการติดเชื้อไวรัสตับอักเสบ การติดเชื้อเรื้อรัง โรคไขมันพอกตับที่มีภาวะการอักเสบร่วมด้วย เป็นต้น ถึงแม้ว่าการเกิดพังผืดจะเป็นพยาธิสภาพที่จำเป็นต้องได้รับการรักษา แต่ในปัจจุบันกลับยังไม่มียาต้านการเกิดพังผืดที่ได้รับการยอมรับว่ามีประสิทธิผลมากเพียงพอสำหรับใช้ในผู้ป่วย วิทยานิพนธ์ฉบับนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะค้นหายาที่มีประสิทธิผลสำหรับรักษาพังผืดที่ตับ รวมถึงการพัฒนาแบบจำลองโรคใหม่โดยใช้เทคนิคการศึกษาเนื้อเยื่อภายนอกร่างกาย

การค้นหายาสำหรับรักษาการเกิดพังผืดที่ตับ

บทที่ A1 เป็นการศึกษาประสิทธิผลของ galunisertib ซึ่งเป็นยาที่ออกฤทธิ์ด้านการทำงานของ TGF- β อันเป็นไซโตไคน์สำคัญที่ก่อให้เกิดการสร้างพังผืด การศึกษานี้ทำโดยเหนี่ยวนำเนื้อเยื่อตับให้เกิดพังผืดภายนอกร่างกาย ผลการศึกษาพบว่า galunisertib สามารถลดการเกิดพังผืดได้ทั้งในเนื้อเยื่อตับของมนุษย์และหนู โดยมีกลไกการออกฤทธิ์หลักเกี่ยวข้องกับการยับยั้งโปรตีน SMAD2 ซึ่งทำหน้าที่ควบคุมกระบวนการสร้างยีนและโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของ TGF- β นอกจากนี้ galunisertib ยังทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสมดุลของสารภายนอกเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งส่งเสริมฤทธิ์ด้านการเกิดพังผืดอีกด้วย ดังนั้น galunisertib จึงเป็นยาที่มีศักยภาพในการพัฒนาเพื่อใช้รักษาพังผืดที่ตับต่อไป

บทที่ A2 เป็นการศึกษาฤทธิ์ด้านการเกิดพังผืดของ LY2109761 ซึ่งเป็นยาที่ออกฤทธิ์ด้านการทำงานของ TGF- β เช่นกัน ผลการศึกษาพบว่ายานี้มีฤทธิ์ด้านการเกิดพังผืดใน LX-2 ซึ่งเป็นเซลล์ไลน์ของเซลล์เลทเซลล์ที่มีหน้าที่สร้างพังผืดในตับ รวมทั้งยายังมีฤทธิ์ด้านการเกิดพังผืดในเนื้อเยื่อตับของมนุษย์และหนูอีกด้วย นอกจากนี้ฤทธิ์ด้านการเกิดพังผืดทั้งในเซลล์ไลน์และในเนื้อเยื่อยังสัมพันธ์กับการยับยั้งการทำงานของโปรตีน SMAD1 และการยับยั้งการแสดงออกของยีน ID1 โดยทั้งโปรตีน SMAD1 และยีน ID1 นี้เป็นองค์ประกอบของการส่งสัญญาณในเซลล์ที่เกิดจากไซโตไคน์ในกลุ่ม BMPs ซึ่งมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการสร้างกระดูกและเนื้อเยื่อ การศึกษานี้ยังพบอีกว่าฤทธิ์ต่อ SMAD1 และ ID1 ของ LY2109761 แตกต่างอย่างสิ้นเชิงกับ galunisertib ดังนั้นจึงเห็นได้ชัดว่าถึงแม้ยาทั้งสองตัวจะมีกลไกหลักในการยับยั้งการทำงานของ TGF- β เหมือนกัน แต่สามารถออกฤทธิ์ต่อการทำงานของไซโตไคน์อื่นๆ ได้แตกต่างกัน ยิ่งไปกว่านั้น ผลการศึกษานี้ยังชี้ให้เห็นว่าการยับยั้งการทำงานของโปรตีน SMAD1 และยีน ID1 อาจเป็นเป้าหมายที่ควรศึกษาเพิ่มเติมสำหรับรักษาพังผืดที่ตับอีกด้วย

บทที่ A3 เป็นการเปรียบเทียบฤทธิ์ด้านการเกิดพังผืดของยาหลายชนิดที่ออกฤทธิ์รบกวนการทำงานของ TGF- β และยาที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ PDGF ซึ่งเป็นโกรทแฟคเตอร์ที่สร้างจากเกล็ดเลือด และมีบทบาทสำคัญในการเกิดพังผืดเช่นกัน ผลการศึกษาในเนื้อเยื่อตับของมนุษย์พบว่ายาที่ออกฤทธิ์รบกวนการทำงานของ TGF- β มีแนวโน้มจะมีประสิทธิผลมากกว่ายาที่ออกฤทธิ์ยับยั้ง PDGF การศึกษานี้ยังพบอีกว่า SB203580 ซึ่งเป็นยาที่ออกฤทธิ์ยับยั้งโปรตีน p38-MAPK มีฤทธิ์ด้านการเกิดพังผืด ดังนั้น p38-MAPK จึงน่าจะเป็นโปรตีนที่มีบทบาทสำคัญในการเกิดพังผืดที่ตับเช่นเดียวกัน

นอกจาก TGF- β แล้ว บทที่ A4 ได้อธิบายให้เห็นว่าการสะสมของสารอนุมูลอิสระที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบเป็นอีกหนึ่งกระบวนการสำคัญที่ส่งผลเสียต่อการทำงานทางของเซลล์ชนิดต่างๆ ของตัวตั้งต้นจึงมีการพัฒนายาที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างสารอนุมูลอิสระเหล่านี้ขึ้น ได้แก่ ยาที่ยับยั้งการทำงานของไมโทคอนเดรีย ยาที่ยับยั้งความผิดปกติของเอนโดพลาสมิกเรติคูลัม ยาที่ยับยั้งเอนไซม์ NADPH ออกซิเดส และยาที่ยับยั้งตัวรับชนิด Toll-like อย่างไรก็ตาม ยาทั้งหมดยังอยู่ในขั้นตอนการพัฒนายาที่ออกสู่ตลาดเท่านั้น อีกหนึ่งประเด็นที่ต้องให้ความสำคัญในการยับยั้งการสะสมของสารอนุมูลอิสระเหล่านี้ ได้แก่ การพัฒนายาที่มีความเฉพาะเจาะจงต่อเนื้อเยื่อพังผืดที่ตับ โดยที่ยานั้นควรส่งผลกระทบต่อการทำงานของอนุมูลอิสระที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการทางสรีรวิทยาน้อยที่สุด

การพัฒนาแบบจำลองโรคใหม่

การพัฒนาแบบจำลองภาวะไขมันสะสมในตับซึ่งไม่ได้มีสาเหตุมาจากแอลกอฮอล์ได้แสดงไว้ในบทที่ B1 โดยพบว่าการสะสมไขมันในเนื้อเยื่อตับของหนูสามารถเห็นย่นกว่าได้ด้วยการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ถูกดัดแปลงให้คล้ายคลึงกับพยาธิสรีรวิทยาการเกิดโรคของผู้ป่วย ผลการศึกษายังพบว่าการสะสมไขมันในเนื้อเยื่อตับสัมพันธ์กับการลดการแสดงออกของยีนที่สร้าง Cpt1 ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่จำเป็นสำหรับการขนส่งไขมันผ่านเยื่อหุ้มไมโทคอนเดรีย ดังนั้นการยับยั้งการขนส่งไขมันเข้าสู่กระบวนการเมแทบอลิซึมในไมโทคอนเดรียจึงน่าจะเป็นกระบวนการหลักที่ทำให้เกิดการสะสมไขมันในเนื้อเยื่อตับของแบบจำลองนี้สำหรับในอนาคต แบบจำลองภาวะไขมันพอกตับซึ่งไม่ได้มีสาเหตุมาจากแอลกอฮอล์นี้จะเป็เครื่องมือที่มีประสิทธิภาพในการศึกษาสภาวะอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ โรคไขมันพอกตับที่มีภาวะการอักเสบร่วมด้วยรวมทั้งการใช้แบบจำลองนี้เพื่อศึกษาฤทธิ์ของยาด้านภาวะการเกิดไขมันสะสมในตับ นอกจากนี้วิธีการเห็นย่นทำให้เกิดการสะสมไขมันในตับหนูนี้น่าจะสามารถนำไปปรับใช้ได้กับเนื้อเยื่อตับของมนุษย์อีกด้วย

บทที่ B2 เป็นการพัฒนาแบบจำลองโรคเพื่อศึกษาการเกิดพังผืดในไต ซึ่งทำโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไตของมนุษย์ ผลการศึกษาพบว่ายีนและโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดพังผืดในไตมีการแสดงออกที่มากขึ้นสัมพันธ์กับระยะเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง แสดงให้เห็นว่าการเกิดพังผืดสามารถเห็นย่นกว่าได้ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไตนอกอวัยวะมนุษย์ ดังนั้นแบบจำลองโรคที่เตรียมจากเนื้อเยื่อไตของมนุษย์นี้จะเป็เครื่องมือที่เป็นประโยชน์สำหรับศึกษาสถานการณ์การเกิดพังผืดที่ไตต่อไป

ข้อสรุป

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ช่วยเพิ่มพูนความเข้าใจในกระบวนการเกิดพังผืดของตับ รวมทั้งยังแสดงให้เห็นถึงประสิทธิผลของยาด้านการเกิดพังผืดที่ตับอีกด้วย โดยพบว่า galunisertib เป็นยาที่มีศักยภาพมากที่สุดสำหรับการรักษาเพื่อทดสอบประสิทธิผลสำหรับการรักษาพังผืดที่ตับในผู้ป่วยต่อไป นอกจากนี้โปรตีนอื่นๆ ที่ส่งเสริมให้เกิดการสร้างพังผืด ได้แก่ BMPs, PDGF, p38-MAPK รวมทั้งความผิดปกติจากการสะสมของสารอนุมูลอิสระที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบ น่าจะเป็นเป้าหมายที่เป็นประโยชน์สำหรับการรักษาการเกิดพังผืดเช่นกัน วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ยังแสดงให้เห็นถึงความสำเร็จของการใช้เทคนิคการทดสอบเนื้อเยื่อภายนอกของร่างกายเพื่อใช้เป็นแบบจำลองโรค ได้แก่ ภาวะไขมันสะสมในตับซึ่งไม่ได้มีสาเหตุมาจากแอลกอฮอล์และการเกิดพังผืดของไต แบบจำลองโรคใหม่ทั้งสองนี้จะเป็เครื่องมือที่ช่วยสนับสนุนการวิจัยในโรคเหล่านี้ รวมทั้งการพัฒนายาด้านการเกิดพังผืดต่อไป