

Schlußbericht (Stand : 31.01.1998)

Die Nutzung hepatischer Funktionen

für *in vitro* Verfahren zur Prüfung von Stoffen

mit dem Ziel der Einsparung von Tierversuchen, Teilprojekt 3

Ausführende Stelle (Systementwickler) : Pharmazeutisches Institut der
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
(Leitung : Prof. Dr. B. Clement)

Systemnutzer (Industriepartner) : Arzneimittelwerk Dresden
(Leitung : Dr. T. Kronbach)

1 AUFGABENSTELLUNG

1.1 EINLEITUNG

Xenobiotika wie Arzneistoffe und Umweltchemikalien unterliegen enzymatischen Umwandlungen, die vornehmlich in der Leber ablaufen. Solche als Fremdstoffmetabolismus oder Biotransformation bezeichneten Veränderungen der Struktur der Xenobiotika können zu einer Inaktivierung oder Entgiftung, aber auch zu pharmakologisch aktiven Metaboliten führen. In einigen Fällen werden durch Biotransformation aus harmlosen Verbindungen toxische Metaboliten gebildet [1].

Es besteht somit ein sehr großes Interesse an der Aufklärung von Biotransformationsprozessen. Metabolismusstudien sollten deshalb bereits im Zuge der Stoffentwicklung eingesetzt werden. Dadurch können schon zu einem sehr frühen Zeitpunkt Aussagen über die Metabolisierung, Inaktivierung und eventuell vorliegende Toxizität eines neuentwickelten Stoffes gemacht werden.

Durch frühzeitige *In vitro*-Versuche könnte eine große Anzahl an Tierversuchen eingespart werden. Ziel des Projektes war die Erarbeitung, Weiterentwicklung und Standardisierung solcher *In vitro*-Systeme. Die Ergebnisse der Studien können richtungsweisend für die präklinische Entwicklung neuer Wirkstoffe sein und von allen forschenden Industrieunternehmen verwertet werden.

1.2 AUSGEWÄHLTE *IN VITRO*-SYSTEME

1.2.1 Frisch isolierte Rattenhepatozyten

Es sollten Rattenhepatozyten isoliert, anschließend kultiviert und charakterisiert werden. Zur Charakterisierung sollte die Vitalität und metabolische Kompetenz der Hepatozyten unmittelbar nach der Isolierung und im Verlauf der Kultur überprüft werden.

Die Vitalität sollte anhand der LDH-Freisetzung und der Albuminproduktion bestimmt werden. Die metabolische Kompetenz sollte anhand der Ethoxycumarin-O-deethylierung, Ethoxyresorufin-O-deethylierung und Testosteronhydroxylierung bestimmt werden.

1.2.2 Humane Hepatozyten

Es sollten Humanhepatozyten isoliert, anschließend kultiviert und anhand der gleichen Parameter wie bei den Rattenhepatozyten charakterisiert werden.

1.2.3 Umsetzungen mit gereinigten fremdstoffmetabolisierenden Enzymen in rekonstituierten Systemen

Abschließender Bericht bereits im Zwischenbericht 1997.

2 VORAUSSETZUNGEN

Bis zu Beginn des Projektes wurden von den oben erwähnten *in vitro*-Systemen nur frisch isolierte Rattenhepatozyten im Arbeitskreis verwendet. Diese wurden mit einem rezirkulierendem System gewonnen, so daß die Methode zunächst weiterentwickelt werden mußte. Die Isolierung von Humanhepatozyten und die Kultivierung und Charakterisierung von Hepatozytenkulturen mußte dagegen vollkommen neu aufgebaut werden. Sämtliche Systeme mußten standardisiert und etabliert werden.

3 PLANUNG UND ABLAUF

Es sollte mit der Isolierung, Kultivierung und Charakterisierung von Rattenhepatozyten begonnen werden.

Zuerst sollte die Ausbeute und Vitalität der gewonnenen Rattenhepatozyten gesteigert werden (vergleichbar mit Literaturangaben). Anschließend sollten die Methoden der Kultivierung und Charakterisierung an den Rattenhepatozyten erarbeitet und etabliert werden.

Nachdem die Methoden ausreichend etabliert waren, sollten sie auf Humanhepatozyten übertragen werden. Während die Kultivierung und Charakterisierung von Rattenhepatozyten sich in ihren Methoden von denen bei Humanhepatozyten kaum unterscheiden, gibt es bei der Isolierung jedoch sehr große Unterschiede, so daß speziell dieser Punkt intensiv erarbeitet werden mußte. Da der Zugang zu Humanleber sehr begrenzt ist, wurde als Übungsmodell Schweineleber verwendet.

Nach erfolgreicher Isolierung von Humanhepatozyten sollten diese ebenfalls kultiviert und charakterisiert werden.

In diesem Projekt sollten keine Prüfsubstanzen einbezogen werden, sondern die angesprochenen Methoden standardisiert und - soweit erforderlich - weiterentwickelt werden. Es sollten Standardprotokolle zur reproduktiven Nutzung des Systems erstellt werden.

4 WISSENSCHAFTLICHER UND TECHNISCHER STAND, LITERATURANGABEN

Ziel von Biotransformationsstudien ist die Aufklärung von Metabolisierungswegen von Xenobiotika. Prinzipiell können die Studien *in vivo* oder *in vitro* durchgeführt werden. Es gibt verschiedene Systeme mit unterschiedlicher Aussagekraft, in denen Experimente durchgeführt werden können. Diese sind das ganze Tier, die perfundierte Leber, Leberdünnschnitte („liver slices“), isolierte Hepatozyten, Leberhomogenate und seine Fraktionen sowie gereinigte Enzyme [2]. Untersuchungen am intakten Organismus erfolgen durch Analyse von leicht zugänglichen Medien, wie Blut, Plasma oder Urin, seltener Liquor oder Gewebeproben. Das Substrat und alle Metaboliten unterliegen somit allen pharmakokinetischen Parametern, bevor sie nachgewiesen werden [3]. Neben der ethischen Problematik ergeben sich bei diesen *in vivo* Studien Schwierigkeiten beim Nachweis instabiler oder reaktiver Metaboliten, die für unerwünschte Wirkungen verantwortlich sind [3]. Ähnliche Probleme werden beim Arbeiten mit perfundierter Leber gesehen. Hierzu kommt der sehr große Aufwand dieser Methode.

Isolierte Hepatozyten haben den Vorteil, mit wenigen Tieren Kenntnisse über toxische Vorgänge mit guter *in vivo* Übertragbarkeit zu liefern [4]. Das Biotransformationsmodell „isolierte Leberzellen“ schließt die Lücke zwischen Studien mit mikrosomalen Fraktionen und Studien am Ganztier. Zum Beispiel ist der Einfluß von Konkurrenzreaktionen oder Folgereaktionen im Gegensatz zu Homogenaten und gereinigten Enzymen noch gegeben. Rasche Änderungen ihres Enzymmusters waren bisher ein großer Nachteil von Hepatozyten. Durch Kultivierung der Hepatozyten läßt sich dieser Aktivitätsverlust über einen Zeitraum von mehreren Tagen bis Wochen aufhalten [5].

5 ZUSAMMENARBEIT MIT ANDEREN STELLEN

Die menschlichen Leberproben wurden unter Zusammenarbeit mit Prof. Dr. D. Henne-Bruns und Prof. Dr. B. Kremer von der Klinik für Allgemeine Chirurgie und Thoraxchirurgie der Universität Kiel erhalten. Nach Entnahme von Lebergewebe von Tumorpatienten wurde ein Teil des üblicherweise mitentfernten gesunden Gewebes zur Gewinnung von Hepatozyten zur Verfügung gestellt. Dabei wurde nur von dem zur pathologischen Untersuchung weitergegebenen Gewebe - das Einverständnis der Patienten vorausgesetzt - ein Teil für unsere Untersuchungen verwendet.

Bei der Erarbeitung einzelner Methoden wurde auf Erfahrungen der Arbeitsgruppe um Dr. Bader zurückgegriffen. Während eines zweitägigen Besuches in Hannover konnte die Isolierung und Kultivierung von Schweinehepatozyten besichtigt werden.

6 ERGEBNISSE

6.1 ISOLIERUNG

6.1.1 ISOLIERUNG VON RATTENHEPATOZYTEN

In der Literatur werden Ausbeuten von 200-300 Millionen Zellen pro Isolation mit einer Vitalität von 85 bis 98% angegeben [6].

Die Ergebnisse des rezirkulierenden Verfahrens liegen weit unter diesen Werten sowohl bezüglich Ausbeute als auch der Vitalität (siehe Tab. 1).

Tab.1: Ausbeute und Vitalität von Rattenhepatozyten nach rezirkulierendem Verfahren

	Gewicht der Ratte	Ausbeute (x 10 ⁶ Zellen)	Vitalität
Ratte 1	247g	63	30%
Ratte 2	251g	39	40%
Ratte 3	249g	58	66%
Ratte 4	249g	62	42%
Ratte 5	255g	62	48%

Die im nicht-rezirkulierendem Verfahren erhaltenen Ausbeuten und Vitalitäten sind dagegen mit den in der Literatur angegebenen Werten vergleichbar (siehe Tab. 2).

Tab.2: Ausbeute und Vitalität von Rattenhepatozyten nach nicht-rezirkulierendem Verfahren

	Gewicht der Ratte	Ausbeute (x 10 ⁶ Zellen)	Vitalität
Ratte 1	228g	288	84%
Ratte 2	170g	94	84%
Ratte 3	203g	286	82%
Ratte 4	381g	360	83%
Ratte 5	194g	230	92%
Ratte 6	183g	195	86%
Ratte 7	212g	293	90%
Ratte 8	195g	205	85%

6.1.2 ISOLIERUNG VON HUMANHEPATOZYTEN

Da der Zugang zu menschlichem Lebergewebe sehr begrenzt ist, und die Isolierung von Humanhepatozyten sich stark von der Isolierung von Rattenhepatozyten unterscheidet, wurde diese Methode an Schweineleber geübt.

Trotz des größeren Gewichts der Leberstücke im Vergleich zur Rattenleber (10-14g) wurden nur geringere Ausbeuten erhalten (siehe Tab. 3).

Tab.3: Ausbeute und Vitalität von Schweinehepatozyten

Gewicht der Leberstücke	Ausbeute (x 10 ⁶ Zellen)	Vitalität
45g	153	82%
50g	174	83%

Während des Projektzeitraumes konnten aus einer Humanleber Hepatozyten isoliert werden (siehe Tab. 4)

Tab.4: Ausbeute und Vitalität von Humanhepatozyten

Gewicht des Leberstücks	Ausbeute (x 10 ⁶ Zellen)	Vitalität
70g	82	70%

6.2 KULTIVIERUNG

Die isolierten Ratten- und Humanhepatozyten ließen sich sehr gut kultivieren und über einen Zeitraum von 8-10 Tagen in Kultur halten. Beide Hepatozytenarten zeigten während der Kultivierung ein ähnliches Verhalten.

Schwenkte man die Petrischale unmittelbar nach dem Ausplattieren leicht hin und her, so konnte man unter dem Umkehrmikroskop beobachten, wie die Hepatozyten im Medium frei umherschwammen. Innerhalb kurzer Zeit nach dem Ausplattieren hefteten sich die Hepatozyten an das Collagengel, so daß nur noch wenige Hepatozyten frei im Medium umherschwammen. Bei diesen Zellen handelte es sich überwiegend um tote Hepatozyten, die durch den nach einer Stunde durchgeführten Mediumwechsel entfernt wurden. Innerhalb der ersten Tage in Kultur bildeten die Hepatozyten einen Monolayer aus (siehe Abb. 1-3).

Es zeigte sich, daß Humanhepatozyten wesentlich stärker adherieren als Rattenhepatozyten. Dies bereitet zwar bei der Isolierung Schwierigkeiten (Einstellen auf bestimmte Zellzahl), scheint aber ein längeres Überleben in Kultur zu bewirken.

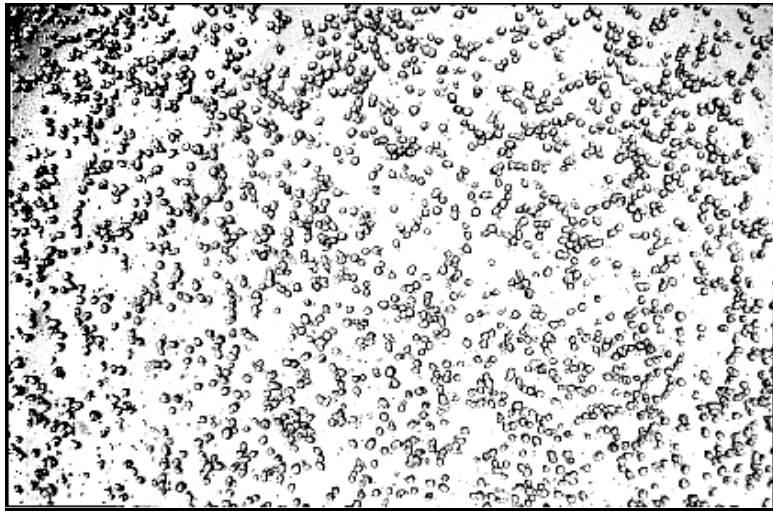


Abb.1: Rattenhepatozyten 1h in Kultur

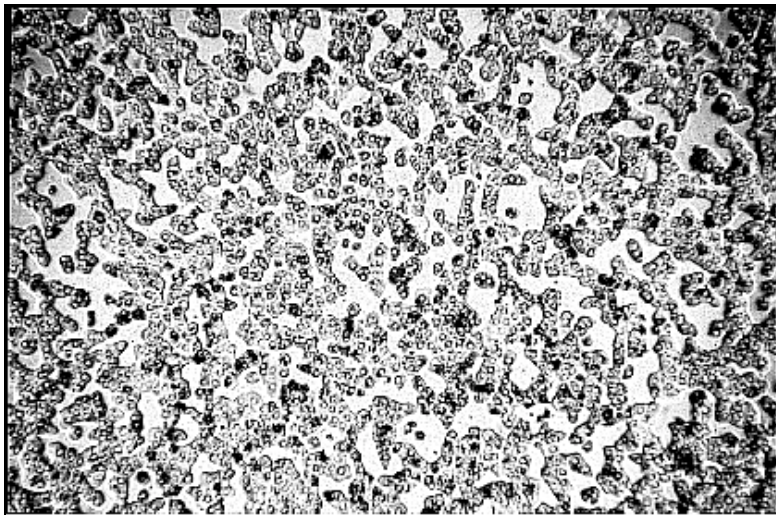


Abb.2: Rattenhepatozyten 24h in Kultur

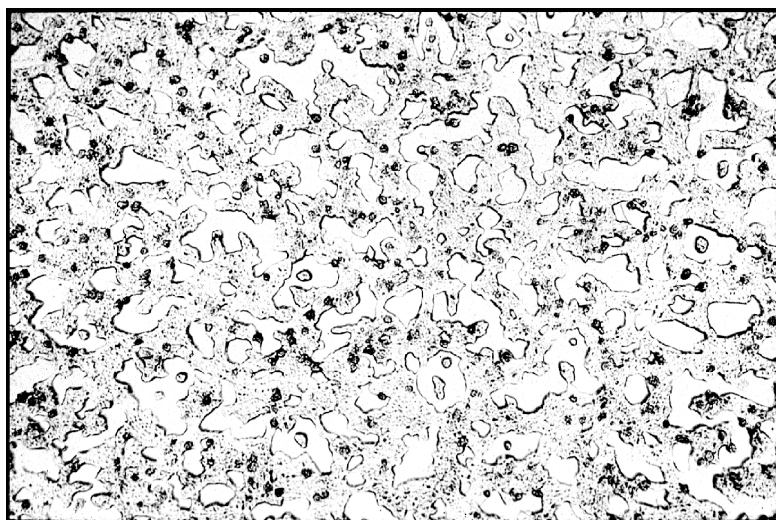


Abb.3: Rattenhepatozyten 48h in Kultur

6.3 CHARAKTERISIERUNG

6.3.1 Vitalität

6.3.1.1 Lactatdehydrogenase-Freisetzung

Die Menge der aus dem Cytosol der Zellen freigesetzten Lactatdehydrogenase (LDH) ist ein Maß für die Schädigung der Zellen. Je mehr LDH von den Zellen freigesetzt wird, desto stärker sind sie geschädigt und desto höher liegt die Absorption des in der Meßreaktion gebildeten Farbsalzes.

Die Bestimmung der Lactatdehydrogenase-Freisetzung wurde an mehreren Rattenhepatozytenkulturen und einer Humanhepatozytenkultur durchgeführt. Die Kurvenverläufe sind in Abb. 4 und Abb. 5 dargestellt.

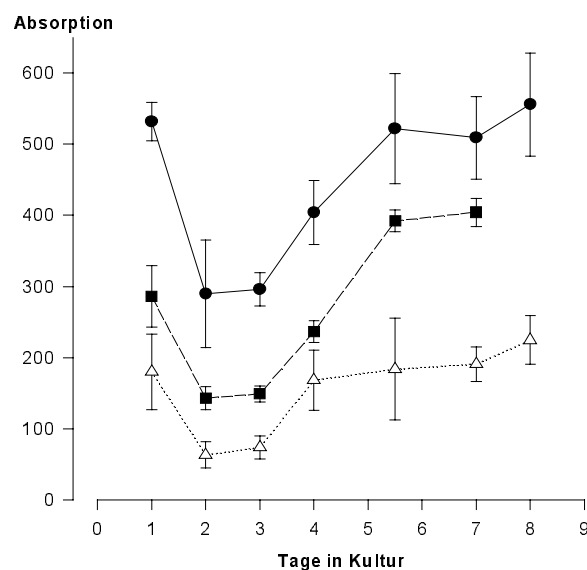


Abb.4: LDH-Freisetzung aus drei Rattenhepatozytenkulturen.

Jeder Punkt ist Mittelwert aus drei verschiedenen Zellkulturschalen \pm SD

Der Kurvenverlauf ist in allen Kulturen ähnlich. Nach einem Abfall der Absorption zwischen Tag 1 und 3 kommt es zwischen Tag 3 und 8 zu einer Zunahme der Absorption meist über den Wert von Tag 1. 24 Stunden nach der Isolierung wurden recht hohe LDH-Werte gemessen, die eine starke Zellschädigung annehmen lassen. Durch Reparaturprozesse innerhalb der ersten Tage erholen sich die Zellen aber

von der Isolierung und weisen meist an Tag 2 bis 3 die geringsten LDH-Spiegel und damit die geringste Zellschädigung auf.

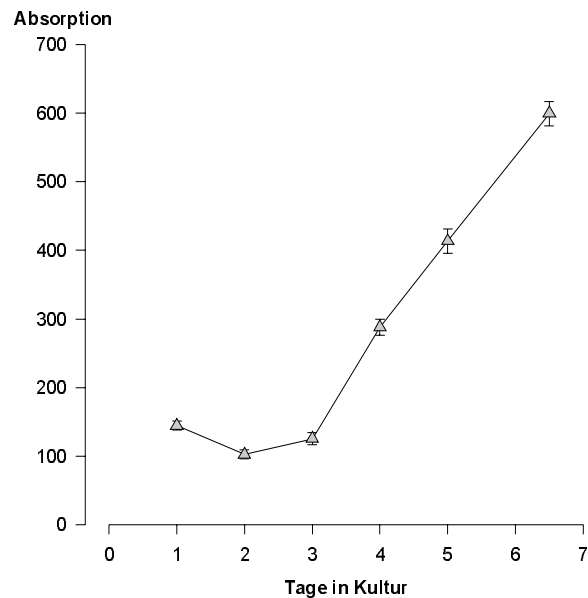


Abb.5: LDH-Freisetzung aus einer Humanhepatozytenkultur.

Jeder Punkt ist Mittelwert aus zwei verschiedenen Zellkulturschalen \pm SD

Die LDH-Freisetzung aus Humanhepatozyten zeigt einen ähnlichen Kurvenlauf wie die LDH-Freisetzungen aus Rattenhepatozyten, wobei die 24h nach der Isolierung gemessenen LDH-Werte geringer ausfallen. Von Tag 1 auf Tag 2 kommt es zu einer Verringerung der LDH-Freisetzung, ab Tag 2 nehmen die LDH-Spiegel kontinuierlich zu.

6.3.1.2 Albuminproduktion

Die Ergebnisse der Albuminproduktion von Rattenhepatozytenkulturen sind in Abbildung 6 dargestellt.

Während der ersten Tage in Kultur nimmt die Albuminsynthese zu und erreicht ein Maximum am dritten Tag. Nach dem dritten Tag nimmt die Albuminsynthese innerhalb der nächsten Tage kontinuierlich ab.

Die Albuminsynthese als zweiter Marker der Vitalität lieferte somit identische Ergebnisse wie die LDH-Messungen.

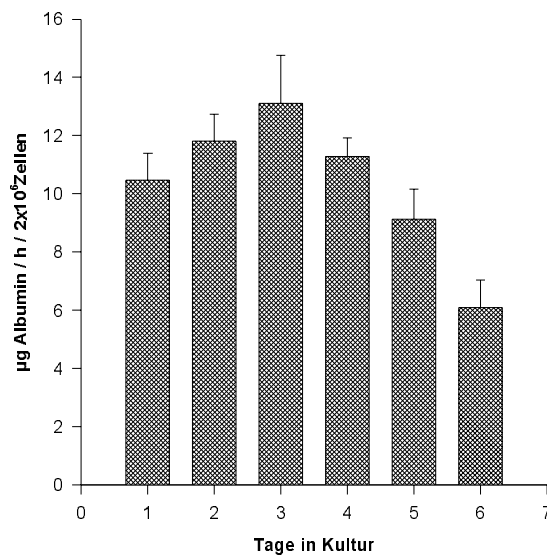


Abb.6 : Albuminproduktion einer Rattenhepatozytenkultur.

Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Zellkulturschalen \pm SD

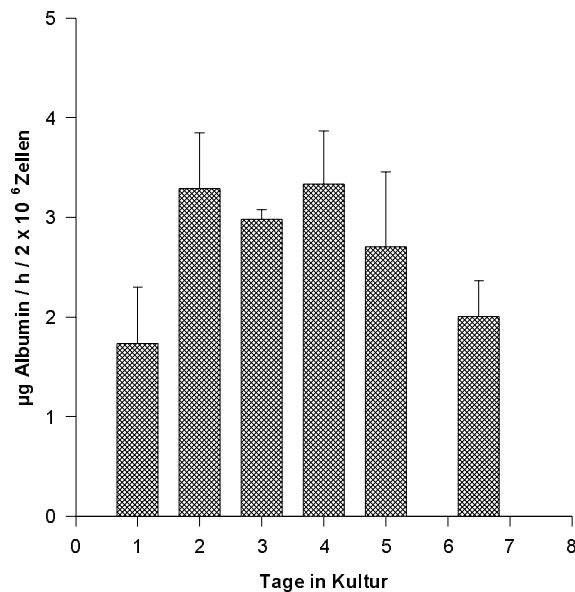


Abb.7 : Albuminproduktion einer Humanhepatozytenkultur.

Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Zellkulturschalen \pm SD

In Abbildung 7 sind die Ergebnisse der Albuminproduktion einer Humanhepatozytenkultur dargestellt.

Nach einem Anstieg von Tag 1 auf Tag 2, kommt es nach Tag 4 zu einem Absinken der produzierten Albuminmenge.

Während bei der LDH-Freisetzung der Humanhepatozytenkultur bereits nach Tag 3 die LDH-Werte und somit die Zellschädigung zunehmen, zeigt die Albuminproduktion diesen Verlauf (sinkende Albuminwerte) erst nach Tag 4.

Im Vergleich zur Albuminproduktion bei Rattenhepatozyten sind die gemessenen Albuminwerte bei der Humanhepatozytenkultur wesentlich geringer. Dies lässt sich auf die geringere Ausbeute und die geringere Vitalität der isolierten Hepatozyten zurückführen.

6.3.2 Metabolische Kompetenz

6.3.2.1 Ethoxycumarin-O-deethylierung

Die Aktivität der 7-Ethoxycumarin-O-deethylase wurde an mehreren Rattenhepatozytenkulturen und einer Humanhepatozytenkultur untersucht. Beispielhaft sind in Abbildung 8 die erhaltenen Werte einer Rattenhepatozytenkultur dargestellt. Die anderen Rattenhepatozytenkulturen zeigten einen vergleichbaren Kurvenverlauf.

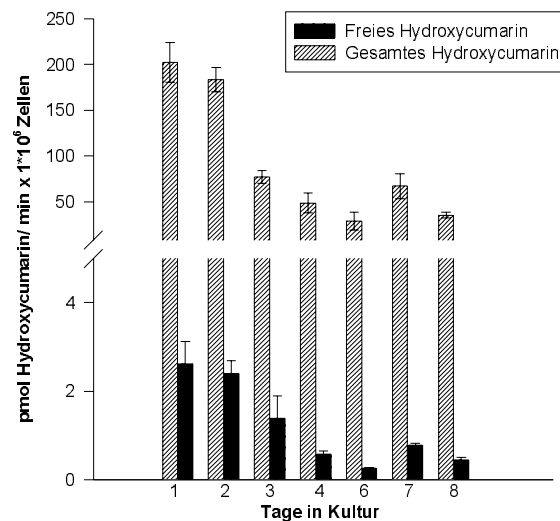


Abb.8: Ethoxycumarin-O-deethylierung einer Rattenhepatozytenkultur.

Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Zellkulturschalen \pm SD

Nur ein sehr kleiner Teil des gebildeten Hydroxycumarins lag frei vor, der größte Teil wurde in Phase-2-Reaktionen an Glucuronid und Sulfat gekoppelt.

Innerhalb der ersten vier Tage sank die Aktivität auf 25% bezogen auf Tag 1 der Kultur.

In Abbildung 9 ist die Ethoxycumarin-O-deethylierung der untersuchten Humanhepatozytenkultur dargestellt. Eine Kopplung an Glucuronid und Sulfat konnte in den ersten Tagen der Kultur nicht festgestellt werden. Erst ab Tag 3 der Kultivierung wurden Phase 2-Reaktionen nachgewiesen. Aufgrund der geringeren Ausbeute der Humanhepatozyten wurden nicht 2×10^6 Zellen pro Zellkulturschale

ausgesät, sondern nur etwa 250×10^5 Zellen. Dadurch wurde das Ausbilden eines Monolayers erschwert, und der Kontakt zwischen den einzelnen Hepatozyten war wesentlich geringer. Diese Tatsache mag das Ergebnis der Phase 2-Reaktionen nachteilig beeinflusst haben.

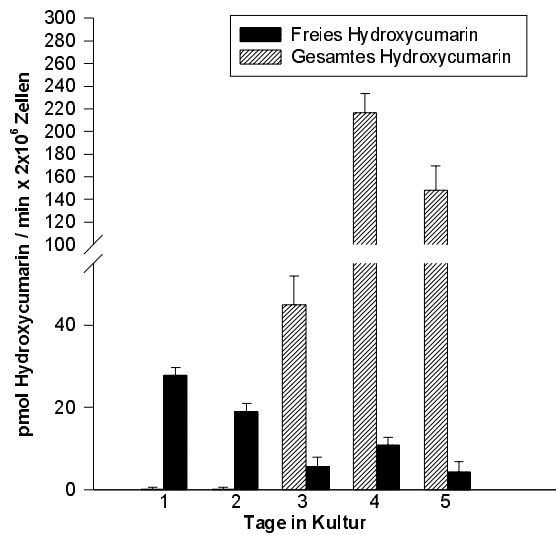


Abb.9: Ethoxycoumarin-O-deethylierung einer Humanhepatozytenkultur.

Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei Zellkulturschalen \pm SD

6.3.2.2 Ethoxyresorufin-O-deethylierung

Die Aktivität der 7-Ethoxyresorufin-O-deethylase wurde an mehreren Rattenhepatozytenkulturen und einer Humanhepatozytenkultur untersucht. Beispielhaft sind in Abbildung 10 die erhaltenen Werte einer Rattenhepatozytenkultur dargestellt. Die anderen Rattenhepatozytenkulturen zeigten einen vergleichbaren Kurvenverlauf.

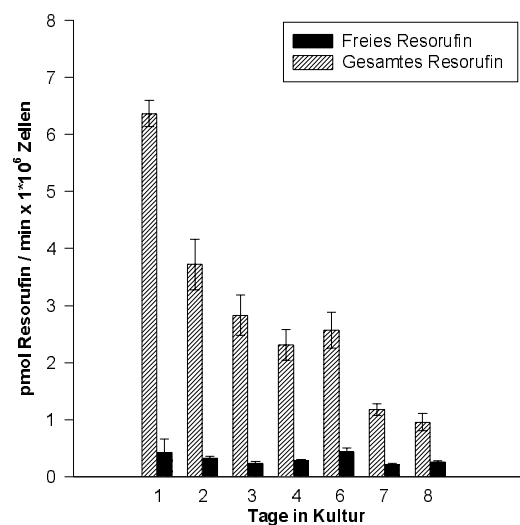


Abb.10: Ethoxyresorufin-O-deethylierung einer Rattenhepatozytenkultur.

Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Zellkulturschalen \pm SD

Wie bei der Ethoxycumarin-O-deethylierung lag auch das gebildete Resorufin zum größten Teil als Glucuronid oder Sulfat vor. Die Umsatzrate von 7-Ethoxyresorufin ist insgesamt geringer als die von 7-Ethoxycumarin. Beide Kurven zeigen aber einen vergleichbaren Verlauf.

Innerhalb der ersten vier Tage sank die Aktivität auf 30% bezogen auf Tag 1 der Kultur.

In Abbildung 11 ist die Ethoxyresorufin-O-deethylierung der untersuchten Humanhepatozytenkultur dargestellt. Bis zum dritten Tag der Kultivierung nimmt die Aktivität der Ethoxyresorufin-O-deethylase zu, sinkt dann aber innerhalb der

nächsten Tage wieder. Im Gegensatz zum Ethoxycumarin konnten bereits ab Tag 1 Phase 2-Reaktionen gemessen werden.

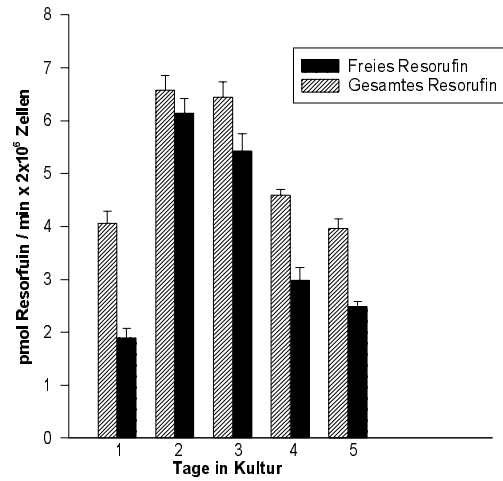


Abb.11: Ethoxyresorufin-O-deethylierung einer Humanhepatozytenkultur.

Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei Zellkulturschalen \pm SD

6.3.2.3 Testosteron-Hydroxylierung

Die Umsetzung von Testosteron zu 6 β -Hydroxytestosteron wurde an Rattenhepatozytenkulturen und Humanhepatozytenkulturen untersucht. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 13 und 14 dargestellt. Abbildung 12 zeigt typische HPLC-Chromatogramme.

In beiden Hepatozytenkulturen nahm die Aktivität von einem Maximum an Tag 1 innerhalb der nächsten Tage kontinuierlich ab.

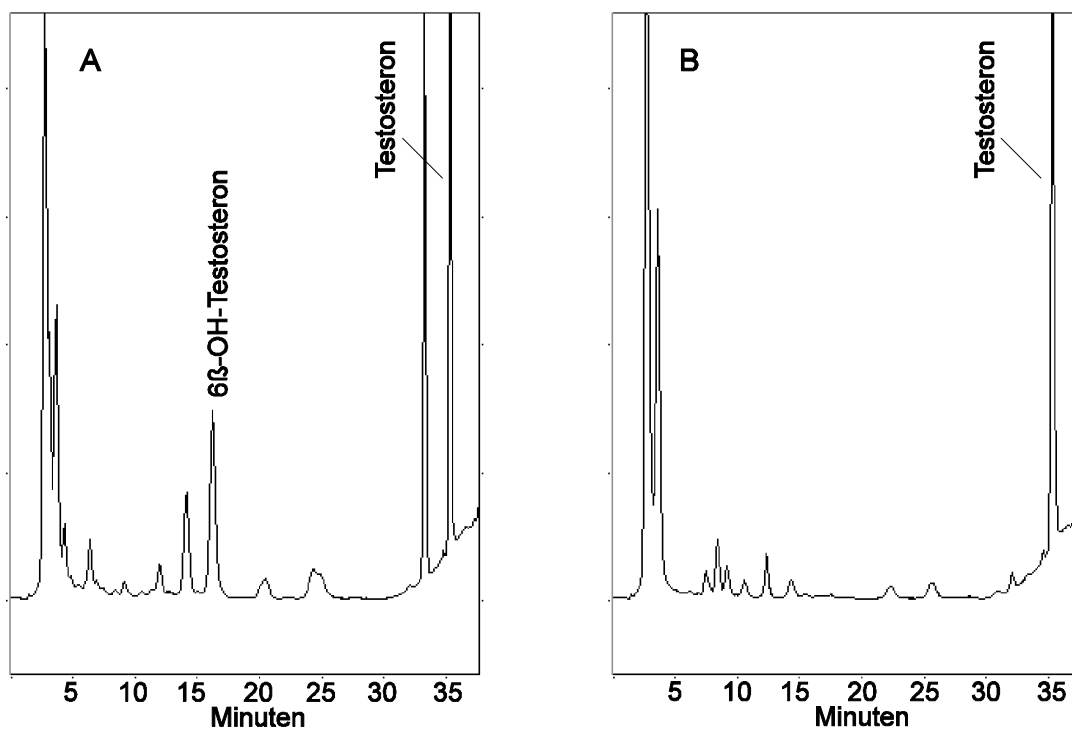


Abb.12: Repräsentatives HPLC-Chromatogramm nach Inkubation von Testosteron mit Hepatozytenkulturen (Humanhepatozyten). (A) mit Hepatocyten, (B) ohne Hepatocyten. .

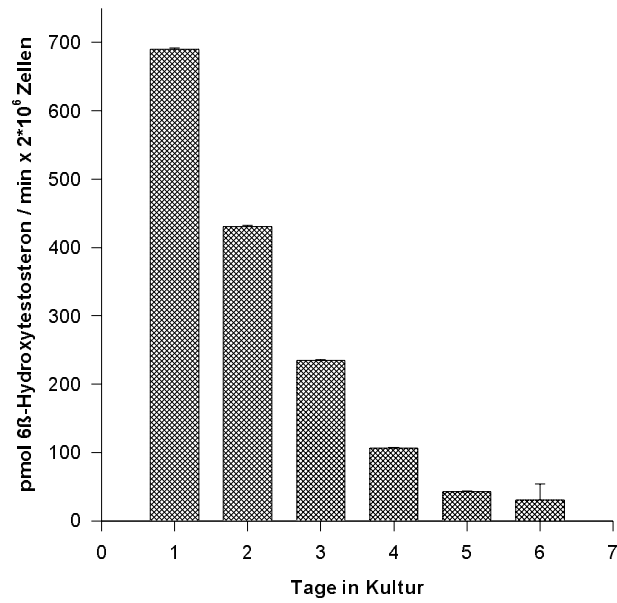


Abb 13: Testosteronhydroxylierung durch Rattenhepatozyten

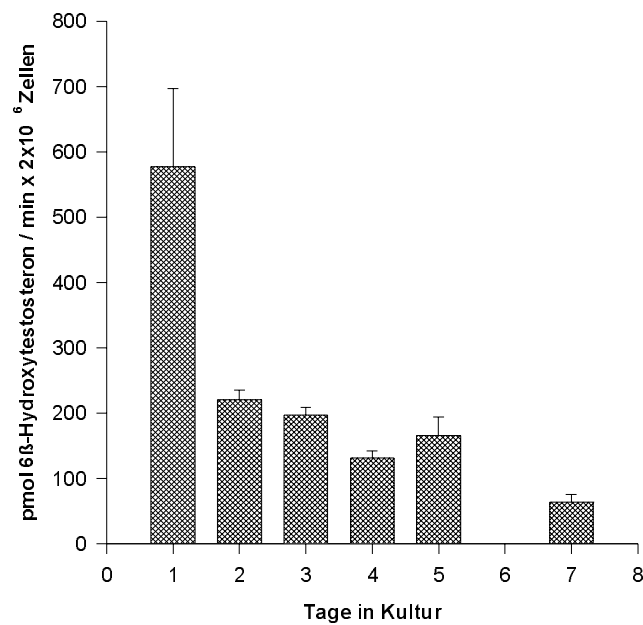


Abb 14: Testosteronhydroxylierung durch Humanhepatozyten

6.4 DISKUSSION UND ZUSAMMENFASSUNG

Innerhalb des Projektzeitraumes wurde die Isolierung von Rattenhepatozyten verbessert, humane Hepatozyten konnten erstmals isoliert werden.

Erst durch die Steigerung der Ausbeute und die Verbesserung der Vitalität der isolierten Rattenhepatozyten wurde eine anschließende Kultivierung möglich.

Das Rezirkulieren des kollagenasehaltigen Perfusionsmediums bei der Isolierung von Rattenhepatozyten, um die Kollagenasemenge aus Kostengründen gering zu halten, hat sich nicht bewährt, da nur geringe Zellausbeuten mit schlechter Vitalität erreicht wurden.

Erst durch den Einsatz größerer Mengen Kollagenase und dem einmaligen Durchspülen der Leber mit entsprechend mehr Perfusionsmedium wurden wesentlich höhere Ausbeuten und bessere Vitalitäten erzielt. Die bei der Isolierung erhaltenen Zellausbeuten und die Vitalität der Zellen sind mit Werten aus der aktuellen Literatur vergleichbar.

Bei der Isolierung von Humanhepatozyten ließ es sich nicht vermeiden, mit einem rezirkulierendem System zu arbeiten, da sonst eine viel zu große Menge Kollagenase pro Isolation benötigt werden würde.

Das Protokoll zur Isolierung von Humanhepatozyten ließ sich auch auf die Isolierung von Hepatozyten aus Schweineleber anwenden. Diese wurde in der Erprobungsphase als Übungsmodell für Humanleber verwendet.

Die Kultivierung von Hepatozyten aus Ratten- und Humanleber konnte innerhalb des Projektzeitraumes erstmals erfolgreich etabliert werden und wird inzwischen routinemäßig durchgeführt. Es gelingt bereits, zuvor isolierte Hepatozyten über einen Zeitraum von 8 bis 10 Tagen in Kultur zu halten. Erst durch die Kultivierung wurde es möglich, Hepatozyten über einen längeren Zeitraum zu untersuchen und Veränderungen in der Vitalität und metabolischen Kompetenz zu bestimmen.

Das hier vorgestellte System zur Kultivierung eignet sich dabei für Ratten- und Humanhepatozyten. Die aus Schweineleber isolierten Hepatozyten ließen sich ebenfalls über einen Zeitraum von 8-10 Tagen in Kultur halten.

Alle fünf Untersuchungsmethoden zur Charakterisierung von Hepatozytenkulturen konnten erfolgreich etabliert werden. Mit ihnen lassen sich sowohl Rattenhepatozyten als auch Humanhepatozyten in Kultur sehr gut charakterisieren.

LDH-Freisetzung und Albuminproduktion als Marker der Vitalität lieferten vergleichbare Ergebnisse. Durch den Isolierungsprozeß kommt es zu einer reversiblen Schädigung der Hepatozyten, so daß zu Beginn der Kultur hohe LDH-Spiegel bzw. geringe Albuminmengen gemessen werden. Innerhalb der ersten drei Tage scheinen sich die Zellen von der Isolierung zu erholen, es finden Reparaturprozesse statt, die LDH-Freisetzung verringert sich, während die Albuminproduktion zunimmt. Innerhalb der nächsten Tage nimmt die Vitalität dann wieder ab und geht nach 8 bis 10 Tagen gegen Null.

Die metabolische Kompetenz von Ratten- und Humanhepatozyten wurde über drei verschiedene Markerreaktionen bestimmt.

Durch die Ethoxycumarin-O-deethylierung wurde die Aktivität des P450-Isoenzym 2A6 bestimmt. Von einem Maximum an Tag 1 nahm die Umsetzung innerhalb der nächsten Tage kontinuierlich ab.

Einen ähnlichen Verlauf zeigte die Umsetzung von Ethoxyresorufin zu Resorufin, eine Markerreaktion für das P450-Isoenzym 1A2.

Kultivierte Rattenhepatozyten zeigten eine ausgesprochen große Fähigkeit, die beiden Metabolite 7-Hydroxycumarin und Resorufin mit aktivierter Glucose und aktiviertem Sulfat zu koppeln. Die isolierten und kultivierten Humanhepatozyten zeigten dagegen eine geringere Phase 2-Kopplung. Dies mag darauf zurückzuführen sein, daß aufgrund der geringen Isolationsausbeute hier eine geringere Anzahl an Hepatozyten pro Zellkulturschale ausplattiert wurde.

Als dritte Markereaktion wurde die Umwandlung von Testosteron zu 6 β -Hydroxytestosteron untersucht. Diese Hydroxylierung wird durch das P450-Isoenzym 3A4 katalysiert. Die Aktivität dieses Isoenzym nahm sowohl bei den kultivierten Ratten- als auch bei den kultivierten Humanhepatozyten von einem Maximum an Tag 1 innerhalb der Kultivierung kontinuierlich ab, wobei jedoch auch nach Tag 5 noch eine Umsetzung von Testosteron zu 6 β -Hydroxytestosteron und damit Enzymaktivität meßbar war.

Innerhalb des Projektzeitraumes konnten somit Rattenhepatozyten- und Humanhepatozytenkulturen etabliert werden. Die Hepatozytenkulturen lassen sich durch die fünf neu etablierten Untersuchungsmethoden sowohl hinsichtlich der Vitalität, als auch auf ihre metabolische Kompetenz hin untersuchen und sehr gut charakterisieren.

Dadurch ist es möglich, zukünftige Metabolismusstudien nicht mehr am ganzen Tier oder an kurz haltbaren Hepatozytensuspensionen sondern an Zellkultursystemen, die sich über mehrere Tage nutzen lassen, durchzuführen.

Die Fähigkeit von Hepatozyten zu Phase 2- Reaktionen ermöglicht darüberhinaus die Untersuchung von Phase 2-Metaboliten. Dies ist mit mikrosomalen Systemen, die bisher bevorzugt im Arbeitskreis eingesetzt wurden, nicht möglich.

7 NUTZEN

Das Ziel des Projektes, die oben dargestellten *in vitro*-Systeme zu standardisieren und zu einer größeren Verbreitung beizutragen, konnte somit erreicht werden.

Die Nutzungsmöglichkeit der entwickelten bzw. standardisierten Verfahren ist für alle forschenden Pharmaunternehmen gegeben, die im Bereich der präklinischen Entwicklung die Methoden einsetzen können und so zu einer Einsparung von Tierversuchen gelangen. Zulassungsbehörden erhalten eindeutige Hinweise auf akzeptable *in vitro* Versuche im Bereich der Biotransformation

LITERATUR

- [1] MUTSCHLER E, Arzneimittelwirkungen, 7.Aufl., S.30 ff., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 1996

- [2] FRY J, Metabolism of xenobiotics in isolated cells: comparison with other *in vitro* systems and *in vivo*. In: *Metabolism of Xenobiotics* (Hrsg. Gorrod JW, Oeschläger H and Caldwell J), S. 303-309, Taylor & Francis, London, New York, Philadelphia, 1988

- [3] FICHTL B, FÜLLGRAF G, NEUMANN H-G, WOLLENBERG P, FORTH W, HENSCHLER D und RUMMEL W, Allgemeine Pharmakologie und Toxikologie (Hrsg. Forth W, Henschler D, Rummel W und Starke K), 6.Aufl., S. 39ff., BI-Wissenschaftsverlag, Mannheim, Wien, Zürich, 1992

- [4] SUOLINNA E-M, Isolated liver cells and primary liver cell cultures in the biochemical study of drug metabolism. *Z. gesamte Hyg.* 32, 346-352, 1986

- [5] PAHERNIK S-A., SCHMID J, SAUTER T, SCHILDBERG F-W, KOEBE H-G, Metabolism of primobendan in long-term human hepatocyte culture: *in vivo-in vitro* comparison, *Xenobiotica* 25, 811-823, 1995

- [6] BADER A, REIMER P, KNOP E, BÖKER K, CHRISTIANS U, WEISSLEDER R, SEWING K-F, An organotypical *in vitro* model of the liver parenchyma for uptake studies of diagnostic MR receptor agents, *Magn. Reson. Imaging* 13, 991-1002, 1995