

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.