Die Bedeutung standardisierter Zellkulturverfahren für die Routine-Toxikologie der Pharmaindustrie

Gabriele Schmuck
Bayer AG, D-Wuppertal

Zusammenfassung
Die Etablierung und der Einsatz standardisierter Zellkulturen bilden die Grundlage für toxikologische Untersuchungen in vitro und ermöglichen einen Vergleich über Jahre hinweg. Die Basis hierfür bilden primäre Zellkulturen aus den zu untersuchenden Organen. Die Zellkulturen sollten, auch unter Langzeitkulturbedingungen, die Organeigenschaften behalten. Unterstützt werden diese Bestrebungen durch Neuentwicklungen auf dem Sektor der Zellkulturmedien, Supplemente und Oberflächenbeschichtungen der Zellkulturschalen.
Routinemäßig werden heute Zellen aus toxikologisch bedeutsamen Organen wie Leber, Niere und dem Nervensystem in vitro eingesetzt. Die mechanistischen Untersuchungen von toxikologischen Befunden in vivo machen aber auch den Einsatz anderer Zellsysteme aus Knorpel, Knochen, Skelett- und Herzmuskel, Hoden usw. notwendig. Alle Zellsysteme werden soweit etabliert, daß die Methode unter standardisierten Bedingungen wiederholt werden kann und charakteristische Proteine oder Enzyme der jeweiligen Organe unter diesen Bedingungen erhalten bleiben.
Die entscheidende Aufgabe der Toxikologie ist die Riskoabschätzung für den Menschen. Hier kann die in vitro Toxikologie durch den direkten Vergleich zwischen menschlichen und tierischen Zellkulturen unter den gleichen Bedingungen einen bedeutenden Beitrag leisten.

Summary: The importance of standardised cell culture methods for the routine toxicology in pharmaceutical companies
The establishment and the use of standardised cell cultures build the basis for toxicological investigations and guarantees the comparison over years. The requirement for these investigations in vitro are mainly primary cell cultures from the target organs. The cell cultures should keep, also under long term culture conditions, the organ differentiation. This will be supported by new developments in the fields of cell culture media, supplements and coating material of the cell culture dishes.
Routinely, cells from toxicologically important organs like liver, kidney and nervous system were used in vitro. However, mechanistic investigations of toxicological findings in vivo made the use of cell systems from other organs like cartilage, bone, skeletal and heart muscle cells, testis eg necessary. All cell culture systems were established and standardised to allow repeated tests under the same conditions. The determination of charcteristic proteins or enzymes of the related organ will demonstrate the organ like quality of the cell cultures.
The central question of toxicology is the risk assessment. Here, the in vitro toxicology will provide important information by a comparison between human and animal cell cultures under the same conditions.

Keywords: 3R, replacement, primary cell cultures, organ specification, long term cultures, species comparison

1 Einleitung

Die Verwendung von Zellkulturen in der Pharmaindustrie ist inzwischen als etabliert und akzeptiert anzusehen. Ihr Einsatz auf der Suche nach neuen Wirkprinzipien und Wirkstoffen auf dem Sektor der Pharmazeutika und Pflanzenschutzmittel ist mittlerweile unverzichtbar. Hierbei kommen primäre Zellkultursysteme aus dem Tier- und Pflanzenreich, wie auch Zelllinien zum Einsatz. Neue molekularbiologische Verfahren („*reporter gen assays*") lassen molekulare *Targets* in den Zellen „leuchten". Somit wurde der Weg frei für das sogenannte HTS (*high throughput screening*) mit maximalem Einsatz von Zellkulturen auf minimalem Raum. Diese Verfahrenstechnologie erlaubt eine wesentlich gezieltere Forschung ohne den Einsatz von z.T. aufwendigen *in vivo* oder *ex vivo* Verfahren. Neue molekularbiologische Verfahren in Kombination mit der Entschlüsselung des menschlichen Genoms machen unter dem Oberbegriff „*Pharmacogenomics*" die Untersuchung der Wirkung von spezifischen Pharmaka auf den Menschen unter der Berücksichtigung von genetischen Variationen und Defekten erst möglich.

Zellkultursysteme haben auch in der Toxikologie Einzug gehalten und werden bei toxikologischen Bewertungen und der Auswahl von Entwicklungskandidaten, aber auch zur Aufklärung mechanistischer Fragestellungen benutzt. Der Anspruch an die Zellkulturen ist hier völlig anders als in der Forschung. In der Forschung werden spezifische Mechanismen und Angriffspunkte betrachtet und Wirksubstanzen daran optimiert, in der Toxikologie werden die Reaktionen von Zellen, Organen oder des Organismus im Ganzen untersucht. Daher ist der Anspruch in der Toxikologie an die Organspezifität eines Zellkultursystems sehr hoch, da möglichst alle Funktionen erhalten bleiben sollen.

Die Grundlage dazu bilden standardisierte Zellkulturverfahren, da nur sie über Jahre hinweg einen Vergleich zwischen den Substanzen und ihren Wirkprinzipien ermöglichen. Dies wurde durch die Entwicklung von Zellkulturmedien, die Supplimentierung von Hormonen und Wachstumsfaktoren und die richtigen Oberflächensubstra-

te in den Zellkulturschalen erst möglich. Heutzutage können viele Zellsysteme wie die Niere, Leber, das Nervensystem, Knochen, Knorpel, Muskel, Hoden und Knochenmark erfolgreich und reproduzierbar unter Erhalt ihrer organspezifischen Eigenschaften kultiviert werden. Sensitive biochemische, analytische und molekularbiologische Methoden erlauben auch hier eine genaue Charakterisierung der Zelle und ihre spezifische Reaktion auf einen Prüfsubstanzen.

2 Leber

Das sogenannte „Sandwich-Modell", die Einbettung von Leber-Zellen zwischen zwei Collagen-Gele, erbrachte den Durchbruch bei der Kultivierung von Hepatozyten (Bader et al., 1996). Das Modell bietet die Möglichkeit, im Vergleich zu bisherigen Techniken, auch chronische Effekte unter wiederholter Substanzgabe zu untersuchen, da diese Zellkulturen über eine Woche stabil bleiben. Bekannte klinische Parameter wie die Aspartataminotransferase (AST), die Alaninaminotransferase (ALT) und die Albuminsekretion können untersucht werden, aber auch wichtige Enzyme zur Entgiftung/Giftung von Substanzen wie die Phase I und II Enzyme des Fremdstoffmetabolismus. Molekularbiologische Verfahren wie die „*real time*" PCR oder „*toxicogenomics*" erlauben auch in diesem Zellkultursystem eine Untersuchung auf breiter Basis bezüglich der Genregulation. Ein weiterer, nicht minder wichtiger Durchbruch war der Einsatz von unterschiedlichen Spezies. Die Verwendung von Humanhepatozyten im Vergleich zu Hepatozyten toxikologisch wichtiger Tierspezies wie Hund, Affe, Ratte und Maus ist hierbei besonders wichtig, denn sie berücksichtigt die genetischen und metabolischen Eigenarten, die im Tier nicht erfaßt werden können, in der Praxis aber eine große Rolle bezüglich des Fremdstoffmetabolismus spielen.

3 Niere

Die Niere ist als ein Hauptausscheidungsorgan das zweite bedeutende Organ für Fremdstoffe. Die Aufgaben unterscheiden sich deutlich von denen der Leber, und so ist es auch nicht verwunderlich, daß die Zellkulturverfahren unterschiedlich ausfallen (Boogard et al., 1990). Als Modell für die Niere werden proximale Tubulus Zellen verwendet, die den Fremdstofftransport und -metabolismus bewerkstelligen. Der Erhalt von Ionenpumpen, Transportproteinen und Mitochondrien ist das wichtigste Merkmal neben der Polarität und der enormen Oberflächenvergrößerung. Spezifische Kulturmethoden auf sogenannten „*Inserts*" erlauben auch hier die Bestimmung von klinischen Parametern wie alkalischer Phosphatase (AP), N-Acetyl-β-Glucoaminidase (NAG) oder γ-Glutamyltransferase (γ-GT). Des weitern spielen Ionen-Pumpen wie die Na^+K^+ ATPase und der Transport von Methylglukose eine wichtige Rolle. Wie bei der Leber haben auch die Fremdstoff metabolisierenden Enzyme, zumeist der Phase II, eine große Bedeutung und werden biochemisch oder über ihre Genregulation bestimmt.

Die Niere ist ebenfalls geeignet, Vergleiche im Rahmen der Speziesunterschiede anzustellen. Wie bei der Leber laufen zur Zeit Validierungsstudien, um diesen Endpunkt für verschiedene humanrelevante Nephrotoxine aus dem Bereich der Antibiotika und Zytostatika zu klären.

4 Nervensystem

Ein weiteres Zellkultursystem beschäftigt sich mit dem Nervensystem. Hierzu werden standardisierte Neuronen- oder Gliazellkulturen eingesetzt. Diese Kulturen gleichen, wie die Hepatozyten, in einem hohen Maße den Zellen im Organismus. Der Differenzierungsstatus kann anhand der elektrischen Erregbarkeit, der Neurotransmittersysteme zur chemischen Kommunikation, des Energieverbrauchs, des Zellaufbaus und der hohen Empfindlichkeit gegenüber oxidativem Stress und Ischämie nachgewiesen werden (Schmuck und Schlüter, 1996; Schmuck et al., 2000). Das Nervensystem ist empfindlich für vielerlei exogene Einflüsse, die zu sich langsam entwickelnden, neurodegenerativen Effekten führen können. Deshalb ist es gerade hier dringend notwendig, eine verlängerte Behandlung unter standardisierten Bedingungen durchzuführen. Die möglichen Endpunkte sind hier ebenfalls vielschichtig: Untersuchungen zu oxidativem Stress, Energiegewinnung, Zytoskelett und Neurotransmittersystemen sind dabei nur die wichtigsten. Zusätzlich können elektrophysiologische Untersuchungen oder die schon oben erwähnten Genexpressionsanalysen hilfreich sein.

5 Schlußfolgerung

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass standardisierte Zellkulturen in hohem Maß ihren jeweiligen Zellen im Organismus in Funktion und Morphologie gleichen müssen, um prädiktive Aussagen bezüglich des toxikologischen Profils einer Substanz machen zu können. Zudem müssen diese Modelle über Jahre stabil anwendbar sein, um Vergleiche anstellen zu können. Dieser Aufgabe werden bisher nur primäre Kulturen gerecht.

Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Möglichkeit einer Riskoabschätzung für den Menschen. Der Vergleich zwischen tierischen und humanen Zellkulturen erlaubt eine quantitiative Abschätzung des Risikopotentials bezüglich des jeweiligen Organs.

Diese Schritte erlauben ein frühzeitige Optimierung der Entwicklungskandidaten, die später in *in vivo* „Guideline-Studien" weiter verfolgt werden.

Literatur

Bader, A., Knop, E., Kern, A. et al. (1996). 3-D coculture of hepatic sinusoidal cells with primary hepatocytes- design of an organotypical model. *Exp. Cell Res. 226*, 223-233.

Boogard, P. J., Zoeteweij, J. P., van Berkel, T. J. C. et al. (1990). Primary culture of proximal tubular cells from normal rat kidney as an in vitro model to study mechanisms of nephrotoxicity. *Biochem. Pharmacol. 39*, 1335-1345.

Schmuck, G. Schlüter, G. (1996). An in vitro model for toxicological investigations of environmental neurotoxins in primary neuronal cell cultures. *Toxicology and Industrial Health 12*, 683-696.

Schmuck, G., Ahr, H.-J. and Schlüter, G. (2000a). Rat cortical neuron cultures: A in vitro model for differentiating mechanisms of chemically induced neurotoxicity. *In Vitro and Molecular Toxicology. 13*, 37-50.

Korrespondenzadresse
Dr. Gabriele Schmuck
BAYER AG, Pharma Research Centre
Aprather Weg
D-42096 Wuppertal
Tel. +49-202-36 88 30
Fax +49-202-36 41 37
E-mail: gabriele.schmuck.gs@bayer-ag.de