

Freisetzung eines Botenstoffes der Entzündung (TNF- α) aus Lebermakrophagen in Perfusions-Zellkultur

Thomas Hartung, Stephan Hermening, Achim Sauer und Albrecht Wendel

Biochemische Pharmakologie, Universität Konstanz

Zusammenfassung

Tumor Nekrose Faktor- α ist ein zentraler Botenstoff der Entzündung, d.h. das Protein wird von Zellen des Immunsystems bei Infektionen, Verletzungen oder Autoimmunerkrankungen freigesetzt und unterhält bzw. verstärkt den Entzündungsvorgang. Die Messung solcher Botenstoffe im Versuchstier bei experimentellen Schädigungen ist eine Methode, um die Wirksamkeit von möglichen Pharmaka zu testen. Versuche, alternative Modelle der Freisetzung solcher Botenstoffe aus Zellkulturen zu verwenden, sind dadurch limitiert, daß erhebliche Unterschiede im Zeitverlauf der Bildung zwischen Versuchstier und der Kultur bestehen.

Es wird die These aufgestellt, daß dies im wesentlichen auf die fehlende Elimination der einmal freigesetzten Botenstoffe zurückzuführen ist. Untersucht wurde das Modell der Bakterienendotoxin-induzierten Freisetzung von Tumor-Nekrose-Faktor- α aus Lebermakrophagen der Ratte. Die bekannte Diskrepanz zwischen der Freisetzung *in vivo*, hier der Ratte im Endotoxin-Schock, und der Produktion unter üblichen Kulturbedingungen aus den wichtigsten Produzenten, den Kupfferzellen der Ratte, wurde gezeigt. Durch Übergang von der statischen Inkubation zur Perfusionszellkultur wurde eine Elimination in dem Modell erzeugt, d.h. ein ständiger Ersatz des Zellüberstandes durch frisches Medium. Tatsächlich ergab die Modellierung einer Elimination in der Zellkultur durch kontinuierliche Perfusion einen der *in-vivo*-Situation ähnlichen Verlauf der Freisetzung des Mediators. Damit erlaubt die Perfusionskultur eine Annäherung an die *in vivo* Situation, die die Relevanz der Zellkultur für die Testung von pharmakologischen Wirkstoffen erhöht.

1 Einleitung

Die heutige Entzündungsforschung konzentriert sich auf die Bildung körpereigener Mediatoren als Vermittler und Verstärker der durch

Verletzung, Infektion oder Autoimmunerkrankungen ausgelösten Primärschädigung (Gallin et al., 1992). Ein zentraler Ansatz zum Studium der Bildung dieser Botenstoffe besteht in einer experimentellen Schä-

Summary: The formation of a mediator of inflammation (TNF- α) by rat liver macrophages in perfusion culture

*Tumor necrosis factor- α (TNF- α) represents a central distal mediator of inflammation. It is a protein released upon infections, traumatic lesions or autoimmune disorders from immunocompetent cells and thus maintains or enhances the inflammatory reaction. The determination of such mediators in experimentally challenged animals is a mean for testing the efficacy of putative drugs. Alternative attempts for the assessment of mediator release from cell cultures are limited by profound differences in the time course of mediator release *in vitro*.*

*We checked the hypothesis that these kinetic differences are due to the lack of elimination of mediators formed and released *in vitro*. We used the release of TNF- α from liver macrophage cultures stimulated with the bacterial cell wall component endotoxin as a model. The discrepancy between the *in vivo* release of the cytokine during endotoxic shock in the rat and the *in vitro* release from Kupffer cells was confirmed. By using a continuous open perfusion system instead of a static culture, the simulation of an elimination resulted in a mediator release that closely resembled the kinetics seen *in vivo*. Perfusion cultures appear to be suitable for relevant *in vitro* screening models in drug development and testing.*

*Keywords: endotoxin, Kupffer cells, cytokines, kinetics, *in vitro* pharmacology*

digung des Versuchstieres und anschließender Messung der Freisetzung von Mediatoren (Neugebauer et al., 1993; Beutler, 1993). Aufgrund seiner Komplexität ist das Netzwerk aus Zytokinen, Lipidmediatoren und

vielen anderen Mediatoren noch weitgehend unverstanden. Als reduktionistischer Ansatz sind dabei Zellkultorexperimente hilfreich, in denen die Bildung solcher Substanzen z.B. auf bakterielle Stimuli hin durch Leukozyten untersucht werden kann. Gegenüber dem Tierversuch haben diese *in vitro* Methoden jedoch auch Nachteile. Sowohl die Stimuli als auch die daraufhin freigesetzten Mediatoren sind dauerhaft in der Zellkultur präsent und wirken weiter auf die Leukozyten, während sie im Versuchstier einer ständigen Elimination unterliegen und nur kurz ihre Wirkung entfalten können. Die Pharmakologie kennt den erheblichen Unterschied zwischen einer kurzzeitigen Gabe (Bolus) und der Dauerinfusion von Wirkstoffen. Tatsächlich unterscheidet sich auch die Mediatorbildung *in vitro* deutlich von der *in vivo*:

- Durch die dauerhafte Anwesenheit eines Stimulus kommt es im allgemeinen zu größeren freigesetzten Mediatormengen pro Zelle.
- Statt einem schnell erreichten Maximum („peak“) im Versuchstier findet man *in vitro* meist eine langfristige Produktion, die oft erst durch das Absterben der Leukozyten in der Kultur endet.
- Die Palette freigesetzter Mediatoren *in vitro* ist meist breiter, da jedes Zellprodukt rückwirken und seinerseits weitere Faktoren freisetzen kann.

Aus diesen Gründen kann die Zellkultur heute den Tierversuch zum Studium der Bildung von Botenstoffen der Entzündung und ihrer Modulation durch pharmakologische Maßnahmen nicht ersetzen.

Der Einsatz der Perfusionszellkultur stellt eine Möglichkeit dar, eine Angleichung an die *in vivo* Situation vorzunehmen. Seit wenigen Jahren ist ein Zellkultursystem standardisiert verfügbar (Minusheet-Technik), das die Kultur von beliebigen Zellen im Durchfluß ermöglicht. Anders als unter den üblichen statischen Kulturbedingungen führt hier die kontinu-

ierliche Entfernung aller freigesetzten Zellprodukte aus der Kultur zu Verhältnissen, die eher der *in vivo* Situation entsprechen. Der Vorteil dieser Kulturmethode für die Morphologie von Zellen ist vielfach belegt (Minuth et al., 1992; Aigner et al., 1994; Gebhardt et al., 1979; Jauregui et al., 1994; Farghali et al., 1994).

Aus den genannten Überlegungen heraus wurde deshalb diese Technik auf eine stimulierbare Leistung der Zellen, nämlich die Freisetzung von Entzündungsmediatoren, angewendet.

Die Erwartungshaltung besteht darin, durch eine Annäherung der Bedingungen der *in vitro* Freisetzung von Entzündungsmediatoren an die *in vivo* Situation einen erheblichen Teil dieser Phänomene *in vitro* studierbar zu machen. Gerade die tierexperimentellen Modelle der Entzündungsforschung sind für Versuchstiere sehr belastend. Die auf dem Weg der Perfusionskultur erwartete Aufwertung der Zellkulturmethodik soll hier einen teilweisen Übergang zu *in vitro* Methoden ermöglichen, und damit eine Vorausswahl von Wirkstoffen in der pharmakologischen Forschung bereits vor dem Tierversuch möglich machen.

2 Problemstellung und Auswahl von TNF- α als Meßparameter

Als Modell wurde die Endotoxin-induzierbare Freisetzung von Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α) aus Lebermakrophagen (Kupffersche Zellen) der Ratte gewählt (siehe Foto Titelseite): Endotoxine sind der Hauptzellwandbestandteil gramnegativer Bakterien. Endotoxine sind Lipopolysaccharide (LPS) der äußeren Zellmembran. LPS ist ein zentraler Auslöser der Akut-Phase-Reaktion und führt zur Aktivierung körpereigener Funktionen (Komplement-, Gerinnungs- und Kininsystem). Es stimuliert Monozyten und Makrophagen zur Freisetzung endogener Pyrogene (Interleukin 1, Interleukin

6, TNF- α), die eine Fieberreaktion vermitteln. Hohe LPS-Dosen lösen im Versuchstier durch eine Überaktivierung des unspezifischen Immunsystems den Endotoxin-Schock aus, der ein weit verbreiteter Tierversuch ist. Dabei handelt es sich um eine Ganzkörper-Entzündungsreaktion, die die grundlegende Symptomatik des Septischen Schocks beim Patienten widerspiegelt.

Durch die experimentelle Auslösung dieses Schadens werden Makrophagen aktiviert, denen als Zellen der unspezifischen Abwehr eine Schlüsselrolle zukommt. Kupfferzellen der Leber stellen mit 80% die größte Population aller seßhaften Makrophagen im Organismus (Laskin, 1990) und machen 30% der nichtparenchymalen Zellen (NPC) in der Leber aus. Die Lebermakrophagen bilden eine protektive Barriere für die systemische Zirkulation, indem sie potentielle Noxen (Endotoxine, Mikroorganismen, Immunkomplexe, Tumorzellen) beseitigen, die die Leber über das Pfortaderblut erreichen. Nach Stimulation sezernieren Kupfferzellen eine Reihe bioaktiver Mediatoren, zum einen von der Arachidonsäure abstammende Lipidmediatoren (Prostaglandine, Leukotriene), zum anderen Zytokine (Interleukin 1, Interleukin 6, Interleukin 12, TNF- α). Diese Faktoren sind wichtige Regulatoren der Immunantwort.

TNF- α ist einer der zentralen Mediatoren der Entzündung. Er ist ein Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 17 kD und wird hauptsächlich von Monozyten und Makrophagen, aber auch von T-Lymphozyten, Neutrophilen und NK-Zellen gebildet (Tracy et al., 1989). Eine Reihe von Effekten von LPS lassen sich durch die Gabe von TNF simulieren (Beutler et al., 1985a; Tiegs et al., 1989) und durch Antikörper gegen TNF- α hemmen (Beutler et al., 1985b; Tiegs et al., 1990). Gerade im Modell des Endotoxin-Schocks wurde die zentrale Rolle von TNF als terminalem Mediator wiederholt gezeigt.

3 Versuchstiere, Material und Methoden

3.1 Versuchstiere

Für die Experimente wurden männliche Fischer-Ratten (F344, Charles River, Sulzfelden) mit einem Gewicht von 200–300 g verwendet. Die Haltung erfolgte in der Tierforschungsanlage Konstanz für mindestens eine Woche. Die Tiere hatten freien Zugang zu Futter und Wasser und wurden unter natürlichen Lichtverhältnissen (12h Tag/Nacht-Rhythmus, 100 Lux) bei 55% Luftfeuchtigkeit gehalten.

3.2 TNF-Freisetzung in Endotoxin-behandelten Ratten *in vivo*

LPS (von *Salmonella abortus equi*, Sigma, Deisenhofen) wurde in PBS gelöst und den Ratten über die Schwanzvene i.v. injiziert (50mg/kg). Nach verschiedenen Zeiten wurde den Tieren Schwanzblut durch Inzision zur Bestimmung von TNF abgenommen. In dem Versuch wurden zwei Gruppen von je drei Tieren verwendet, denen abwechselnd Serumproben entnommen wurden.

Es handelt sich bei diesem Versuch um ein mehrere Jahre zurückliegendes, nicht publiziertes Experiment. Zu diesem Zeitpunkt war ein Ratten-TNF-Elisa noch nicht verfügbar, deshalb erfolgte die Messung seinerzeit im Bioassay. Es wurde auf eine Wiederholung verzichtet, da einerseits eine gute Korrelation von Bioassay und ELISA bei den *in vitro* Experimenten bestand und andererseits der Vergleich der Kinetik keine quantitativen Werte erfordert.

3.3 Kupfferzellpräparation

Die Präparation der Rattenleberzellen wurde nach der Methode von Seglen (1976), modifiziert nach Hartung (1991), durchgeführt. Die Leber wurde dabei in zwei Schritten erst mit EGTA-haltiger Salzlösung und dann mit einer Kollagenase-Lösung rezirkulierend perfundiert. Die nach Ausschütteln gewonnene Primärzellsuspension wurde mittels Gaze (100 µm Porengröße, Eckert, Waldkirch/Brsg.) grob gereinigt, und die ver-

schiedenen Zellpopulationen wurden durch Differentialzentrifugation getrennt. Die nichtparenchymalen Zellen (NPC) wurden durch Zentrifugation (100 g, 3 min) von den Hepatozyten getrennt. Um die Zellen von Zelldebris zu trennen, schlossen sich vier Zentrifugationsschritte (400 g, 7 min.) an. Für die Versuche wurden NPC mit einer Vitalität >95% (Trypan-Blau-Ausschluss) verwendet. Die Zellen wurden bei 37°C, 20% O₂ und 5% CO₂ kultiviert.

3.4 Kollagenbeschichtung des Trägermaterials

Minutushsheets (*Minucells and Minutissue*, Bad Abbach) wurden mit Glasdeckgläschen bestückt (Abb.1a) und 10 Minuten in 70% Ethanol gelegt. Nach Überführen der Sheets in Greiner-24well-Kulturplatten folgten zwei Waschschritte mit sterilem PBS (jeweils 10 Minuten schüt-

teln). Nach dem Waschen wurden die Vertiefungen mit 500 µl Kollagen (0,2 mg/ml Kollagen in 0,1% Essigsäure) gefüllt und für mindestens zwei Tage bei 37°C ruhen gelassen. Die Sheets wurden anschließend einmal mit EDTA-haltiger HANKS-Salzlösung und dreimal mit reiner HANKS-Salzlösung gespült (pro Waschgang zwei Minuten schütteln). Bis zur endgültigen Verwendung ließen sich die Minutushsheets lichtgeschützt bei 4°C lagern.

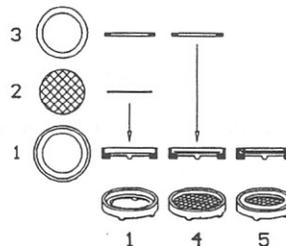
3.5 Inkubation der Kupfferzellen

In die Vertiefungen einer 24well-Kulturplatte kamen jeweils ein Minutushsheet und 500 µl Zellsuspension mit 2·10⁶ NPC/ml. Die Zellen wurden über Nacht vorkultiviert und anschließend in bereits mit vorgewärmtem Medium (HEPES-gepuffert, 37°C) gefüllte Minuth-Kammern (*Minucells and Minutissue*, Bad Abbach) überführt (pro Kammer 6 Sheets, Abb.1b). Die Perfusion erfolgte durch eine Mehrkanalschlauchpumpe (Peristaltikpumpe IPC-8, Ismatec Laboratoriumstechnik, Wertheim-Mohnfeld). Die Perfusionsgeschwindigkeit betrug 5 ml/h. Alle 30 min wurden Aliquots entnommen und bis zur Messung bei -70°C weggefroren. Parallel wurden entsprechend mit Zellen besiedelte Minusheets in eine neue 24well-Kulturplatte mit 500µl Medium überführt (statische Kulturbedingungen).

3.6 TNF-Bestimmung

Die TNF-Bestimmung erfolgte entweder im kommerziellen Ratten-TNF-ELISA (*Biosource, Laboserv, Marburg*) oder im TNF-Bioassay. Dieser wurde mit der TNF-sensitiven Fibrosarkom-Zelllinie WEHI 164 Klon 13 nach der Methode von Espevik und Nissen-Meyer (1986) durchgeführt. Als Standard diente hier rekombinantes Maus-TNF-α, ein Geschenk von Dr. A. Adolf, Bender & Co., Wien. Die Spezifität der Messung wurde mit einem kreuzreagierenden Schaf-anti-Maus-TNF-α-Antiserum gezeigt. Das Antiserum wurde durch Immunisierung eines Schafes in der Tierforschungsanlage

a) Aufbau eines Minusheet



b) Perfusionskultur in der Minuthkammer unter einfachen experimentellen Bedingungen (Peristaltikpumpe, Heizplatte)

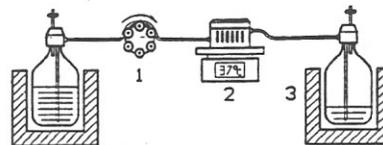


Abbildung 1: Zusammensetzen der Zell-Träger „Minusheets“ (a) und Aufbau der Perfusionszellkultur (b)

Die Abbildung zeigt das Zusammensetzen eines Zellkulturträgers (Minusheet): Es wurden Deckgläschen von 13 mm Durchmesser verwendet, die später mit Kollagen beschichtet wurden. Die Ratten-Lebermakrophagen wurden auf die Träger aufgebracht, nach Adhärenz in eine Medium-gefüllte Perfusionskammer überführt und unter kontinuierlicher Durchspülung perfundiert.

der Universität Konstanz gewonnen. Es zeigte bisher keine Kreuzreaktionen mit 6 getesteten anderen Mauszytokinen, aber mit TNF- α von Ratte und Mensch.

4 Ergebnisse

4.1 TNF-Freisetzung *in vivo*

Wird Versuchstieren LPS intraperitoneal verabreicht, entwickeln sie ein systemisches Entzündungssyndrom mit einem nachfolgenden Multiorganversagen. In einem solchen Endotoxin-Schock-Versuch in der Ratte wurde der zeitliche Verlauf der Freisetzung des zentralen pro-inflammatorischen Mediators TNF- α durch

Messung im Bioassay aus Serumproben gezeigt (Abb.2a). In Analogie zu publizierten Befunden im Mausmodell (Wendel, 1990) kam es zu einer rasch einsetzenden Freisetzung des Zytokins innerhalb der ersten Stunde nach LPS-Injektion mit einem Maximum bei 90 min. Nach vier Stunden war bereits kein TNF mehr in der Zirkulation nachweisbar.

4.2 TNF-Freisetzung *in vitro* bei statischer Zellkultur

Unter einer statischen Zellkultur seien Zellen auf herkömmlichen Gewebekulturplatten im Brutschrank verstanden. In der statischen Kultur erfolgte ein einmaliger kompletter Medienwechsel zu Beginn der Inku-

bation. Die Inkubation von Ratten-Kupfferzellen in Gegenwart von 10 $\mu\text{g/ml}$ LPS führte ebenso wie *in vivo* zu einer zeitabhängigen Bildung von TNF- α , die im Bioassay oder im ELISA (Abb.2b) gemessen werden konnte. Bei dieser statischen Kultur wurde ein kontinuierlicher Anstieg der TNF-Freisetzung bis ca 4–5 h nach Stimulation in Anwesenheit von 10 $\mu\text{g/ml}$ LPS gemessen. Es kam dann zur Ausbildung eines Plateaus, das erst langfristig innerhalb von 24h auf die Hälfte des maximalen TNF-Spiegels abfiel. Dies scheint weniger auf eine Aufnahme durch die Kupfferzellen als vielmehr auf eine Instabilität des Proteins bei 37°C zurückzuführen zu sein, denn auch rekombinantes Maus-TNF verlor seine Bioaktivität bei Inkubation im Brutschrank in der Abwesenheit von Zellen in etwa diesem Maße (Daten nicht gezeigt). Am Ende einer solchen Inkubation waren die Kupfferzellen, gemessen am Trypanblau-Ausschluß, vital. Die Freisetzung von TNF endete also nicht durch ein Absterben der produzierenden Zellen, sondern durch spezifische Regulation. Es ist daraus zu folgern, daß bei herkömmlicher Zellkultur wohl eine Freisetzung von TNF durch LPS, aber keine spezifische Elimination modelliert werden kann.

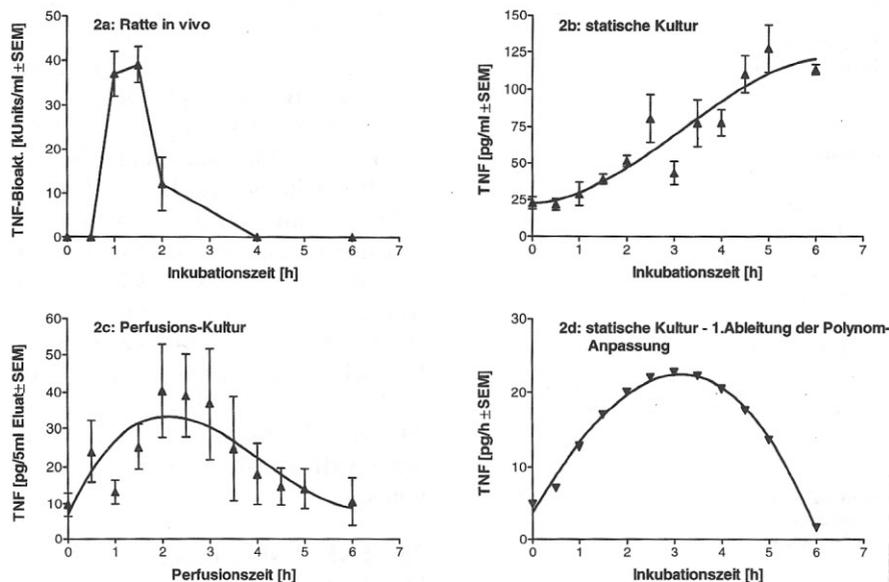


Abbildung 2: LPS-induzierte TNF-Freisetzung in verschiedenen Entzündungsmodellen

Vergleich der *in vivo* Kinetik mit der Freisetzung aus statischer bzw. Perfusions-Zellkultur

- Zwei Gruppen von je 3 Ratten wurden mit 50 mg/kg LPS intraperitoneal injiziert und aus Blutproben TNF im Bioassay gemessen
- In drei unabhängigen Zellpräparationen wurden für jeden angegebenen Inkubationszeitpunkt je drei Zellträger in Anwesenheit von 10 $\mu\text{g/ml}$ LPS im Brutschrank inkubiert. TNF wurde im ELISA gemessen. Ohne LPS wurden nur minimale TNF-Mengen spontan freigesetzt. Kontrollinkubationen, bei denen die Zellen direkt auf die Plastikplatte statt auf den Zellträger adhären konnten, zeigten eine entsprechende TNF-Bildung.
- In denselben drei unabhängigen Zellpräparationen wurden je sechs Zellträger mit Kupfferzellen mit 5 ml/h bei einem LPS-Gehalt des Mediums von 10 $\mu\text{g/ml}$ perfundiert. Die TNF-Messung aus dem Eluat erfolgte im Ratten-TNF-ELISA. Parallele Perfusionen ohne LPS-Zusatz zum Medium enthielten nur geringe TNF-Konzentrationen.
- Die Daten aus 2b wurden durch eine Kurvenanpassung in ein Polynom 3. Grades überführt. Dargestellt ist die erste Ableitung, d.h. die Produktion von TNF pro Zeitintervall.

4.3 Etablierung der Perfusionskultur von Kupfferzellen

Die Perfusion von Zellkulturen führt zu einer kontinuierlichen Elimination von Produkten des Zellstoffwechsels, im speziellen Fall hier von TNF- α . Zunächst wurden die Bedingungen der Perfusionszellkultur bezüglich Konstanz des pH und der Temperatur optimiert. Die Temperatur wurde über die Temperatureinstellung der Wärmeplatte (Medax, Kiel), auf die die Perfusionskammer gestellt wurde, reguliert. Die Temperaturmessung zur Einstellung erfolgte direkt in der Minuthkammer (Digitalthermometer GTH 1150, Greisinger Electronic). Das Perfusionsmedium wurde im Brutschrank bei 20% O₂ und 5% CO₂ äquilibriert. Die eigentliche Perfusion erfolgte außer-

halb des Brutschanks, d.h. unter Umgebungsluft mit niedrigerem CO₂-Gehalt. Unter diesen Bedingungen erwies sich dieser in statischen Systemen eingesetzte Bicarbonat-Puffer als unzureichend, der pH verschob sich in den alkalischen Bereich (pH 8,4) durch Entweichen von CO₂ aus dem an sich geschlossenen Perfusionssystem. Durch den Einsatz von HEPES gepufferten RPMI 1640 Medium (Biochrom) konnte der pH über den erforderlichen Zeitraum von sechs Stunden bei pH 7,4 konstant gehalten werden.

Das Kammervolumen betrug ca. 3 ml. Die Perfusionsgeschwindigkeit wurde auf 5 ml/h festgesetzt, um eine ausreichende Durchspülung und den damit verbundenen Stoffaustausch zu gewährleisten. Sie darf gleichzeitig nicht zu groß gewählt werden, damit die zu messenden Botenstoffe (hier TNF) nicht zu stark verdünnt werden und sich damit der Messung entziehen.

4.4 TNF-Freisetzung aus Kupferzellen in Perfusionszellkulturen

Um die LPS-induzierte TNF-Freisetzung aus Kupferzellen unter *in vivo* ähnlichen Voraussetzungen zu studieren, wurden die Zellen kontinuierlich mit frischem Medium perfundiert und das sezernierte TNF kontinuierlich aus den Kulturen entfernt. Es wurden die Kinetiken der LPS-induzierten TNF-Freisetzung in Perfusionskultur und statischer Zellkultur über einen Zeitraum von 6 Stunden verglichen. LPS war über den gesamten Versuchszeitraum dem Medium zugesetzt, d.h. auch das kontinuierlich eingespülte frische Medium enthielt 10 µg/ml LPS.

In den perfundierten Zellkulturen kam es nach einer anfänglichen Erhöhung der TNF-Freisetzung mit einem Maximum bei zwei Stunden zu einer Reduktion, und die TNF-Freisetzung fiel nach sechs Stunden auf den Kontrollwert ab (Abb. 2c). Damit kommt die Kinetik der TNF-Freisetzung eher den *in vivo* Verhältnissen nahe als dem unter statischen Bedingungen *in vitro* erhaltenen Verlauf.

5 Diskussion

Schwerpunkt der Entzündungsforschung der letzten 20 Jahre war die Untersuchung von sogenannten Mediatoren, d.h. körpereigenen Signalstoffen, die den Entzündungsvorgang steuern. Nachdem zunächst die Eicosanoide (Thromboxan, Leukotriene, Prostacyclin und die Prostaglandine) im Zentrum des Interesses standen, sind es heute vor allem Proteine wie die Zytokine (Interleukine, Interferone, TNF- α , Wachstumsfaktoren). Das Gebiet hat sich jedoch extrem diversifiziert; insgesamt sind über 100 Substanzen heute Gegenstand der Forschung (darunter reaktiver Sauerstoff, Stickoxid, Proteasen, Plättchen-aktivierender-Faktor, Komplementfaktoren, etc.). Praktisch jeder dieser Mediatoren wird als möglicher pharmakologischer Eingriffspunkt mit entsprechenden Synthese-Inhibitoren, Antagonisten oder Agonisten diskutiert und untersucht. Der Zugang ist dabei im wesentlichen tierexperimentell, d.h. eine dem klinischen Bild ähnelnde Schädigung wird dem Versuchstier beigebracht und die Bildung dieser Botenstoffe wird studiert (Beispiele für TNF: Ha et al., 1983, 1987; Kiener et al., 1988; Fong et al., 1989; Ertel et al., 1991; Smith et al., 1993). Danach werden die Testsubstanzen im Tierversuch sowohl auf die Hemmung der Mediatorbildung/-wirkung als auch auf das Endergebnis des Tierversuchs hin untersucht (Schwellung, Entzündung, Letalität, etc.; Beispiele für TNF: Badger et al., 1989; Schade et al., 1989; Hartung et al., 1992).

Im allgemeinen sind die Zellen, die den jeweiligen Mediator im Patienten oder im Versuchstier bilden, bekannt. Dennoch kann man wegen einiger grundlegender Schwierigkeiten wie dem Fehlen einer Elimination nur näherungsweise die Freisetzung *in vitro* studieren. Die Ergebnisse in Zellkultur unterscheiden sich nach Menge, Kinetik und Muster der freigesetzten Mediatoren erheblich vom Versuchstier. Hier wurde am Beispiel von TNF gezeigt, daß sich

tatsächlich die Freisetzung im Versuchstier (Abb.2a) und aus den für die Produktion hauptsächlich verantwortlichen Kupferzellen der Leber wesentlich unterscheidet. Ein oberflächlicher Vergleich zeigt, daß der höchste Spiegel (*peak*) *in vitro* erst mehrere Stunden später beobachtet wird. *In vivo* unterliegt TNF jedoch einer raschen Elimination: Im Nagetier wurden Eliminationshalbwertszeiten von 11 bis 27 Minuten gemessen (Waage, 1987; Flick et al., 1985). Es wurde die These verfolgt, daß sich die Unterschiede zwischen der Kinetik der TNF-Bildung *in vivo* und *in vitro* nicht auf eine Insuffizienz der Zellkultur, sondern lediglich auf den Mangel einer Elimination zurückführen läßt. Dazu wurde eine kontinuierliche Elimination des gemessenen TNF durch Perfusion der Kultur in dem Modell erzeugt. Die gewählte willkürliche Eliminationshalbwertszeit (Fluß 5 ml/h bei 3 ml Kammervolumen) betrug 36 min. Bereits diese grobe Annäherung an die Situation im Tier führte zu einer Kinetik, die derjenigen im Versuchstier weitgehend ähnelt. Bei der Wahl der Flußrate handelt es sich um einen Kompromiß aus den *in vivo* beobachtbaren Eliminationsraten und der unvermeidbaren Verdünnung des zu messenden TNF. Die größte Streuung der TNF-Messung in Perfusionskultur verglichen mit der statischen Kultur hängt u.a. damit zusammen, daß bereits an der Nachweisgrenze des ELISAs gearbeitet werden mußte. Das Maximum der TNF-Produktion lag hier bei 2 h, während es im Versuchstier bei 1.5 h lag. Der verbleibende Unterschied könnte auf die geringere Temperatur (37°C im Brutschrank im Vergleich zu 40–42°C in der Ratte) zurückzuführen sein.

Diese Annäherung an die *in vivo* Verhältnisse ist kaum durch die Beseitigung autokrin stimulierender Faktoren der Kupferzellen erklärbar, sondern resultiert wahrscheinlich aus den unterschiedlichen Verfahren der Probengewinnung: In der herkömmlichen statischen Kultur akkumuliert das gebildete TNF: Es

wird deshalb zu jedem Zeitpunkt nicht die aktuelle Produktion, sondern das Integral der bisherigen Bildung gemessen. Um dies zu veranschaulichen, wurde in Abb. 2d eine Kurvenanpassung für die TNF-Bildung unter statischen Kulturbedingungen vorgenommen (Polynom 3. Grades). Dargestellt ist die entsprechende erste Ableitung, die die jeweilige Neuproduktion pro Zeitintervall darstellt. Auch auf diese Weise erhält man eine Produktion, die der *in vivo* Situation angenähert ist. Allerdings liegt das Maximum der Produktion jetzt erst bei 3 h. Ob dies auf eine unphysiologische Rückwirkung gebildeter, stimulierender Produkte (wie TNF selbst) zurückzuführen ist, bleibt zu klären.

Die Ergebnisse zeigen aber, daß bezüglich der TNF-Freisetzung zwischen beiden Zellkultursystemen tatsächlich nur geringe Unterschiede bestehen. Auch die pro Zelle freigesetzte TNF-Menge unterschied sich nicht signifikant. Bezüglich der beobachteten Kinetik wurden beim Vergleich zu *in vivo* jedoch bisher sprichwörtlich „Äpfel und Birnen“ verglichen. Die Perfusionszellkultur enthält jedoch die Komponente der ansonsten fehlenden Elimination, die bei solchen Botenstoffen, die einer stärkeren autokrinen Regulation unterliegen, einen noch deutlicheren Einfluß auf ihre Kinetik haben sollte. Hinzu kommt im Vergleich zum Tierversuch, daß der Stimulus LPS bei den Zellkultursystemen ständig präsent war, während er *in vivo* einer raschen Elimination unterliegt. Im Gegensatz zur statischen Kultur ließe sich dies jedoch in der Perfusionskultur ebenfalls modellieren.

Erweiterte Anwendungen der Methodik ergeben sich bei der Untersuchung von pharmakologischen Inhibitoren: Hier kann neben der Dauerinfusion des Wirkstoffes erstmals auch die Bolus-Gabe, d.h. einmalige Verabreichung des Wirkstoffes entsprechend z.B. einer Injektion im Versuchstier, in Zellkultur modelliert werden.

Die Vorteile der Perfusionskultur bei Dauerkultivierung von Zellen

bezüglich der Morphologie und Differenzierung der Zellen ist vielfach gezeigt (Minuth et al., 1992; Aigner et al., 1994; Gebhardt et al., 1979; Jauregui et al., 1994; Farghali et al., 1994). Hier wurden nun erstmals in Kurzzeitkulturen Effekte der Perfusionskultur studiert. Mit der dadurch erreichten Annäherung an die *in vivo* Verhältnisse wird eine wichtige Diskrepanz zwischen Ergebnissen aus Tierversuchen und aus Zellkulturen abgebaut. Diese war bisher ein wesentlicher Grund dafür, daß die Entzündungsforschung fast ausschließlich auf Tierversuchen basierte.

Danksagung

Die Autoren danken Elisabeth Schmied und Gregor Pinski für exzellente technische Unterstützung. Prof. W. Minuth (Universität Regensburg, Anatomie) hat durch kritische Diskussion und hilfreiche Ratschläge zu diesem Projekt beigetragen. Die Arbeit wurde unterstützt durch das Land Baden-Württemberg im Rahmen der Förderung der Entwicklung von Alternativmethoden zur Vermeidung von Tierversuchen.

Literatur

- Aigner, J., Kloth, S., Kubitzka, M., Kashgarian, M., Dermietzel, R. und Minuth, W. W. (1994). Maturation of renal collecting duct cells *in vivo* and under perfusion culture. *Epith. Cell. Biol.* 3, 70–78.
- Badger, A. M., Olivera, D., Talmadge, J. E. und Hanna, N. (1989). Protective effect of SK&F 86002, a novel dual inhibitor of arachidonic acid metabolism, in murine models of endotoxin shock: inhibition of tumor necrosis factor as a possible mechanism of action. *Circ. Shock* 27, 51–61.
- Beutler, B., Milsark, I. W. und Cerami, A. (1985a). Cachectin/tumor necrosis factor: production, distribution, and metabolic fate *in vivo*. *J. Immunol.* 135, 3972–3977.
- Beutler, B., Milsark, I. W. und Cerami, A. (1985b). Passive immunization against cachectin/tumor necrosis factor protects mice from lethal effect of endotoxin. *Science* 229, 869–871.
- Beutler, B. (1993). *Tumor necrosis factors: the molecules and their emerging role in medicine*. New York: Raven Press.
- Ertel, W., Horrison, M. H., Wang, P., Zheng, F., Ayala, A., und Chaudry, I. H. (1991). The complex pattern of cytokines in sepsis. *Ann. Surg.* 214, 141–148.
- Espevik, T. und Nissen-Meyer, J. (1986). A highly sensitive cell line, WEHI 164 clone 13, for measuring cytotoxicity factor/tumor necrosis factor from human monocytes. *J. Immunol. Meth.* 95, 99–105.
- Farghali, H., Kamenikova, L. und Hynie, S. (1994). The concept of application of immobilized and perfused mammalian cells (a bioreactor model) in biomedical research. *Physiol. Res.* 43, 117–120.
- Flick, D. A. und Gifford, G. E. (1985). Tumor necrosis factor. In P.F. Torrence (Hrsg.), *Biological response modifiers* (171–218). Orlando: Academic Press.
- Fong, Y., Tracey, K. J., Moldawer, L. L., Hesse, D. G., Manogue, K. B., Kenney, J. S., Lee, A. T., Kuo, G. C., Allison, A. C., Lowry, S. F. und Cerami, A. (1989). Antibodies to cachectin/tumor necrosis factor reduce interleukin 1 β and interleukin 6 appearance during lethal bacteremia. *J. Exp. Med.* 170, 1627–1633.
- Galín, J. I., Goldstein, I. M. und Snyderman, R. (1992). *Inflammation – Basic principles and clinical correlates*. New York: Raven Press.
- Gebhardt, R. und Mecke, D. (1979). Perfused monolayer cultures of rat hepatocytes as an improved *in vitro* system for studies on ureogenesis. *Exp. Cell Res.* 124, 349–359.
- Ha, D. K. K., Gardner, I. D. und Lawton, J. W. (1983). Characterization of macrophage function in *Mycobacterium lepraemurium*-infected mice: sensitivity of mice to endotoxin and release of mediators and lysosomal enzymes after endotoxin treatment. *Parasite Immunol.* 5, 513–526.
- Ha, D. K. K., Cheng, C. P., Fung, K. P., Choy, Y. M. und Lee, C. Y. (1987). Effect of anti-inflammatory drugs on the production of tumor

- necrosis factor and lipopolysaccharide induced mortality in mice. *Cancer Lett.* 34, 291–296.
- Hartung, T., und Wendel, A., (1991). Endotoxin-inducible cytotoxicity in liver cell cultures I. *Biochem. Pharmacol.* 42, 1129–1135.
- Hartung, T., Tiegs, G. und Wendel, A. (1992). The role of leukotriene D₄ in septic shock models. *Eicosanoids* 5, S42–S44.
- Jauregui, H. O., Naik, S., Santangini, H., Pan, J., Trenkler, D. und Mullon, C. (1994). Primary cultures of rat hepatocytes in hollow fiber chambers. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 30A, 23–29.
- Kiener, P. A., Marek, F., Rodgers, G., Lin, P-F., Warr, G. und Desiderio, J. (1988). Induction of tumor necrosis factor, IFN- γ , and acute lethality in mice by toxic and non-toxic forms of lipid A. *J. Immunol.* 141, 870–874.
- Laskin, D. L. (1990). Nonparenchymal cells and hepatotoxicity. *Sem. Liver Disease* 10, 293–304.
- Neugebauer, E. A. und Holaday, J. W. (1993). *Handbook of mediators in septic shock*. Ann Arbor: CRC Press.
- Minuth, W., Dermietzel, R., Kloth, S. und Hennerkes, B. (1992). A new method culturing renal cells under permanent superfusion and producing a luminal-basal medium gradient. *Kidney International* 41, 215–219.
- Schade, U. F., Ernst, M., Reinke, M. und Wolter, D. T., (1989). Lipoxygenase inhibitors suppress formation of tumor necrosis factor *in vitro* and *in vivo*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 159, 748–754.
- Seglen, P. O. (1976). Preparation of isolated rat liver cells. *Meth. Cell Biol.* 13, 29–83.
- Smith, S. R., Calzetta, A., Bankowski, J., Kenworthy-Bott, L. und Terminielli, C. (1993). Lipopolysaccharide-induced cytokine production and mortality in mice treated with *Corynebacterium parvum*. *J. Leukoc. Biol.* 54, 23–29.
- Tiegs, G., Wolter, M. und Wendel, A. (1989). Tumor necrosis factor is a terminal mediator in D-galactosamine/endotoxin induced hepatitis in mice. *Biochem. Pharmacol.* 38, 627–631.
- Tiegs, G., Niehörster, M. und Wendel, A. (1990). Leukocyte alterations do not account for hepatitis induced by endotoxin or TNF- α in galactosamine-sensitized mice. *Biochem. Pharmacol.* 40, 1317–1322.
- Tracy, K. J., Vlassara, H. und Cerami, A. (1989). Cachectin/tumour necrosis factor. *Lancet* 20, 1122–1126.
- Waage, A. (1987). Production and clearance of tumor necrosis factor in rats exposed to endotoxin and dexamethasone. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 45, 348–355.
- Wendel, A. (1990). Biochemical Pharmacology of inflammatory liver injury in mice. *Meth. Enzymol.* 186, 675–680.

Korrespondenzadresse

Dr. Dr. med. Thomas Hartung
Biochemische Pharmakologie
Universität Konstanz
Postfach 5560
D-78434 Konstanz

