



Die Anwendung von Hepatozytenkulturen zur Erkennung leberkrebserzeugender Substanzen Möglichkeiten und Grenzen

F. Bieri, S. Muakkassah-Kelly und P. Bentley
Ciba-Geigy AG, Zentrale Funktion Produktesicherheit
Postfach, 4002 Basel

Zusammenfassung

Viele Leberkarzinogene werden in den heute zur Verfügung stehenden in vitro-Tests zum Nachweis ihrer Genotoxizität als potentielle Krebserreger erkannt. Ausserdem wurde eine zunehmende Zahl nichtgenotoxischer Substanzen erkannt, die in chronischen Nagerstudien Lebertumoren erzeugen. Verschiedene Lipidsenker gehören zu dieser Klasse der nicht genotoxischen Karzinogene. Nach subchronischer Gabe lösen sie in der Leber des intakten Tieres eine Reihe von charakteristischen zellulären Veränderungen (z.B. Induktion der replikativen DNS-Synthese, Peroxysomenproliferation, Lebervergrösserung) aus. Einige derartiger Veränderungen können auch durch Exposition in vitro an primären Hepatozytenkulturen reproduziert werden. Unsere vergleichenden Untersuchungen mit derartigen Substanzen haben gezeigt, dass eine gute Korrelation zwischen den in vitro-Befunden einer Induktion der replikativen DNS-Synthese an Hepatozytenkulturen und der Potenz in vivo eine Lebervergrösserung hervorzurufen, besteht. In vivo-Studien weisen zudem auf eine gute Korrelation zwischen Art und Ausmass der Lebervergrösserung einerseits und der hepatokarzinogenen Potenz andererseits hin.

Primäre Hepatozytenkulturen bieten sich möglicherweise als nützliches in vitro-Testsystem zur ersten Abschätzung und Charakterisierung eines potentiellen hepatokarzinogenen Effektes neuer Substanzen an. Die aus Untersuchungen an Zellkulturen gewonnenen Erkenntnisse könnten deshalb in Zukunft dazu dienen, Substanzen mit karzinogenem Potential frühzeitig zu erkennen und demnach zu einer Verringerung der Zahl von Langzeitstudien beitragen.

Summary: Use of hepatocytes in primary cultures to predict potential hepatocarcinogenicity of compounds

Short-term tests for genotoxic activity will detect a variety of potential carcinogens. However, experience over the last few years has shown that many chemical carcinogens are not detected in these tests. A large

proportion of these non-mutagenic (non-genotoxic) carcinogens induce tumors in the rodent liver after life-long feeding.

One class of such carcinogens are the hypolipidemic drugs many of which induce a characteristic hepatomegaly upon subchronic treatment. Typically this liver enlargement is accompanied by increased mitotic activity and a proliferation of the hepatic peroxisome compartment. Results also suggest a correlation between the degree and the nature of the hepatomegalic response to a compound, and its hepatocarcinogenic potency, but it remains unclear whether the growth stimulation and/or the peroxisome proliferation is correlated with the carcinogenicity. Both, the induction of peroxisomal enzyme and of replicative DNA synthesis may be measured in primary cultures of adult rat hepatocytes following in vitro exposition. Moreover, the ability of the compounds tested to induce in vitro replicative DNA synthesis in primary cultures of adult rat hepatocytes correlated well with the potency of the hepatomegalic response induced in vivo in treated rodents.

Consequently, studies using such cultures might be useful to characterize and possibly predict in vitro the hepatocarcinogenic potency of some new compounds. The early recognition of the possible carcinogenic property of a new substance might accordingly contribute to the reduction of a number of life-long studies.

Einleitung

Mit der ersten Beschreibung einer praktikablen enzymatischen Perfusionsmethode zur Gewinnung isolierter Leberepithelien aus der Rattenleber durch Berry & Friend im Jahre 1969 (1) war der Weg für eine Kultivierung dieser Zellen (Hepatozyten) in Nährlösungen geebnet. Im Verlauf der Zeit fand diese Methode eine immer breitere Anwendung in der Toxikologie, beispielsweise zur Abklärung zyto- und genotoxischer Effekte einer Vielzahl von körpereigenen und körperfremden Substanzen (2).

Im vorliegenden Beitrag sollen am Beispiel der Lipidsenker einige Wirkungen von nicht-zytotoxischen und nicht-genotoxischen Verbindungen auf kultivierte Hepatozyten beschrieben und im Hinblick auf ihre pathognostische Bedeutung diskutiert werden. An Nagetieren verursachen Substanzen dieser Art nach subchronischer Gabe eine markante Lebervergrößerung und nach Langzeitbehandlung ist häufig ein vermehrtes Auftreten von Lebertumoren zu beobachten.

Zweistufenmodell der Leberkarzinogese

Ein weithin akzeptiertes Konzept der chemisch induzierten Tumorentstehung in der Leber, also der Hepatokarzinogenese, beschreibt diese als einen mindestens zweistufigen Prozess (3). In einem ersten "Initiation" genannten Schritt kann eine karzinogene Substanz in der Regel nach metabolischer Aktivierung kovalent mit der DNS der betroffenen Zellen reagieren. Falls es der Zelle nicht gelingt, diese DNS-Veränderung schnell zu reparieren, befindet sie sich in einem "transformierten" Zustand, der auf einer irreversiblen genotoxischen Veränderung der Erbsubstanz beruht. Ob sich nun eine "initiierte" Zelle in Richtung Krebszelle entwickelt, hängt von weiteren äusseren Einflüssen ab, deren Zusammenspiel die Ausprägung der ursprünglich gesetzten DNS-Veränderung begünstigen muss. Der Zeitraum, innerhalb dessen sich diese zusätzlichen Faktoren auswirken, wird als "Promotionsphase" bezeichnet.

Irgendwann während dieser Promotionsphase wird sich eine Tumorzelle konstituieren, die sich der Kontrolle der vernetzten Regulierungsschaltkreise entzieht, und, nun autonom wachsend, mit ihrer zahlreichen Nachkommenchaft die Funktionstüchtigkeit des Gewebes bedroht. Dieses "Initiations-Promotionsmodell" kann bezüglich genotoxisch, also initiiierend wirkenden Substanzen eine gewisse Plausibilität beanspruchen. Demgegenüber scheinen nichtgenotoxische Verbindungen eher die Promotionsphase zu beeinflussen bzw. zu beschleunigen; ihr Wirkungsmechanismus ist jedoch weitgehend unverstanden. Einige abgrenzende Eigenschaften zwischen tumorinitiiierenden und tumorpromovierenden Substanzen sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

Tab.1 : Einige Merkmale von tumorinitiierenden und tumorpromovierenden Substanzen (aus Ref. 4)

	Initiator	Promotor
Mutagenität	+	-
Zelltransformation in vitro	+	-
Kovalente oder interkalierende Bindung an DNS	+	-
Zytotoxizität	+	-/+
Induktion von präneoplastischen Läsionen	+	-
Tumorbildung nur nach vorangegangener Initiierung (Zwei-Stufen-Protokoll)	-	+
Wachstum des kritischen Organs	-	+
Proliferation von präneoplastischen Zellen	-	+
Reversibilität	-	+

Die Prüfung chemischer Verbindungen auf ihre karzinogene Wirkung

Der Beweis für ein karzinogenes Potential einer Substanz wird normalerweise im Langzeit-Tierversuch erbracht. Diesem Test kommt heute bei der toxikologischen Beurteilung einer chemischen Verbindung hohe Bedeutung zu. Gewichtige Nachteile dieser aufwendigen Versuchsanordnung sind jedoch nicht zu übersehen. So vergehen zwischen der Planung und Berichterstattung einer Langzeitstudie vier Jahre. Zudem lassen die in Langzeitstudien erhobenen Befunde in der Regel kaum Rückschlüsse auf die den beobachteten Effekten zugrunde liegenden Wirkungsmechanismen zu. Ein möglichst umfassendes Wissen über die der chemischen Karzinogenese zugrunde liegenden Mechanismen ist aber wünschenswert, nicht zuletzt im Hinblick auf die Abschätzung einer möglichen krebsauslösenden Eigenschaft beim Menschen. Die Suche nach prädiktiv wie auch mechanistisch aussagekräftigen in vitro-Kurzzeit-Tests ist deshalb verständlich.

Zur Identifikation genotoxischer oder initiierender Karzinogene existiert eine ganze Batterie von in vitro Testsystemen mit verschiedenen Endpunkten (Mutagenität in Bakterien und Säugerzellen, Chromosomenveränderungen, DNS-Strangbrüche, DNS-Reparatur, Zelltransformation). Im Gegensatz dazu bieten sich zur frühzeitigen Erkennung und Charakterisierung nichtgenotoxischer, also z.B. promovierender Karzinogene, kaum validierte in vitro-Testsysteme an (siehe auch Tabelle 1).

Eine Analyse der im Rahmen des NCI/NTP Programms erarbeiteten Tumordaten (5) weist aber klar auf die zahlenmässige Bedeutung nicht-genotoxischer Karzinogene u.a. in der Leber hin: Von 222 untersuchten Chemikalien verursachten 25% Tumoren in der Leber, wobei sich wiederum die Hälfte dieser Leberkarzinogene als nicht genotoxisch erwies.

Die Nagerleber ist also offenbar häufig das Zielorgan nicht-genotoxischer Karzinogene, zu denen neben den bereits erwähnten Lipidsenkern verschiedene andere Stoffgruppen wie Barbiturate, Sexualsteroidhormone und chlorierte Kohlenwasserstoffe gehören. Im folgenden soll nun die Verwendung kultivierter Hepatozyten zur Identifizierung und Charakterisierung von Leberkarzinogenen diskutiert werden. Dabei bieten sich zwei realistische Möglichkeiten an:

1. Versuchsanordnungen zur Erfassung von Parametern, die auf eine chemisch-induzierte Transformation der Testzellen in vitro hinweisen und
2. Versuchsanordnungen zur Erkennung und Quantifizierung zellulärer Veränderungen, die möglicherweise im Zusammenhang mit der hepatokarzinogenen Wirkung einer nicht-genotoxischen Substanz stehen.

Chemisch-induzierte in vitro-Transformation von Hepatozyten

Isolierte und kultivierte Hepatozyten behalten ihre Funktionstüchtigkeit nur für einige Tage. Zudem vermehren sie sich in Kultur wie beim erwachsenen Tier äusserst langsam. Diese Gegebenheiten stellen ein gewisses Hindernis beim Nachweis chemisch induzierter in vitro-Transformationen in primären

Hepatozytenkulturen dar. Zur Verfügung stehen andererseits sog. "permanente" Zelllinien; das sind Zellstämme, die über Jahre hinweg gehalten werden können. Diese eignen sich jedoch nur bedingt für Transformationsstudien, weil sie häufig metabolisch oder regulatorisch inkompetent sind.

Mit dem Ziel, die Wahrscheinlichkeit einer in vitro-Transformation zu erhöhen, haben wir die Zusammensetzung des Nährmediums unserer primären Hepatozytenkulturen verändert. So konnten durch Zugabe von Dimethylsulfoxid zum Nährmedium charakteristische Hepatozytenfunktionen über mehrere Wochen stabilisiert werden (6).

In Primärkultur können gewisse Chemikalien das Verhalten von Zellen in Richtung eines autonomen (d.h. von exogenen Wachstumsfaktoren unabhängigen) Wachstums verändern. Mit dieser "Immortalisierung", die als ein frühes Ereignis der in vitro-Transformation betrachtet wird, kann die Expression eines Onkogens verbunden sein. Wir haben deshalb versucht, die Wahrscheinlichkeit einer chemisch induzierten Transformation von kultivierten Hepatozyten durch experimentelle Einführung des myc-Onkogens in isolierte Rattenhepatozyten zu erleichtern (7). Obwohl die Präsenz dieses Gens die Wachstumseigenschaften der Zellen beeinflusste, waren Veränderungen in Richtung einer Immortalisierung der Hepatozyten unter den von uns getesteten Bedingungen nicht festzustellen. Somit steht uns für die in vitro-Transformation von Hepatozyten vorderhand kein praktikables Testsystem zur Verfügung.

Die Erkennung früher zellulärer Veränderungen hepatokarzinogener Peroxysomenproliferatoren in primären Hepatozytenkulturen

Auf eine Kurzzeit-Behandlung mit verschiedenen Lipidsenkern reagiert die Rattenleber mit einer markanten Gewichtszunahme (Hepatomegalie). Im Elektronenmikroskop zeigen die Hepatozyten dieser vergrößerten Lebern eine starke Zunahme der Zahl und Grösse der Peroxysomen, verbunden mit einer mässigen Vermehrung der Membranelemente des glatten endoplasmatischen Retikulums (Hypertrophie). Zusätzlich beobachtet man eine auf Zellvermehrung hindeutende Induktion der replikativen DNS-Synthese

(Hyperplasie) (8). Es hat sich eingebürgert, die mit diesen hepatotropen Eigenschaften ausgestatteten Verbindungen als Peroxysomenproliferatoren zu bezeichnen (Tabelle 2).

Tab.2. Charakteristische Effekte von Peroxisomenproliferatoren auf die Rattenleber.

Effekt	Nachweismethode	Reproduzierbarkeit in Hepatozyten- kulturen
<u>Hypertrophie</u>		
Peroxysomenproliferation	Ultramorphologie	+
	Induktion peroxysomaler Enzymaktivitäten	+
Proliferation des glatten Endoplasmatischen Retikulums	Ultramorphologie	+
	Induktion spezifischer Enzyme (z.B. Cytochrom P-452)	+
<u>Hyperplasie</u>	Induktion der replika- tiven DNS-Synthese (RDS)	+
<u>Generelle Hepatotropie</u>	Stimulierung der RNS-Synthese	+
	Stimulierung der Protein-Synthese	+

Im Langzeitversuch erweisen sich Peroxysomenproliferatoren trotz geringer oder fehlender Genotoxizität oft als potente Leberkarzinogene (9).

Stehen nun die von Substanzen dieser Art ausgelösten frühen zellulären Veränderungen in einem kausalen Zusammenhang mit ihrer sich erst nach Langzeitbehandlung manifestierenden Hepatokarzinogenität? Diese Frage ist bis heute nicht schlüssig zu beantworten. Allerdings kann hier auf die vielfach belegte Tatsache hingewiesen werden, dass sich präkanzerogene Läsionen und maligne Tumoren häufig durch eine stark beschleunigte Zellteilung (Hyperplasie bzw. invasives Wachstum, Metastasierung) auszeich-

nen. Und diese Fähigkeit zur Stimulierung der Zellteilung kommt offensichtlich auch Lipidsenkern und anderen Peroxysomenproliferatoren zu (10).

Wie aus Tabelle 2 ersichtlich ist, können einige charakteristische Effekte, die Peroxysomenproliferatoren in Hepatozyten nach in vivo Behandlung auslösen, in primären Hepatozytenkulturen reproduziert werden.

Im Rahmen derartiger Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe mit dem experimentellen Lipidsenker Nafenopin ergab sich zunächst, dass die Proliferation der Peroxisomen (gemessen als peroxisomale β -Oxidation) und die Stimulierung der replikativen DNS-Synthese in vitro nicht eng korreliert sind. Die beiden Parameter verhalten sich bezüglich des Zeitablaufs sowie der Wirkung spezifischer Inhibitoren weitgehend unabhängig (11, 12). Wenn wir die Wirkung verschiedener Peroxysomenproliferatoren auf diese zwei Modellparameter in vitro vergleichen (12, 13), können wir nur eine mässige Korrelation beobachten (Tabelle 3).

Tab.3. Die Wirkung verschiedener Peroxysomenproliferatoren auf die replikative DNS-Synthese und die peroxysomale β -Oxidation in primären Hepatozytenkulturen

Substanz	Hepatomegalie (in vivo)	1) Kleinste wirksame Dosis ($\mu\text{g/ml}$)	
		Replikative DNS-Synthese	Peroxisomale β -Oxidation
Nafenopin	+++	1	1
Tiadenol	++	10	0.1
Tibric Acid	++	10	0.1
Procetofen	++	10	1
Gemfibrozil	+	> 100	0.1
MEHP 2)	+	100	1
Clofibrate	±	50	0.1

1) Daten aus verschiedenen publizierten in vivo Studien.

2) Monoethylhexylphthalat.

Dabei scheint die Stimulierung der replikativen DNS-Synthese in vitro mit dem Ausmass der in vivo beobachteten Hepatomegalie besser zu korrelieren als der induktive Effekt auf die peroxisomale β -Oxidation (Tabelle 3). Diese gute Korrelation ist vor allem im Zusammenhang mit der bereits erwähnten generell beschleunigten Zellteilung in Tumorgewebe von Interesse. Die Stimulierung der DNS-Synthese durch Peroxysomenproliferatoren in primären Hepatozytenkulturen könnte sich durchaus als geeigneter Indikator leberkrebs erzeugender Potenz dieser Substanzen erweisen.

Schlussfolgerungen

Die Resultate zahlreicher in vivo-Versuche zeigen insgesamt, dass Zellvermehrung ein prognostisches Indiz für die tumorauslösende Potenz eines Stoffes sein kann (14). In unseren eigenen Studien haben wir die Stimulierung der replikativen DNS-Synthese in kultivierten Hepatozyten als relevanten Testparameter erkannt. Eine in vivo oder in vitro als Peroxysomenproliferator identifizierte Verbindung, die in diesem Kultursystem eine ausgeprägte Stimulierung der DNS-Synthese bewirkt, wird im Langzeitversuch mit einiger Wahrscheinlichkeit Lebertumoren induzieren.

Natürlich fehlt diesem artifiziellen in vitro-Testsystem die Komplexität des Gesamtorganismus. So können Ergebnisse nur für Substanzen relevant sein, die auch in vivo direkt auf Leberzellen einwirken. Zudem haben wir unsere Versuche zunächst mit verschiedenen, strukturell verwandten Peroxysomenproliferatoren durchgeführt. Es bleibt abzuwarten, ob ähnliche Aussagen, möglicherweise auch unter Einbezug zusätzlicher Parameter, auch für andere Substanzklassen möglich sind. Ebenfalls von Interesse wäre in Bezug auf die bekannten Speziesunterschiede die Verwendung kultivierter Leberzellen aus anderen Spezies einschliesslich des Menschen. Entsprechende Untersuchungen werden von uns zur Zeit durchgeführt.

Wir sind von der Bedeutung weiterer Forschungsarbeiten in dieser Richtung überzeugt, liegen doch die Vorteile relevanter in vitro-Testsysteme klar auf der Hand. Neue Substanzen oder Substanzklassen können bereits in einem

frühen Stadium ihrer kommerziellen Entwicklung rationell getestet werden, denn sowohl die Zahl der Versuchstiere wie auch die benötigten Substanzmengen sind im Vergleich zu in vivo-Studien sehr klein. Von Bedeutung vor allem für die Forschung scheint auch ein weiterer Aspekt: Zellkulturen sind, gerade wegen ihrer gegenüber dem Gesamtorganismus geringeren Komplexität, in mancher Beziehung auch ideale experimentelle Systeme für Untersuchungen des Mechanismus der chemischen Karzinogenese.

Literatur

1. Berry M.N. and Friend D.S. (1969). High-yield preparation of isolated rat parenchymal cells. *J. Cell Biol.* 43, 506-520.
2. Boelsterli U.A. und Suter W. (1988). Anwendung von Hepatozytenkulturen in der Toxikologie. *Alternativen zu Tierexperimenten*, 9, 18-31.
3. Peraino C., Fry R.J.M. and Staffeld E. (1971). Reduction and enhancement by phenobarbital of hepatocarcinogenesis induced in the rat by 2-acetylaminofluorene. *Cancer Res.* 31, 1506-1512.
4. Schulte-Hermann R. (1981) Zur Rolle der Tumorpromotion. In: *Zur Problematik von Karzinogenitätsstudien bei Arzneimitteln*. AMI Berichte 2, 567-572.
5. Ashby J. and Tennant R.W. (1988). Chemical structure, Salmonella mutagenicity and extent of carcinogenicity as indicators of genotoxic carcinogenesis among 222 chemicals tested in rodents by the U.S. NCI/NTP. *Mutation Res.* 204, 17-115.
6. Muakkassah-Kelly S.F., Bieri E., Waechter F., Bentley P. and Stäubli W. (1987). Long-term maintenance of hepatocytes in primary culture in the presence of DMSO: Further characterization and effect of nafenopin, a peroxisome proliferator. *Exptl. Cell Res.* 171, 37-51.
7. Muakkassah-Kelly S.F., Jans D.A., Lydon N., Bieri E., Waechter F., Bentley P. and Stäubli W. (1988). Electroporation of cultured rat hepatocytes with the c-myc gene potentiates DNA synthesis in response to epidermal growth factor. *Exptl. Cell Res.* 178, 296306.
8. Cohen A.J. and Grasso P. (1981) Review of the hepatic response to hypolipidaemic drugs in rodents and assessment of its toxicological significance to man. *Fd. Cosmet. Toxicol.* 19, 585-605.
9. Reddy J.K., Azarnoff D.L. and Hignite C.E. (1980). Hypolipidaemic hepatic peroxisome proliferators form a novel class of chemical carcinogens. *Nature*, 283, 397-398.



10. Butterworth B.E., Louri D.J., Smith-Oliver T. and Cattley R.C. (1987). The potential role of chemically-induced hyperplasia in the carcinogenic activity of the hypolipidemic carcinogens. *Toxicol. Ind. Health.* 3, 129-148.
11. Bieri E, Bentley P, Waechter F and Stäubli W. (1984). Use of primary cultures of adult rat hepatocytes to investigate mechanisms of action of nafenopin, a hepatocarcinogenic peroxisome proliferator. *Carcinogenesis*, 5, 1033-1038.
12. Bieri E, Muakkassah-Kelly S., Waechter F, Stäubli W. and Bentley P. (1987). Use of primary cultures of adult rat hepatocytes to study the mode of action of the peroxisome proliferator nafenopin. In H.D. Fahimi and H. Sies (eds). *Peroxisomes in Biology and Medicine*, pp 286-294. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
13. Bieri E, Bentley P, Waechter F and Stäubli W. (1986). Mitogenicity of peroxisome proliferators in monolayers of adult rat hepatocytes. *Fd. Chem. Toxicol.* 24, 709.
14. Louri D.J., Goldsworthy T.L. and Butterworth B.E. (1987). The value of measuring cell replication as a predictive index of tissue specific tumorigenic potential. In Butterworth B.E. and Slaga T.J. (eds). *Banbury report 25: Non-genotoxic mechanisms in carcinogenesis*, pp 119-134.

Danksagung

Die von S. Muakkassah-Kelly durchgeführten Untersuchungen wurden in dankenswerter Weise durch den Schweizerischen Nationalfonds im Rahmen eines speziellen Forschungsprogramms (Alternativen zum Tierversuch, 4.783.084.17) gefördert.