



Entwicklung von Hepatozyten-Kulturen für die Toxizitätsprüfung

Peter Maier
Institut für Toxikologie, ETH und Universität Zürich
Schorenstr. 16, CH-8603 Schwerzenbach

Zusammenfassung

Frisch isolierte Hepatozyten können ein breites Spektrum von möglichen metabolischen Umwandlungsreaktionen mit Fremdstoffen durchführen und sind deshalb besonders gut geeignet für toxikologische und pharmakologische Untersuchungen. Bis heute können aber die Eigenschaften der Leberzellen in Kulturen nur während 24 Stunden einigermaßen erhalten werden. Insbesondere die für die Umwandlung von Fremdstoffen notwendigen Enzymsysteme, welche in der Toxizitätsprüfung besonders wichtig sind, werden in vitro in den Leberzellen rasch abgebaut.

Mit Hilfe der Kokultur von Hepatozyten und epithelialen Helferzellen, kombiniert mit der Anpassung des Sauerstoffgehaltes an die Verhältnisse in vivo, wurde versucht, die metabolischen Eigenschaften von frisch isolierten Ratten-Leberzellen über eine längere Kulturdauer (Tage bis Wochen) zu erhalten.

Die Analyse des Protein- und DNS-Gehaltes der kultivierten Hepatozyten mit Hilfe der Durchfluss-Zytometrie ermöglichte es, Veränderungen im Wachstum und in der Differenzierung der kultivierten Zellen zu erkennen.

Die Verwendung von Langzeitkulturen und die Messung von Inhaltsstoffen in einzelnen Zellen sollten es erlauben, nebst den üblichen akuten Untersuchungen, auch chronische, subtoxische Expositionen der Leberzellen durchzuführen. Die anschliessenden Reaktionen (bleibende Schädigungen) der überlebenden Leberzellen entsprechen eher den Veränderungen, wie sie im intakten Organismus induziert werden. Die Verwendung von Hepatozyten-Langzeitkulturen würde den Anwendungsbereich in der Toxizitätsprüfung erweitern und dazu beitragen, Tierversuche zu reduzieren.

Summary

Development of hepatocyte cultures in toxicity testing.

The liver plays a key role in drug and xenobiotic metabolism. The probability of detecting the toxicity of unknown chemicals in vitro is therefore highest in liver cell cultures. In culture however, enzymes involved in xenobiotic metabolism are preferentially degraded within one to two days. In order to improve this situation, investigations were focused on the maintenance of a tissue-like oxygen tension and the maintenance of xenobiotic metabolism by means of heterotypic cell cultures.

In conventional culture dishes, as a function of cell density, the oxygen diffusion is delayed and depleted. Using teflon membrane culture dishes, a stable, incubator-controlled, tissue like oxygen tension of 4% and 13% O₂ respectively, was achieved.

In co-cultures of hepatocytes, the auxiliary cells selected from livers of 10 day old rats maintained the liver cell-specific cytochrome P-450 dependent aldrin epoxidase up to one week, to 40% of the original value.

The analysis of cellular DNA and protein content in hepatocytes by flow cytometry revealed specific ploidy shifts inducible by low oxygen tension, by fetal calf serum, by phenobarbital and dimethylsulfoxide. Chemically induced alterations in ploidy might be an indicator to detect compounds which interfere with growth and differentiation of hepatocytes in culture.



Hepatozyten-Kulturen in der Toxizitätsprüfung

In der allgemeinen Toxizitätsprüfung werden nebst Arzneimitteln auch Industrieprodukte (Zwischen- und End-Produkte), Kosmetika, Lebensmittelzusätze, natürlich vorkommende Gifte (Toxine aus Pflanzen, Pilzen und Bakterien) und Produkte, welche durch die menschliche Tätigkeit anfallen (Abgase, Rückstände), geprüft. Die toxikologische Prüfung sollte eine schädliche Wirkung der Prüfsubstanz auf den Menschen und die belebte Umwelt erkennen, ein eventuelles Gesundheitsrisiko für den Menschen abklären und bei Vergiftungen eine mögliche Behandlung aufzeigen. Oft handelt es sich um Prüfsubstanzen, deren Wirkung unbekannt ist. Die Substanzen können wasserunlöslich, gasförmig oder als Partikel (Fasern) vorliegen. Um diese Aufgabe zu lösen, muss der Toxikologe die am besten geeignete Methode mit der grössten Zuverlässigkeit und Aussagekraft auswählen und abwägen, ob in vitro- oder in vivo-Methoden besser geeignet sind. Damit vermehrt in vitro-Methoden eingesetzt werden können, sollten die Testsysteme so verbessert werden, dass sie, zumindest teilweise, Informationen liefern, wie sie aus Tierversuchen resultieren. Diese Bestrebungen wurden im Rahmen des Nationalen Forschungsprogramms Nr 17 zur Entwicklung von Alternativ-Methoden zum Tierversuch und mit Doktoranden-Projekten durch den Schweizerischen Nationalfonds am Institut für Toxikologie der ETH und Universität Zürich unterstützt. Im vorliegenden Bericht sind die Ergebnisse, welche in den vergangenen drei Jahren in der Arbeitsgruppe für zelluläre Toxikologie mit Hepatozyten-Kulturen erarbeitet wurden, zusammengefasst. Auf die Darstellung der methodischen Probleme wurde besonderen Wert gelegt, denn diese sind es, welche die Anwendung von Hepatozyten-Kulturen heute noch auf spezifische Fragestellungen beschränken.

Vergleichen wir den Aufbau und die Funktion der Leber im intakten Organismus mit dem meist einschichtigen Zellverband von Hepatozyten in der Kulturschale, dann wird klar, dass es nicht möglich ist, die Komplexität des Organs in vitro zu simulieren. Es kann sich also nur darum handeln, mit Zellkulturen einen definierten, für die Fragestellung wichtigen Teil der Leberfunktion in vitro ablaufen zu lassen, und zu untersuchen, ob Chemikalien diese ausgewählte Funktion schädigen. Mit solchen Untersuchungen sollte sich zumindest ein Teil der Tierversuche erübrigen und die Anzahl der Tiere in den eventuell trotzdem noch notwendigen Versuchen reduzieren lassen.

Warum überhaupt Leberzellen? Im lebenden Organismus gelangen die Fremdstoffe nach der Nahrungsaufnahme über das Blut zuerst in die Leber und werden dort in wasserlösliche

Zwischenprodukte umgewandelt. Diese werden anschliessend hauptsächlich durch die Niere ausgeschieden (Entgiftung). Mit körperfremden Stoffen geschieht aber oft das Gegenteil. Aus vorerst harmlosen Chemikalien entstehen Produkte oder Zwischenprodukte, welche in der Leber selbst oder in einem anderen Organ eine toxische Wirkung ausüben. In den Leberzellen ist das vollständige Spektrum von möglichen Umwandlungs-Reaktionen für Fremdstoffe (Xenobiotika) vorhanden. Es ist daher von zentraler Bedeutung, dass die dafür verantwortlichen Enzymsysteme in einem in vitro-Test funktionsfähig bleiben. Noch eine andere Funktion der Leber im intakten Organismus ist wichtig, um die Problemstellung in Hepatozyten-Kulturen zu verstehen. Das Organ dient als ausgleichendes Reservoir und als Regulator von Stoffwechselfvorgängen. Während einer Hungerperiode werden z.B. gespeicherte Stoffe (Glykogen-Glukose) für den Energie-Haushalt zur Verfügung gestellt. Dasselbe geschieht in vitro. Bei ungünstigen Bedingungen, z.B. während der Isolation der Leberzellen aus dem Tier oder unter den gewählten Kulturbedingungen in der Kulturschale, bauen die Leberzellen ihren Zellinhalt, besonders rasch die fremdstoffmetabolisierenden Enzyme, ab. Diese Enzyme sind für das Überleben der Leberzellen nicht notwendig und werden deshalb von den Zellen als interne Proteinquelle benutzt. Durch das Beschichten der Kulturschalen mit Komponenten der extrazellulären Zellwand (Matrix) (z.B. Collagen, Laminin, Fibronectin, Gelatine) oder durch die Zugabe von Hormonen und membranstabilisierenden Substanzen, kann dieser Abbau teilweise verlangsamt werden.

Der Sauerstoffgehalt in vitro

Der Sauerstoffgehalt in den verschiedenen Geweben der lebenden Ratte und auch des Menschen ist viel tiefer als im Medium von Kulturen, welche in einer CO_2 /Luft-Atmosphäre kultiviert werden (in einer herkömmlichen Kulturschale pegelt sich der O_2 -Gehalt auf 18%–20% ein). In vivo, in weniger gut durchbluteten Geweben sinkt der O_2 -Gehalt auf 4–5%. In eigenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass frisch isolierte Bindegewebszellen in Kulturen mit Gewebe-Sauerstoffgehalt (5% O_2 im Inkubator) länger am Leben bleiben als bei Standardbedingungen (Maier et al. 1982). Die fibroblastenartigen Zellen vermögen auch das Wachstum der Tumorzellen bei 5% O_2 besser zu stimulieren als bei Standardkulturbedingungen (Holzer et al. 1986). Der Sauerstoffgehalt modifiziert auch den Fremdstoff-Metabolismus. Die Rate von chemisch induzierbaren Gen-Mutationen mit zwei ausgewählten Chemikalien entsprach den Ergebnissen in vivo, wenn die Zellen bei 5% nicht aber bei Standardbedingungen (19% O_2) exponiert wurden (Maier et al. 1987).

Die Ergebnisse veranlassten uns, den Einfluss des Sauerstoffgehaltes in Hepatozyten-Kulturen zu untersuchen. In Toxizitätsprüfungen an der Ratte wird in der Leber, innerhalb der Leberläppchen, oft eine auf bestimmte Regionen begrenzte toxische Wirkung beobachtet. Es wird vermutet, dass für diese metabolische Zonierung in der Leber (Bengtsson et al. 1981, Gumucio and Miller 1981, Katz et al. 1983) der Sauerstoffgehalt besonders wichtig ist (Jungermann und Katz 1982, Wölfe und Jungermann, 1985). Im Räume zwischen den Leberläppchen (periportal Bereich), wird ein Sauerstoffgehalt von 11–13%, im Zentrum des Läppchen (perivenöser Bereich) von ca. 4%–6% gemessen. Damit ein *in vitro*-Test mit Hepatozyten ein zuverlässiges Ergebnis liefert, sollten Prüfsubstanzen unter Sauerstoffbedingungen getestet werden, wie sie im intakten Organismus vorkommen, damit die zonenspezifischen Reaktionen (Massey und Butler 1979, Tulp et al. 1978) auch *in vitro* ablaufen können. Allzu leicht könnte sonst die Toxizität einer Substanz nicht erkannt werden (Costa et al. 1989).

Die frisch isolierten Hepatozyten wurden deshalb in einer Inkubator-Atmosphäre mit einem O_2 -Gehalt von 4% oder 13% O_2 kultiviert. Bei 4% O_2 lösten sich die Strukturen des Zellkerns innert 24–48 Stunden auf, der zelluläre Proteingehalt hingegen blieb erhalten. Offenbar setzten die Hepatozyten unter hypoxischen Bedingungen Enzyme frei (Endonukleasen), welche bevorzugt den Zellkern abbauen (Mc Conkey et al. 1988). Ähnliche Vorgänge werden auch *in vivo* beim kontrollierten Absterben der Zellen (Apoptosis) beobachtet (Bursch et al. 1984). Messungen ergaben, dass im Kulturmedium der effektive Sauerstoffgehalt nur 1–2% betrug. Das Kulturmedium und die herkömmlichen Plastik-Kulturschalen wirkten als Diffusionssperre. Dies führte bei den metabolisch aktiven Hepatozyten, abhängig von der Zelldichte, zu einer Verknappung des Sauerstoffs in der Kulturflüssigkeit. Gelöst werden konnte das Problem durch die Verwendung von Kulturschalen mit gasdurchlässigen Teflonmembranen. In solchen Schalen wird der Sauerstoffgehalt entsprechend der gewählten Inkubator-Atmosphäre, unabhängig von der momentanen Anzahl der Zellen in der Schale, konstant gehalten. Die Hepatozyten bleiben bei perivenösem (4% O_2) oder periportalem (13% O_2) Sauerstoffgehalt am Leben. Bei 4% O_2 , im Gegensatz zu 13%, scheint es, dass die zellulären Alterungsvorgänge verzögert, die regenerierenden Prozesse (Zellteilung) stimuliert und der Proteingehalt der Hepatozyten besser erhalten werden (Holzer und Maier, 1987a). Weil offensichtlich der Sauerstoffgehalt das metabolische Verhalten der Hepatozyten in Kultur beeinflusst, sind entsprechend auch Unterschiede in der Reaktion gegenüber von Prüfsubstanzen voraussehbar. Diese Untersuchungen wurden aber vorerst aufgeschoben, denn auch das reduzierte Sauerstoffangebot vermochte die fremdstoffmetabolisierenden Enzyme nicht zu stabilisieren.

Einzelzell-Analyse in Hepatozyten-Kulturen

Zelluläre Inhaltsstoffe in einzelnen Zellen können mit Hilfe der Durchflusszytometrie erfasst werden. In der Arbeitsgruppe wurde die simultane Messung des Protein- und DNS-Gehaltes in kultivierten Zellen mit Hilfe eines Durchfluss-Zytophotometers weiter entwickelt (Maier und Schawalder 1986). In den Untersuchungen mit Leberzellen, wurden die Hepatozyten unmittelbar nach der Leberperfusion, nach 1, 4 und 7 Tagen in Kultur abgelöst, mit zwei Fluorochromen gefärbt und analysiert. Die DNS-Messungen berücksichtigen Wachstumsvorgänge und Veränderungen im Anteil der Zellen mit verdoppeltem Chromosomensatz (2C-, 4C- und 8C-Hepatozyten). Die Proteinmessung kann zur Bestimmung von hypertrophen Reaktionen benutzt werden.

Die nach der Perfusion frisch isolierten Hepatozyten aus 180–240 g schweren Ratten setzten sich aus 9–21% 2C-Zellen, 70–85% 4C-Zellen und 4–10% 8C-Zellen zusammen. Die Variabilität der DNS-Gehalte ist abhängig von der Vitalität der frisch isolierten Zellen. Die Proteinmessungen zeigten, dass die 4C-Zellen aus zwei Subpopulationen mit unterschiedlichem Proteingehalt zusammengesetzt sind (Holzer und Maier 1987b). Mit zunehmender Kulturdauer reduzierte sich der zelluläre Proteingehalt und die Streuung nahm in den 2C- und in den 4C-Zellen zu. Am 7. Tag in Kultur entsprach der Proteingehalt nur noch ca. 30% des Wertes von frisch isolierten Zellen. Die relativen Anteile der Ploidieklassen wurden im Verlaufe der Kultur nicht wesentlich beeinflusst. In der 4C-Zellpopulation war innert 24 Stunden nur noch eine einzige Zellpopulation zu erkennen. Die Zweiparametermessung (DNS und Protein) erwies sich als geeignete Methode, um Veränderungen in der Zusammensetzung der Zellen zu erkennen.

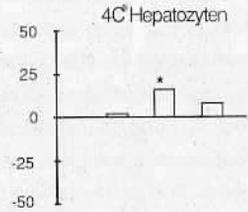
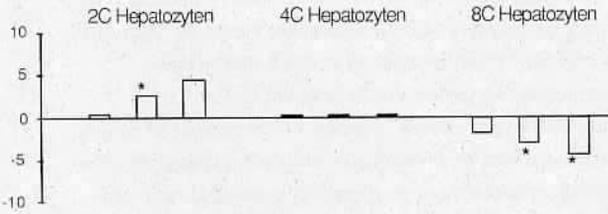
Abbildung 1

Relative Veränderungen der Ploidieklassen in Hepatozyten-Kulturen gemessen nach 1 Tag, 4 und 7 Tagen in Kultur. Die Hepatozyten wurden in einer Inkubator-Atmosphäre von 4% O₂ kultiviert oder in einem Medium mit 10% fötalem Kälberserum, mit 3mM Phenobarbital oder 2% (V/V) des Lösungsvermittlers Dimethylsulfoxid. Die Veränderungen beziehen sich auf Kulturen welche von derselben Rattenleber hergestellt und serumfrei, bei 13% O₂ inkubiert wurden.

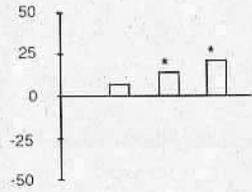
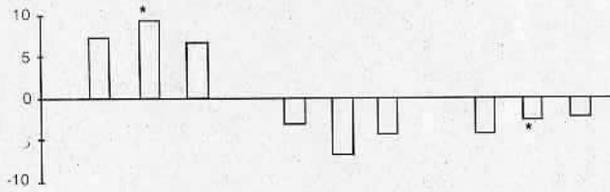
Ploidie Klassen der Hepatozyten (Abb. 1)

Protein - Gehalt

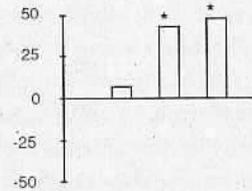
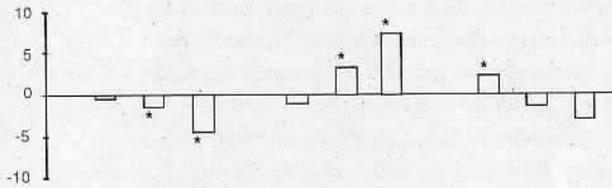
4% O₂



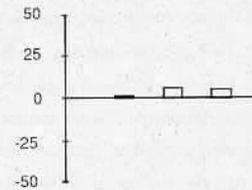
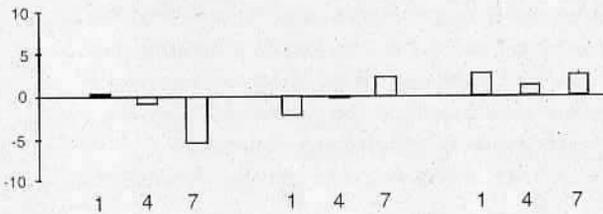
10% Fötale Kälber - Serum



3 mM Phenobarbital



2% Dimethylsulfoxid



Tage in Kultur

* = sign. verschieden (Paardifferenzen t-Test $p < 0.05$)

Eine Vervielfachung des DNS-Gehaltes (Verschiebung von 2C-, zu 4C- und 8C- Zellen) wird bei der Ratte mit zunehmendem Alter (James 1979) und nach der Behandlung mit karzinogenen Substanz beobachtet (Schwarze et al. 1986). Deshalb wurde untersucht, ob in vitro die Umwandlung von 2C-Hepatozyten zu 4C- und 8C-Zellen durch Zusätze im Medium und durch veränderte Kulturbedingungen beeinflusst werden kann. Der reduzierte Sauerstoffgehalt (4% O₂) stabilisierte die Ploidisierungsrate in den kultivierten Hepatozyten auf dem Niveau einer jungen Ratte, und der Lösungsvermittler Dimethylsulfoxid auf dem Zustand einer älteren Ratte. Fötales Kälberserum mit seinen Wachstumsfaktoren induzierte Veränderungen im Ploidiegrad, wie sie bei regenerierenden Lebern (Akkumulation von 2C-Zellen) zu beobachten sind, und Phenobarbital, ein Leber Tumor-Promotor, arretierte die Hepatozyten im 4C-Stadium (Holzer und Maier 1987b; Maier 1988) (Abb. 1). Gegenwärtig wird untersucht, ob mit dieser Methode Fremdstoffe identifiziert werden können, welche die Differenzierung von Hepatozyten stören.

Langzeit Hepatozyten-Kulturen

In herkömmlichen Hepatozyten-Kulturen behalten die Zellen für mindestens 24 Stunden nach der Isolation ihre metabolische Kapazität. Während dieser Zeitspanne können Versuche durchgeführt werden, welche recht gut die Verhältnisse in vivo simulieren. Die Brauchbarkeit von Hepatozyten-Kulturen muss für die verschiedenen Anwendungen differenziert beurteilt werden. Hepatozyten-Kulturen werden erfolgreich in der Arzneimittel-Entwicklung für das Suchen (Screening) nach geeigneten Wirkstoffen, für die Abklärung der genotoxischen Wirkung und für die Abklärung von Mechanismen, welche den toxischen oder pharmakologischen Wirkungen zu Grunde liegen, verwendet. Im zuletzt genannten Anwendungsbereich handelt es sich oft um zusätzliche Untersuchungen und nicht um einen Ersatz für routinemässig durchgeführte Tierversuche.

Im intakten Organismus, wird die Funktionen eines Organs oft durch bleibende induzierte bleibende Veränderungen in den überlebenden Zellen beeinträchtigt. Entsprechend, wenn in vitro solche Schädigungen erkannt werden sollen oder wenn sich die Schädigung erst nach einer gewissen Latenz-Zeit nach der Behandlung einstellt (mutagene, karzinogene Veränderungen), oder wenn der Einfluss einer längerdauernden Behandlung untersucht werden soll (Modifikation der Zell- und Gewebe-Differenzierung), dann müssen Langzeit-Kulturen verwendet werden. Dabei sollten die Zellen zumindest für einige Tage



in ihrem ursprünglichen Zustand (wie in der Leber) erhalten bleiben. Subletale Veränderungen in den Einzelzellen werden mit Dosierungen induzierbar sein, wie sie im intakten Organismus tatsächlich auftreten. Die zu beobachtenden Veränderungen in Langzeit-Kulturen sind somit eher vergleichbar mit Schädigungen, wie sie im Tierversuch auftreten.

Langzeitkulturen mit Hilfe von Hepatozyten-Kokulturen

In einem intakten Organismus wird die Homöostase innerhalb eines Gewebes, unter anderem durch das Zusammenwirken verschiedener Zelltypen, kontrolliert. Die Beeinflussung von Differenzierungsvorgängen in epithelialen Zellen durch Bindegewebszellen während der Embryogenese ist gut dokumentiert (Agarwal, 1974). In vitro differenzieren sich Mastzellen nur, wenn sie zusammen mit Bindegewebszellen kultiviert werden (Ginsburg et al. 1982). Makrophagen geben Substanzen in ihre Umgebung ab, welche den Kollagen- und Proteoglykan-Abbau in den kokultivierten Bindegewebszellen stimulieren (Laub et al. 1982). In Kokultur mit frisch isolierten Hepatozyten vermögen spezielle, aus der Leber von jungen Ratten isolierte epitheliale Zellen aus den Gallengängen, welche in vitro kultivierbar sind, die metabolischen Eigenschaften der Hepatozyten über Tage und Wochen zu stabilisieren (Begue et al. 1984, Guguen-Guillouzo et al. 1983a,b). Diese Helferzellen zeigten eine organspezifische aber keine spezies-spezifische Helferaktivität. Das Prinzip der Kokultur könnte einen grundsätzlich neuen Weg aufzeigen zur Herstellung von Hepatozyten Langzeitkulturen. Die heterotypische Zell-Zell-Interaktion könnte allgemein zur Stabilisierung der fremdstoffmetabolisierenden Enzyme in Zellkulturen beitragen. Die daraus resultierenden Testsysteme würden den Anforderungen der Toxikologen besser genügen.

In unseren Labors wurden mit drei verschiedenen Methoden (differentielle Zentrifugation, Gegenfluss-Zentrifugation, differentielle Trypsin-Technik) epitheliale Helferzellen aus der Leber von 10 Tage alten Ratten isoliert. Es gelang, einzelne Zellen in Kultur klonal auszuwachsen zu lassen, zu isolieren und zu kultivieren. Auf Grund von morphologischen Kriterien durfte angenommen werden, dass es sich um die in der Literatur beschriebenen Helferzellen handelte (Guguen-Guillouzo et al. 1983a,b). Die Funktionsfähigkeit der Helferzellen kann aber erst in Kokultur mit Hepatozyten untersucht werden (d.h. nach 8-10 Wochen, wenn sich die Zellen genügend vermehrt haben). Die Helferzellen können, auf Grund ihres niedrigeren Proteingehaltes, mit Hilfe der Durchfluss-Zytometrie gut von 2C-Hepatozyten unterschieden werden.

Eine der ausgewählten Linien der Helferzellen zeichnete sich durch ein gutes Wachstum aus. 10^7 – 10^8 Zellen wurden jeweils auf den Zeitpunkt einer Leberperfusion hin gezüchtet. In Kokultur mit den Hepatozyten stabilisierten diese Zellen die zellulären Strukturen in den Hepatozyten und reduzierten die Anzahl der absterbenden Leberzellen drastisch (Abb. 2). Eine Analyse mit der Durchfluss-Zytometrie war nicht möglich, weil es nicht gelang, die Helferzellen von den Leberzellen vollständig und intakt zu separieren. Offenbar synthetisieren die Zellen neue Skelettproteine, welche durch die heute verfügbaren Enzyme nicht ohne Zellschädigung auflösbar sind. Zusätzliche Protease-Kombinationen werden gegenwärtig geprüft.

Nicht nur die Strukturen der Leberzellen waren in den Kokulturen besser erhalten. Auch intrazelluläre Enzyme und das Auftreten von extrazellulären Enzymen (Lactat-

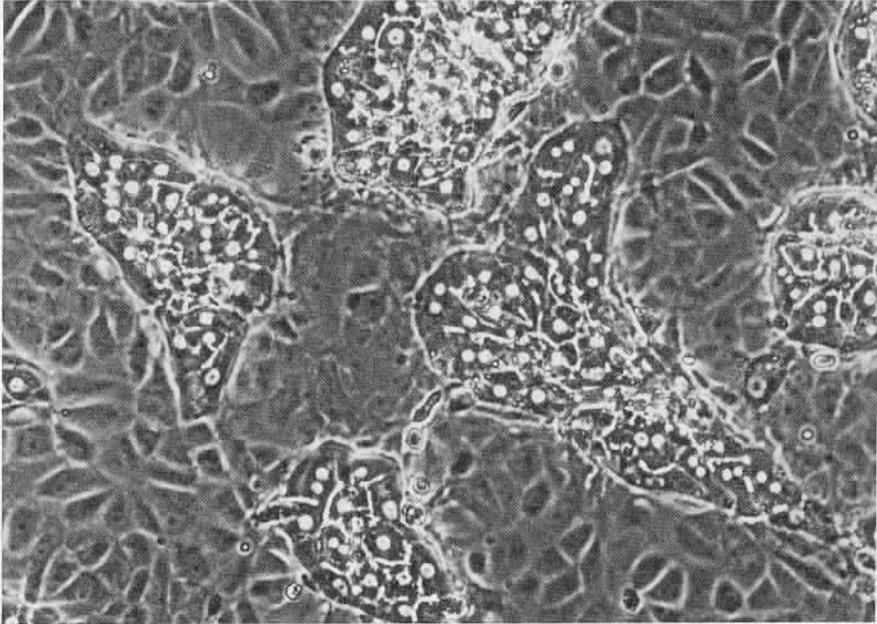


Abbildung 2

Kokulturen zwischen Hepatozyten und Helferzellen. Die frisch isolierten Hepatozyten bilden Inseln innerhalb der nachträglich zugegebenen in vitro kultivierbaren epithelialen Helferzellen. Diese Helferzellen vermögen die Funktion und Struktur der Leberzellen über Tage zu stabilisieren.

Dehydrogenase-Aktivität) und der Protein-Gehalt der Zellen wurden stabilisiert (Baitella et al. 1988). Mit einer verfeinerten Methode wurden auch leberspezifische, Cytochrome P-450 abhängige Enzym-Reaktionen (Aldrin-Epoxidase; Wolff et al. 1980) gemessen. Diese Reaktion findet nur in den Leberzellen, nicht aber in den Helferzellen statt. Aus den Ergebnissen lernten wir, dass diese leberspezifischen Enzyme in vitro besonders rasch abgebaut werden und, dass die enzymatische Aktivität der Aldrin-Epoxidase als sensitiver Indikator für den xenobiotischen Stoffwechsel verwendet werden kann (Baitella et al. 1989). Es gelang, die Aktivität der Enzyme auf ca. 40% des ursprünglichen Gehaltes in vivo zu stabilisieren, eine Aktivität, welche für die Substanzenprüfung ausreichen dürfte.

Die Evaluation des Test-Systems wird wiederum mit Unterstützung des Schweizerischen Nationalfonds in den Jahren 89-91 durchgeführt. Dabei handelt es sich um arbeitsintensive Untersuchungen. Nebst der Leber-Perfusion, müssen die Helferzell-Kulturen etabliert werden. Für jede Substanz muss eine Dosis-Effekt-Beziehung (3 Dosierungen + Kontrolle) ermittelt werden. Pro Kulturbedingung, Dosis und Versuch sind mindestens zwei Kulturschalen anzusetzen. Die Exposition sollte bei 13% und 4% O₂ erfolgen. Das Medium muss täglich ausgewechselt werden, auch über die Wochenenden. Die Analysen (Aldrin-Epoxidation, Lactat-Dehydrogenase, Protein) werden 3 Tage nach der Applikation (5. Tag in Kultur) und bei Kokulturen zusätzlich 7 Tage oder 2-3 Wochen später durchgeführt. Modell-Chemikalien werden geprüft, von denen eine spezifische periportale oder perivenöse Aktivität in vivo bekannt ist und Chemikalien, welche das Wachstum oder die Differenzierung von Leberzellen stören.

Die Zuverlässigkeit von Hepatozyten-Kulturen wird oft angezweifelt, weil die Ergebnisse von Labor zu Labor variieren. In Tat und Wahrheit ist es die natürliche Anpassungsfähigkeit der Hepatozyten auf Unterschiede in der Zusammensetzung der Kulturmedien und der Matrix in den Kulturschalen. Viele Fragen bleiben noch offen und bedürfen einer Abklärung. Wird z.B. die Interaktion zwischen den Helferzellen und den Hepatozyten durch den Sauerstoffgehalt beeinflusst? Existieren Unterschiede in der Helferfunktion zwischen verschiedenen Zell-Linien? Kann das Kokultur-System durch ein einfacheres Vorgehen ersetzt werden, z.B. durch Zugabe von Radikalfängern, von membranstabilisierenden Agenzien (Isom et al. 1985; Miyazaki et al. 1985) oder von spezifischen Matrix-Komponenten?

Mit einer entsprechenden finanziellen Unterstützung der Forschungsarbeiten wird es möglich sein, Antworten zu erhalten und in vitro Test-Systeme mit Hepatozyten zu entwickeln, mit denen zuverlässige und in den verschiedenen Labors reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden können.



Literatur

- Agarwal M.K. (1974) Intercellular interactions in eukaryotic homeostasis, *Differentiation* 2, 371-380.
- Baitella, G., Gantner, D. and Maier P. (1989) Protein content, LDH-activity and aldrin epoxidase activity are selectively stabilized in cocultures of freshly isolated rat hepatocytes with rat liver epithelial cells, submitted.
- Baitella, G., Gantner, D. and Maier P. (1988) Metabolic function of primary rat hepatocytes in longterm cultures: Comparison between pure culture and coculture with rat liver epithelial cells, *Experientia* 44, A44.
- Begue J.M., C. Guguen-Guillouzo, N. Padeloup and A. Guillouzo, (1984) Prolonged maintenance of active cytochrome P-450 in adult rat hepatocytes co-cultured with another liver cell type, *Hepatology* 4/5, 839-842.
- Bengtsson B.G., K.H. Kiessling, A. Smith-Kielland and J. Morland (1981) Partial separation and biochemical characteristics of periportal and perivenous hepatocytes from rat liver, *Eur. J. Biochem.* 118, 591-597.
- Bursch W., B. Lauer, I. Timmermann-Trosiener, G. Bartel and R. Schulte-Hermann (1984) Controlled death (apoptosis) of normal and putative preneoplastic cells in rat liver following withdrawal of tumour promoters. *Carcinogenesis* 5, 453-458.
- Costa, A.K., M.A. Baker, J.M. Brown and J.R. Trudell (1989) In vitro hepatotoxicity of SR 4233 (3-amino-1,2,4-benzotriazine-1,4-dioxide), a hypoxic cytotoxin and potential antitumor agent, *Cancer Res.* 49, 925-929.
- Ginsburg H., D. Ben-Shahar and E. Ben-David (1982) Mast cell growth on fibroblast monolayers: Two cell entities, *Immunobiology* 45, 371-380.
- Guguen-Guillouzo, C., B.Clement, G. Buffet, C. Beaumont, E. Morel-Chony, D. Glaise and A. Guillouzo (1983 a) Maintenance and reversibility of active albumin secretion by adult rat hepatocytes co-cultured with another liver epithelial cell type, *Experimental Cell Research* 143, 47-54.
- Guguen-Guillouzo C. and A. Guillouzo (1983 b) Modulation of functional activities in cultured-rat hepatocytes, *Molecular and Cellular Biochemistry* 53/54, 35-56.
- Gumucio J.J. and D. L. Miller (1981) Functional implication of liver cell heterogeneity, *Gastroenterology* 80, 393-403.
- Holzer C., P. Maier and G. Zbinden (1986) Comparison of exogenous growth stimuli for chemically transformed cells: Growth factors, serum and cocultures, *Experimental Cell Biology*, 54, 237-244.
- Holzer C. and P. Maier (1987a) Maintenance of periportal and perocentral oxygen tension in primary hepatocyte cultures: Influence on cellular DNA and protein content monitored by flow cytometry. *J. of Cellular Physiology*, 133, 297-304.
- Holzer C. and P. Maier (1987b) DNA and Protein contents of hepatocytes in primary cultures monitored by flow cytometry: Effect of phenobarbital and dimethylsulfoxide, *Toxic. in Vitro*, 1, 203-213.



- Isom H.C., Secott T. Georgoff I. Woodworth C. and Mummaw J. (1985), Maintenance of differentiated rat hepatocytes in primary culture, Proc. Natl. Acad. Sci. 82, 3252-3256.
- James, J. Tas, J., Bosch, K.S., de Meere, A.J.P., and Schuyt, H.C. (1979) Growth pattern of rat hepatocytes during postnatal development, Eur. J. Cell Biol., 19: 222-226.
- Jungermann K. and N. Katz (1982) Functional hepatocellular heterogeneity, Hepatology 2/3, 385-395.
- Katz N.R., Fischer W. and S. Griffhörn (1983) Distribution of enzymes of fatty acid and ketone body metabolism in periportal and perivenous rat-liver tissue, Eur. J. Biochem. 135, 103-107.
- Laub, R., G. Huybrechts-Godin, C. Peeters-Joris and G. Vaes, (1982) Degradation of collagen and proteoglycan by macrophages and fibroblasts, Biochimica et Biophysica Acta 721, 425-433.
- Maier P., B. Weibel and G. Zbinden (1982) Influence of pO₂ on primary cultures of cells derived from granulation tissue of rats, (Abstract) Experientia, 38/6, 745.
- Maier P. and H.P. Schawaldler (1986) A two parameter flow cytometry protocol for the detection and characterization of the clastogenic, cytostatic and cytotoxic activity of chemicals, Mutation Res. 164, 369-379.
- Maier P., H.P. Schawaldler, B. Weibel (1987) Low oxygen tension, as found in tissues in vivo, alters the mutagenic activity of aristolochic acid I and II in primary fibroblast like rat cells in vitro, Environment. and Molec. Mutag. 10, in press
- Maier P., (1988) Development of in vitro toxicity tests with cultures of freshly isolated rat hepatocytes, Experientia 44, 807-817.
- Mc Conkey, D.J., Hartzell P., Nicotera, P. Wyllie A.H. and Orrenius S. (1988) Stimulation of endogenous endonuclease activity in hepatocytes exposed to oxidative stress, Toxicology Letters 42, 123-130.
- Massey E.D. and W.H. Butler (1979) Zonal changes in the rat liver after chronic administration of phenobarbitone: An ultrastructural, morphometric and biochemical correlation, Chem.- Biol. Interactions, 24, 329- 344.
- Miyazaki M., Y. Handa, M. Oda, T. Yabe, K. Miyano and J. Sato (1985) Long term survival of functional hepatocytes from adult rat in the presence of phenobarbital in primary cultures, Experimental Cell res. 159, 176-190.
- Schwarze P. E., Pettersen E. O. and Seglen P.O. (1986) Characterization of hepatocytes from carcinogen-treated rats by two parameter flow cytometry, Carcinogenesis 7, 171-173.
- Tulp A., J.J.M.N. Welagen and J.G. Westra (1978) Binding of the chemical carcinogen N-hydroxy-acetyl-aminofluorene to ploidy classes of rat liver nuclei as separated by velocity sedimentation at unit gravity, Chem. Biol. Interaction, 23, 293-303.

Wölfle D. and K. Jungermann (1985) Long term effects of physiological oxygen concentrations on glycolysis and gluconeogenesis in hepatocyte cultures, Eur. J. Biochem. 151, 299– 303.

Wolff T., H. Greim, M. Huang, G.T. Miwa and Lu A.Y.H. (1980) Aldrin epoxidation catalyzed by purified rat liver cytochrome P-450 and P-448. High selectivity for cytochrome P-450, Eur. J. Biochem. 111, 545– 551.

...ERLAG ER DER LEBERZIRRHOSE FAST GLEICHZEITIG WIE SEINE HEPATOZYTENKULTUREN – NEBENBEI BEMERKT, EINE EINDRÜCKLICHE VALIDIERUNG SEINES IN-VITRO-MODELLS...

