Anwendung von Hepatozytenkulturen in der Toxikologie

Urs A. Boelsterli und **Willi Suter**
Abt. Klinische Pharmakologie,
Medizinische Klinik, Universitätsspital, 8091 Zürich, und
Sandoz AG, WSP Toxikologie, Division Pharma, 4002 Basel.

Zusammenfassung

Die Bedeutung von Hepatozytenkulturen als alternatives Testsystem in der experimentellen Toxikologie sowie in der Routine-Sicherheitsprüfung von chemischen Substanzen hat in den letzten Jahren stark an Bedeutung zugenommen. Praktische Anwendungsmöglichkeiten für die Zytotoxizitätsprüfung von chemischen Substanzen umfassen die Abklärung spezifischer zellulärer Mechanismen der Lebertoxizität, die vergleichende Prüfung von toxischen Effekten an Hepatozyten verschiedener Spezies einschliesslich des Menschen, und toxikologisches Screening von strukturanalogen Verbindungen. Im Bereich Genotoxizität werden Hepatozytenkulturen erfolgreich zum Nachweis von DNS-Schädigungen sowie als metabolisches System für in-vitro Genotoxizitätstests verwendet.

Mit diesen Techniken können gezielte Einzelinformationen rasch gewonnen werden, die teilweise denjenigen von in-vivo Versuchen gleichwertig sind oder sogar im Tierversuch nicht erreicht werden können (menschliche Hepatozyten). Für eine optimale Beurteilung der Hepatotoxizität chemischer Substanzen beim Menschen sollten Hepatozytenkulturen derzeit nur komplementär zum Tierversuch eingesetzt werden.

Summary: Use of hepatocyte cultures in toxicology

The significance of hepatocyte cultures as an alternative to animal tests in experimental toxicology and routine safety assessment of drugs and chemicals has increased during the past years. Practical applications for cytotoxicity testing of compounds range from the analysis of specific cellular mechanisms of toxicity to the determination of species differences (including man) for a given endpoint, and the screening of structural analogs. Hepatocyte cultures have been successfully used to assess genotoxicity by demonstrating various types of DNA damage. They are also used as a metabolic system for different genotoxicity assays. Using these techniques, specific information can be obtained which may be equivalent

or even superior (e.g. when using human hepatocytes) to the answers provided by in vivo experiments. However, hepatocyte cultures should only be used as a complementary method in combination with animal experiments in order to optimally predict the hepatotoxic potential of drugs and chemicals in man.

1. Einleitung

Kultivierte Leberparenchymzellen (Hepatozyten) werden schon seit längerer Zeit als in vitro Modelle eingesetzt, um die komplexen zellbiologischen und biochemischen Funktionen der Leber besser zu verstehen und die toxischen Effekte von chemischen Substanzen und Arzneimitteln auf hepatozelluläre Funktionen zu definieren. Auch die chemisch-pharmazeutische Industrie ist daran interessiert, vermehrt Hepatozytenkulturen einzusetzen. Dabei stehen neben der allgemein geforderten und notwendigen Reduktion von Versuchstieren auch allgemein bekannte Vorteile von Zellkultursystemen im Vordergrund: genauer definierte experimentelle Bedingungen und grössere Effizienz bezüglich Zeit und Testsubstanzmengen.

Hepatozyten werden im narkotisierten Tier durch Perfusion der Leber mit einer kollagenasehaltigen Lösung, die die interzellulären Adhäsionen lösen, gewonnen, in speziell beschichteten Plastik-Kulturschalen ausgesät und in spezifischen Kulturmedien gezüchtet. Zu testende Substanzen werden zu verschiedenen Zeiten und in verschiedenen Konzentrationen den Zellkulturmedien zugesetzt. Dabei können chemische Umwandlungsschritte (Metabolismus) von Substanzen durch die Leberzellen charakterisiert und das qualitative und quantitative Muster der in-vitro neugebildeten Metaboliten verfolgt werden (siehe Beitrag von F. Wiebel, dieses Heft).

In diesem Beitrag sind zwei andere Anwendungsgebiete von Hepatozytenkulturen in der Toxikologie dargestellt: das Erkennen von potentiell toxischen Effekten auf die Leberzellstruktur und -funktion (Zytotoxizität) und auf die Erbsubstanz (Genotoxizität).

2. Hepatozytotoxizität

Zytotoxische Effekte von chemischen Substanzen auf Leberzellen manifestieren sich nicht nur in irreversiblen morphologischen (ultrastrukturellen) Zellveränderungen, sondern auch in funktionellen Störungen, die nach Absetzen der Exposition mit lebertoxischen Substanzen reversibel sind. Darunter fallen qualitative und quantitative Veränderungen leberspezifischer Prozesse, wie z.B. Störungen der Biosynthese von Albumin oder von Harnstoff, Beeinträchtigung der Synthese und Sekretion von Lipoproteinen, und die Hemmung leberspezifischer Transportfunktionen (z.B. Aufnahme, transzellulärer Transport und biliäre Ausscheidung von Gallensäuren und Bilirubin). Es können auch Effekte von Substanzen auf intrazelluläre Schlüssel-Enzyme oder auf Substrate erfasst werden, mit denen mögliche Zielorganellen (Zellmembran, endoplasmatisches Retikulum, Mitochondrien, u.a.) als Ort der toxischen Wirkung von Substanzen erkannt werden können. Innerhalb der Palette von verschiedenen Testparametern sind v.a. diejenigen wertvoll und aussagekräftig, die eine gewisse Korrelation zur in-vivo Situation zulassen (z.B. erhöhte Serumspiegel leberspezifischer Enzyme, Leberzellverfettung oder Hemmung der Gallensäureausscheidung und des Galleflusses).

2.1. Anwendungsgebiete

Aufgrund der definierten Bedingungen von in-vitro Systemen eignen sich Primärkulturen von Hepatozyten in der experimentellen Toxikologie vor allem 1. zur Abklärung spezifischer zellulärer Mechanismen der Hepatotoxizität, die am Ganztier sehr schwierig zu erfassen sind; 2. zum Vergleich der Hepatotoxizität von Substanzen in verschiedenen Spezies einschliesslich des Menschen; und 3 für ein rasches und effizientes toxikologisches Screening (Vortesten) von neuen Substanzen. Eine rasche Information über mögliche hepatotoxische Effekte von neuen, teilweise strukturanalogen chemischen Verbindungen ist besonders wichtig für die Erhöhung der Sicherheit neu entwickelter Arzneimittel in der Pharma-Industrie. Dazu müssen relevante und geeignete Testparameter zur Vergügung stehen. Für jedes dieser Anwendungsgebiete wird im folgenden ein Beispiel angeführt.

2.2. Aufklärung hepatotoxischer Wirkmechanismen

Beispiel: Histamin H2-Rezeptor-Antagonisten

Histamin H2-Rezeptor-Antagonisten (z.B. Cimetidin, Ranitidin) werden erfolgreich zur Behandlung von Magengeschwüren eingesetzt. Während der klinischen Prüfung eines weiteren, strukturanalogen H2-Antagonisten (Oxmetidin) in den USA wurde festgestellt, dass einige Patienten während der Behandlung mit Oxmetidin erhöhte Serum-Transaminasen-Werte aufwiesen, was auf eine Schädigung der Leberzellen hindeutete. Auf der Suche nach Erklärungsmöglichkeiten und zur Aufdeckung des zellulären Mechanismus der Hepatotoxizität von Oxmetidin wurden auch Studien in Hepatozytenkulturen durchgeführt. Es konnte dabei gezeigt werden, dass Oxmetidin in-vitro konzentrationsabhängig die Freisetzung zellulärer Enzyme (z.B. Laktatdehydrogenase, LDH) ins Kulturmedium induziert und die Eiweiss-Synthese hemmt (1). Das Ausmass dieser Wirkungen von Oxmetidin konnte durch Vorbehandlung der Ratten mit den Arzneimittelmetabolismus induzierenden Substanzen (z.B. Phenobarbital) nicht verstärkt werden. Dies weist darauf hin, dass für die beobachtete hepatotoxische Wirkung die Ausgangssubstanz Oxmetidin selbst und nicht seine intrazellulär gebildeten Metaboliten verantwortlich sind. Weitere Abklärungen ergaben, dass Oxmetidin die zelluläre Atmung (Sauerstoffverbrauch) beeinträchtigt und die zellulären Energiereserven (ATP) vermindert. Der Mechanismus der Oxmetidin-induzierten Leberzellschädigung scheint also auf einer direkten Schädigung der inneren Mitochondrienmembran der Hepatozyten zu beruhen (2). Diese Befunde führten schliesslich dazu, dass die weitere Entwicklung von Oxmetidin eingestellt wurde.

2.3. Speziesunterschiede in der hepatotoxischen Wirkung von Arzneimitteln

Beispiel: Paracetamol

Paracetamol (Acetaminophen) ist ein wirksames und relativ harmloses Schmerzmittel, das nur in sehr hohen Dosen zu einer akuten und chronischen Schädigung der Leber führt. Es ist bekannt, dass verschiedene Tierspezies unterschiedlich

sensitiv auf gleiche Paracetamoldosen pro kg Körpergewicht reagieren und einen stark unterschiedlichen Grad von Paracetamol-induzierter Lebertoxizität aufweisen. Während beispielsweise der Hamster sehr empfindlich auf Paracetamol reagiert, sind Ratte, Kaninchen oder Hund relativ resistent. Um nun das geeignete Modell für in-vitro-Toxizitätsstudien von Paracetamol zu finden, und um die Notwendigkeit von risikoreichen Extrapolationsschritten zu minimieren, wurden vergleichende Experimente an isolierten Leberzellen verschiedener Spezies, inkl. des Menschen, durchgeführt. Bei diesen Studien (3)(4) wurde eine überraschend gute Uebereinstimmung zwischen den in-vitro Befunden und den bekannten in vivo Daten gefunden. Leberzellen von Hamster und Maus wurden bei deutlich geringeren Paracetamolkonzentrationen geschädigt (Freisetzung von Enzymen aus den Zellen, Zelltod) als Leberzellen von Ratte, Kaninchen oder Hund. Die Ursache für die zellschädigende Wirkung von Paracetamol liegt in der Bildung von reaktiven Metaboliten. Diese Umwandlung von Paracetamol und die leberschädigende Wirkung der gebildeten reaktiven Metabolite erfolgt bei allen Tierspezies qualitativ gleich (4). Wieso aber reagieren dann verschiedene Tierarten bezüglich Hepatotoxizität trotzdem unterschiedlich auf gleiche Paracetamol-Konzentrationen? Die Ursache dafür liegt in einer unterschiedlichen Umwandlungsrate (=pro Zeiteinheit gebildete Menge von reaktiven Metaboliten), die in Leberzellen von Hamster und Maus sehr hoch, in jenen von Ratte, Kaninchen und Hund jedoch viel geringer ist. Menschliche Hepatozyten verhalten sich gegenüber Paracetamol wie Rattenhepatozyten (4). Natürlich muss bei solchen Studien immer kontrolliert werden, inwieweit die kultivierten Leberzellen von verschiedenen Tierarten metabolisch noch kompetent sind, d.h. wie weit sie ihre Fähigkeiten, lipophile Substanzen umzuwandeln, durch die Zellisolation und Kulturbedingungen nicht verloren haben.

2.4. Toxikologisches Screening von neuen Arzneimitteln

Beispiel: Psychotrope Substanzen

Psychotrope Substanzen (Neuroleptica, Antidepressiva, u.a.) werden therapeutisch sehr häufig eingesetzt. Bei längerer Anwendung und bei Verabreichung hoher

Dosen dieser Arzneimittel (v.a. der "ersten Generation") kann es zu verschiedenen Nebenwirkungen kommen, zu denen auch Störungen der Leberfunktion zählen. In verschiedenen Studien (5-7) wurde das Zytotoxizitätspotential einer Reihe von klinisch häufig verwendeten psychotropen Substanzen in Rattenhepatozytenkulturen getestet. Dabei wurden die zelluläre Freisetzung zytoplasmatischer Enzyme, die Albuminproduktion und die Synthese und Sekretion von Lipoproteinen getestet. Die ultrastrukturelle Zellintegrität wurde licht- und elektronenmikroskopisch beurteilt. Von den untersuchten Substanzen war Chlorpromazin am stärksten hepatotoxisch, während z.B. Molindon, Sulpirid oder Amineptin eine nur geringe Wirkung hatten. Diese Befunde stimmen gut mit den klinischen Erfahrungen überein.

Es wäre wünschenswert, vermehrt in einem frühen Stadium der Entwicklung neuer psychotroper Substanzen ein toxikologisches Screening mittels Hepatozytenkulturen einzuführen, insbesondere weil relativ schwache Leberfunktionsstörungen in präklinischen in-vivo Studien nur schwer erfassbar sind. Bei diesen in-vitro Untersuchungen kann das Hepatotoxizitätspotential von bekannten und klinisch etablierten psychotropen Substanzen mit neuen, strukturverwandten Verbindungen verglichen werden. Stark toxische Verbindungen können dabei frühzeitig eliminiert und relativ nicht-toxische Substanzen für eine Weiterentwicklung selektioniert werden (8).

3. Genotoxizität

Je nach Untersuchungsmethode unterscheidet man dabei zwischen Genmutationen, Chromosomenmutationen und primären DNS- (Desoxiribonukleinsäure-) Schädigungen. Alle drei Klassen von Genotoxizität werden nicht nur als Hinweis auf eine mögliche Gefahr für die Nachkommen angesehen, sondern gelten auch als Indikator für die krebsauslösende Wirkung einer Substanz. Zur Erfassung der genotoxischen Wirkung werden heute vorwiegend in-vitro Methoden eingesetzt. Obwohl heute durchaus klar ist, dass nur ein Teil der krebserregenen Substanzen mit Untersuchungen zur Genotoxizität erfasst werden können, sind Genotoxizitätstests aus der Entwicklung von Medikamenten und anderen chemischen

Produkten nicht mehr wegzudenken.

Bei der Prüfung von Chemikalien im Tierversuch fällt auf, dass ein grosser Teil der substanzbedingten Tumoren in der Leber auftreten. Dies ist verständlich, wenn man bedenkt, dass viele Substanzen durch metabolische Aktivierung in der Leber zu reaktiven Zwischenprodukten umgebaut werden. Die teilweise kurzlebigen Zwischenprodukte reagieren dann mit Makromolekülen ihrer Umgebung, unter anderem mit dem Erbmaterial DNS. Es wurden deshalb schon vor einigen Jahren Methoden zur Untersuchung der Genotoxizität an Leberzellen entwickelt.

3.1. Messungen der DNS-Reparatur

Schäden in der DNS-Struktur werden durch verschiedene Enzymsysteme behoben, wobei meist ein kurzes Stück des beschädigten DNS-Stranges abgebaut und neu synthetisiert wird. Durch Zugabe eines geeigneten Markermoleküls, in den meisten Fällen 3H-Thymidin, kann die Neusynthese verfolgt und quantifiziert werden. Hepatozyten eignen sich besonders gut für derartige Untersuchungen, da sie sich in Kultur praktisch nicht teilen. Die in vereinzelten Zellen zu beobachtende DNS-Replikation lässt sich leicht von der DNS-Reparatur unterscheiden oder durch spezifische Hemmstoffe unterdrücken.

Für die routinemässige Prüfung von Substanzen hat sich insbesondere die von Williams (9) entwickelte autoradiographische Messung des Einbaus von Radioaktivität bewährt. Dabei werden Hepatozyten nach der Isolation in Schalen mit Deckgläschen gegeben und haften sich dort an. Anschliessend wird das Medium ausgetauscht und mit dem neuen Medium die Testsubstanz und 3H-Thymidin zugegeben. Nach einigen Stunden Behandlung werden die Zellen fixiert, gefärbt und mit einem für Tritium-Zerfall empfindlichen Film bedeckt. Nach einer Woche wird dieser Film entwickelt und der Einbau von 3H-Thymidin anhand der Anzahl der Silberkörner auf dem Film gemessen.

Eine zweite Methode zur Bestimmung der DNS-Reparatur ist die von Althaus (10) entwickelte Kern-Prozedur. Die Zellen werden dabei nach der Behandlung aufgebrochen und die DNS der Zellkerne isoliert. Die eingebaute Radioaktivität

wird mittels Szintillationsmessung gemessen. Vorteile der letztgenannten Methode sind der kleinere Zeitaufwand für die Durchführung des Experiments sowie die grosse Zahl der analysierten Zellen. Der Hauptnachteil der Kern-Prozedur ist die Notwendigkeit der Zugabe von Hydroxyharnstoff als Hemmstoff der DNS-Replikation. Während beim autoradiographischen Verfahren die wenigen DNS-replizierenden Kerne leicht erkannt und bei der Auswertung weggelassen werden können, würde bei der Szintillationsmessung ohne Zugabe von Hydroxyharnstoff der Einbau wegen der DNS-Replikation in unbehandelten Kulturen so hoch, dass die Methode zu unempfindlich wäre. Da Hydroxyharnstoff, der normalerweise verwendete Replikationshemmstoff, selbst leicht genotoxisch ist (11), können sich in Einzelfällen Interpretationsprobleme ergeben. Die autoradiographische Technik wurde in einer 218 Verbindungen umfassenden Studie validiert (12) und wird in vielen Industrielabors routinemässig zur Prüfung von Entwicklungspräparaten verwendet.

3.2. Weitere Methoden zur Messung von DNS-Schäden

DNS-Schädigung führt meist zu DNS-Strangbrüchen, entweder als direkte Folge der Substanzeinwirkung oder als Zwischenstufe des Reparaturprozesses. Diese Brüche lassen sich mittels Zentrifugation im alkalischen Saccharose-Gradienten oder mittels alkalischer Elution nachweisen. Beide Techniken lassen sich leicht zur Analyse der DNS von kultivierten Hepatozyten anwenden, wobei die Empfindlichkeit auf Grund der im Vergleich zu anderen Zelltypen hohen spontanen Bruchrate nicht sehr gross ist (13).

Da die Genotoxizität der chemischen Karzinogene auf kovalenter Bindung der Substanzen an die DNS beruht, bilden sich chemisch stabile Verbindungen zwischen Nukleotiden und Karzinogen, die sich chemisch oder immunologisch nachweisen lassen. Obwohl die meisten derartigen Studien am Ganztier durchgeführt wurden, zeigten die bisherigen Untersuchungen, dass problemlos auch mit Hepatozyten gearbeitet werden kann (13).

3.3. Hepatozyten als metabolisches System für Genotoxizitätstests

Die meisten für Genotoxizitäts-Untersuchungen verwendeten Zellen verfügen über kein den Hepatozyten vergleichbares metabolisches System. Die Routineuntersuchungen werden deshalb meist mit Zugabe eines S9 genannten Leberhomogenats durchgeführt. Obwohl damit in den meisten Fällen befriedigende Resultate erzielt werden, sind doch einige Fälle bekannt, wo die Verwendung des S9-Leberhomogenats falsche Resultate lieferte. So galt die krebsauslösende Substanz Procarbazin lange Zeit als nur in-vivo genotoxisch. In neueren Untersuchungen konnte aber gezeigt werden, dass bei Verwendung von Hepatozyten zur metabolischen Aktivierung Procarbazin sowohl in Bakterien (14) wie auch in V79 Chinesisch Hamster-Zellen (15) deutlich mutagen ist.

Da Hepatozyten im Gegensatz zum S9-Leberhomogenat auch über die in der Phase II der Biotransformation involvierten Enzymsysteme verfügen (siehe Beitrag von F. Wiebel, dieses Heft) und die räumliche Anordnung der Enzyme noch intakt ist, konnte in einigen Studien bei Verwendung von Hepatozyten eine bessere Korrelation zwischen Genotoxizität und Karzinogenität gezeigt werden als bei Verwendung von S9-Leberhomogenat. In einigen Untersuchungen wurde sogar eine dem Karzinogenese-Versuch vergleichbare Zell- respektive Gewebsspezifität gefunden: in Mischkulturen von Hepatozyten und Fibroblasten induzierte das Leberkarzinogen Dimethylnitrosamin hauptsächlich DNS-Reparatur in Hepatozyten. Behandlung mit Benz(a)pyren, das zwar karzinogen ist, aber keine Lebertumoren induziert, führte hauptsächlich zu DNS-Reparatur in den Fibroblasten.

3.4. Speziesunterschiede in der Empfindlichkeit gegenüber der genotoxischen Wirkung von Substanzen

Analog den Untersuchungen zur Zytotoxizität von Paracetamol (vergl.2.3.) wurde auch die Genotoxizität dieser Substanz an Hepatozyten von mehreren Arten untersucht. Analog den Speziesunterschieden in der Zytotoxizität induzierte Paracetamol eine DNS-Reparatur praktisch nur in den Hepatozyten der Maus, nicht aber in Leberzellen der Ratte (3).

3.5. Bedeutung der Resultate von Genotoxizitätstests

Genotoxizitäts-Untersuchungen an Hepatozyten werden in Industrielabors hauptsächlich aus drei verschiedenen Gründen durchgeführt:

1) Screening auf mögliche karzinogene Wirkung möglichst frühzeitig in der Produkteentwicklung. Wenn für eine Substanz ein DNS-schädigendes Potential gefunden wird, führt dies häufig zum Abbruch der Substanzentwicklung oder es sind zusätzliche Untersuchungen notwendig, um abzuklären, inwieweit die Resultate für den Menschen relevant sind.

2) Erfüllung von behördlichen Registrierungsauflagen (beispielsweise alle Länder in Europa und USA) für die Zulassung einer Substanz als Heilmittel.

3) Untersuchung von Wirkungsmechanismen.

Wird bei der routinemässigen Untersuchung einer Substanz ein mutagener oder karzinogener Effekt gefunden, wird häufig versucht, durch zusätzliche Experimente den Wirkungsmechanismus zu finden, um die Relevanz der Befunde für den Menschen besser abschätzen zu können. Wenn eine Verbindung in mehreren gut validierten Genotoxizitätstests, inklusive DNS-Reparatur-Untersuchungen, keine positiven Resultate liefert, kann mit grosser Sicherheit angenommen werden, dass für die Entstehung der Tumoren nicht primär Erbgutveränderungen verantwortlich sein können. Für nicht genotoxische Karzinogene kann häufig gezeigt werden, dass Tumoren nur bei Behandlung mit Dosen, die über der sogenannten Schwellendosis liegen, entstehen können. Im Gegensatz dazu wird für genotoxische Karzinogene im allgemeinen keine derartige Schwellendosis akzeptiert. Dazu kommt, dass für nicht-genotoxische Karzinogene vielfach auch Speziesspezifität gefunden wird, das heisst, es kann glaubhaft gezeigt werden, dass ein Befund, der beispielsweise an der Ratte erhoben wurde, beim Menschen nicht vorkommen kann. Wenn für eine karzinogene Substanz Genotoxizität ausgeschlossen werden kann, ist es deshalb durchaus möglich, dass sie für den Menschen harmlos ist. Genotoxizitäts-Untersuchungen helfen in solchen Fällen, die im Tierversuch erhobenen Befunde zu interpretieren.

3.6. Entwicklung neuer Methoden

Die Entwicklung von neuen Methoden zur Untersuchung der Genotoxizität in Hepatozyten läuft in zwei vollständig verschiedenen Richtungen:

1) Durch Verbesserung der Kulturmedien wird versucht, Hepatozyten in Kultur zur DNS-Replikation und Zellteilung zu bringen. Beschränkte Erfolge in dieser Richtung erlauben es, Schwesterchromatid-Austausch in Kulturen von frisch isolierten Hepatozyten zu messen (16). Es ist auch gelungen, aus Lebertumoren Zellinien zu isolieren, die im allgemeinen eine im Vergleich zu normalen Hepatozyten reduzierte, aber doch beachtliche metabolische Aktivität haben (17 und Beitrag Wiebel in diesem Heft).

2) Da Hepatozytenkulturen schon seit mehreren Jahren routinemässig zur Prüfung von Chemikalien eingesetzt werden, ist es nicht erstaunlich, dass einige Substanzen gefunden wurden, deren Genotoxizitätsdaten nicht mit den Befunden aus den Karzinogenese-Studien übereinstimmen. Durch Behandlung der Tiere mit den Testsubstanzen und nachfolgender Isolierung und in-vitro Inkubation der Hepatozyten mit radioaktiven Markern (sogenannte ex-vivo Versuche), kann in einigen Fällen eine bessere Uebereinstimmung zwischen Karzonogenität und Genotoxizität erzielt werden. So wurde für das Leberkarzinogen Dinitrotoluol gezeigt, dass die Substanz in ex-vivo Versuchen DNS-Reparatur induziert und dass dieser Effekt auf metabolischer Aktivierung durch die Darmflora beruht. Die negativen Ergebnisse in den Hepatozyten-Kulturen liessen sich mit diesen Untersuchungen vollständig erklären (18).

4. Schlussfolgerungen und Ausblick

Allgemein hat der Einsatz von in vitro Methoden zur Erfassung von Genotoxizität und Zytotoxizität dieses Forschungsgebiet innerhalb weniger Jahre von einem wenig beachteten Spezialgebiet zu einer der attraktivsten und dynamischsten Forschungsrichtungen der Toxikologie verwandelt. Im speziellen nehmen Versuche an Hepatozytenkulturen einen wichtigen Platz bei der Beurteilung des genotoxischen Potentials von chemischen Substanzen ein.

Hepatozytenkulturen haben ebenfalls einen immer grösser werdenden Stellenwert bei der Abklärung hepatotoxischer Wirkmechanismen und bei einem Speziesvergleich einschliesslich des Menschen, sowie bei einem schnellen toxikologischen Screening strukturverwandter Substanzen.

Einschränkend ist zwar zu sagen, dass primäre Hepatozytenkulturen Fremdsubstanzen nicht immer im gleichen Ausmass metabolisieren und ausscheiden können, wie es im Tier der Fall ist. Je besser es in der Zukunft gelingen wird, die Aktivität metabolisch wichtiger Enzyme durch Verbesserung der Kulturbedingungen zu erhalten, desto besser werden die in-vitro Resultate mit den Ergebnissen von Studien am Tier übereinstimmen. Ebenfalls wird in Zukunft vermehrt versucht werden, Hepatozyten in Kultur zur Zellteilung und damit zur Zellvermehrung zu bringen. Dies erweitert die Anwendungsmöglichkeiten zur Untersuchung hepatotoxischer und genotoxischer Effekte und trägt auch dazu bei, die Zahl der Spendertiere zu reduzieren. Wenn auch in letzter Zeit Fortschrittte in dieser Richtung erzielt worden sind, ist an eine routinemässige Anwendung dieser Methoden derzeit noch nicht zu denken. Schliesslich wird auch versucht, durch sich ständig verbessernde Tiefgefrier-Methoden eine Reduktion des Tierverbrauchs zu erzielen. Während bei Arbeiten mit tierischen Hepatozyten die Nachteile der Verwendung von eingefrorenen Hepatozyten für die meisten Anwendungsgebiete noch überwiegen, ist für die Untersuchungen an menschlichen Hepatozyten ein Einfrieren oft nicht zu umgehen.

Die Möglichkeit, Wirkmechanismen toxischer Effekte direkt an menschlichen Hepatozytenkulturen zu studieren, erlaubt Informationen zu erarbeiten, die nicht durch Tierversuche gewonnen werden können. Trotz dieser und anderer Voteile von Hepatozytenkulturen werden aber kultivierte Hepatozyten vor allem komplementär zum Tierversuch eingesetzt werden müssen, um Aussagen über mögliche leberschädigende Wirkungen von chemischen Substanzen am Menschen optimal zu gestalten.

Literatur

1. Oldham, H.G., Norman, S.J., and Chenery, R.J. (1985). Primary cultures of adult rat hepatocytes - a model for the toxicity of histamine H2-receptor antagonists. Toxicology 36: 215-29.

2. Rush, G.F., Ripple, M., and Chenery, R. (1985). The mechanism of SK&F 92994 (oxmetidine) cytotoxicity in isolated rat hepatocytes. J. Pharmacol. Exp. Ther. 2333: 741-6.

3. Holme, J.A., and Söderlund,E. (1986). Species differences in cytotoxic and genotoxic effects of phenacetin and paracetamol in primary monolayer cultures of hepatocytes. Mut. Res. 164: 167-75.

4. Tee, L.B.G., Davies, D.S., Seddon, C.E., and Boobis, A.R. (1987). Species differences in the hepatotoxicity of paracetamol are due to differences in the rate of conversion to its cytotoxic metabolite. Biochem. Pharmacol. 36: 1041-52.

5. Boelsterli, U.A., Bouis, P., and Donatsch, P. (1987). Relative cytotoxicity of psychotropic drugs in cultured rat hepatocytes. Cell Biol. Toxicol. 3: 231-50.

6. Munyon W.H., Salo, R., and Briones, D.F. (1987). Cytotoxic effects of neuroleptic drugs. Psychopharmacology 91: 187-8.

7. Ratanasavanh, D., Bégué J.M., Gelé, P., Grislain, L., Bromet, N., Du Vignaud, P., Defrance, R., Mocaer, E., and Guillouzo, A. (1988). Cytotoxicity and metabolism study of amineptine (S-1694-1) in cultured adult rat and human hepatocytes. In: Liver Cells and Drugs, Ed. A. Guillouzo. Colloque INSERM/John Libbey Eurotext Ltd., Vol. 164, pp. 293-300.

8. Tyson, C.A. (1987). Correspondence of results from hepatocyte studies with in vivo response. Toxicol. Industr. Health 3: 459-78.

9. Williams, G.M., Laspia, M.F., and V.C. Dunkel (1982). Reliability of the hepatocyte primary culture/DNA repair test in testing of coded carcinogens and non-carcinogens. Mutation Res. 97: 359-70.

10. Althaus, F.R., Lawrence, S.D., Sattler, G.L., Longfellow, D.G., and H.C. Pitot (1982). Chemical quantification of unscheduled DNA synthesis in cultured hepatocytes as an assay for the rapid screening of potential chemical carcinogens. Cancer Res. 42: 3010-15.

11. Andrae, U. (1984). Evidence for the involvement of cytochrome P-450-dependent monooxygenase(s) in the formation of genotoxic metabolites from N-hydroxyurea. Biochem. Biophys. Res. Commun. 118: 409-15.

12. Probst, G.S., McMahon, R.E., Hill, L.E., Thompson, C.Z., Epp, J.K., and S.B. Neal (1981). Chemically-induced unscheduled DNA synthesis in primary rat hepatocyte cultures: a comparison with bacterial mutagenicity using 218 compounds. Environ. Mutagenesis 3: 11-32.

13. Michalopoulos, G.K., Strom, S.C., and R.L. Jirtle (1986). Use of hepatocytes for studies of mutagenesis and carcinogenesis. In: Research in Isolated and Cultured Hepatocytes, Guillouzo, A. and C. Guguen-Guillouzo, eds., J. Libbey Eurotext Ltd., pp.333-352.

14. Malaveille, C., Brun, G., and H. Bartsch (1983). Studies on the efficiency of the Salmonella/rat hepatocyte assay for the detection of carcinogens as mutagens: activation of 1,2 dimethylhydrazine and procarbazine into bacterial mutagens. Carcinogenesis 4: 449-55.

15. Suter, W. (1987). Mutagenicity of procarbazine for V79 Chinese hamster fibroblasts in the presence of various metabolic activation systems. Mutagenesis 2: 27-32.

16. Eckl, P.M., Strom, S.C., Michalopoulos, G., and R.L. Jirtle (1987). Induction of sister chromatid exchanges in cultured adult rat hepatocytes by directly and indirectly acting mutagens/carcinogens. Carcinogenesis 8: 1077-83.

17. Roscher, E., and F.J. Wiebel (1988). Mutagenicity, clastogenicity and cytotoxicity of procarcinogens in a rat hepatoma cell line competent for xenobiotic metabolism. Mutagenesis 3: 269-76.

18. Mirsalis, J.C., Hamm, T.E. Jr., Sherrill, J.M., and B.E. Butterworth (1982). Role of gut flora in the genotoxicity of dinitrotoluene. Nature 295: 322-23.

VON WEGEN CYTOHEPATOTOXIZITÄT!
ICH HAB' LUST AUF EIN BIER!
KISTLER