

---

**Entwicklung eines Hepatozytenbioreaktors zur Anwendung in der  
Toxikologie und Metabolismusforschung:  
Ein neuartiges *in vitro* Modell für die online Testung von  
hepatoaktivierten Substanzen an Indikatorzellen**



**Claus J. Deglmann**

**2002**

---

---

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
ehemaliger Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. F.W. Schildberg  
jetziger Direktor: Prof. Dr. med. K.-W. Jauch

**Entwicklung eines Hepatozytenbioreaktors zur Anwendung in der Toxikologie  
und Metabolismusforschung:  
Ein neuartiges *in vitro* Modell für die online Testung von hepatoaktivierten  
Substanzen an Indikatorzellen**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Claus J. Deglmann  
aus Weiden

2002

---

---

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. H.G. Koebe

Mitberichterstatter: Prof. Dr. A.L. Gerbes  
Prof. Dr. P. Eyer

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung 7. November 2002

---

<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>5</b>
1.1 Die Leber als Stoffwechselorgan	5
1.2 Toxische Mechanismen des Lebermetabolismus	6
1.3 Biodynamische <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i> Testverfahren in der pharmazeutischen Forschung der Xenobiotikaentwicklung	7
1.4 Biohybride Leberzellreaktoren in Forschung und Klinik	9
1.5 Extrazelluläre Azidifizierungsrate (EAR) als Parameter des Zellmetabolismus und der Toxizität	10
1.6 Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit	11
<b>2. METHODEN</b>	<b>12</b>
2.1 Lösungen, Medien, Zusätze	12
2.2 Zellisolation	13
2.3 Zellkulturträger und Bioreaktormodule	15
2.4 Zellkulturkonfiguration	17
2.5 Dynamisches Perfusionssystem	19
2.5.1 Gerätschaften mit Herstellernachweis	22
2.5.2 Oxygenator, Begasungsanlage	22
2.5.3 Schlauchsystem, Pumpe	23
2.5.4 Temperaturregelung	24
2.5.5 Mikroskop, Videobeobachtung	24
2.5.6 Monitoring/Stabilität	25
2.5.6.1 Licox-System mit pO <sub>2</sub> - und Temperatursonde	25
2.5.6.2 pH - Messung	25
2.5.6.3 Osmolalitätsbestimmung	26
2.5.6.4 Mediumverlust	26
2.6 Analyse- und Nachweisverfahren	26
2.6.1 Albumin	27
2.6.2 ECOD	27
2.6.3 LDH	28
2.6.4 DNA	28
2.7 Extrazelluläre Azidifizierungsrate	29
2.8 Verwendete Zelllinie ZR 751	33
2.9 Modellsubstanzen Cyclophosphamid und Maphosphamid	34
2.10 Zusammenschluss mit dynamischem System: Metabolisationsmodell	35
<b>3 ERGEBNISSE</b>	<b>37</b>
3.1 Stabilität der biophysikalischen Parameter im Bioreaktor	37
3.2 Leistungsparameter des Hepatozytenbioreaktors	37
3.2.1 Albuminsekretion	38
3.2.2 Ethoxykumarin Metabolismus	39
3.2.3 LDH Leakage	41

## Inhaltsverzeichnis

---

3.2.4	Morphologie der Hepatozyten während der Perfusion	43
3.3	Cyclophosphamid-Metabolisation und -Aktivierung durch Schweinehepatozyten	45
3.3.1	Acroleinnachweis als Metabolit von Cyclophosphamid	45
3.3.2	Indirekter Nachweis der Aktivierung von Cyclophosphamid	47
3.4	CYCL und MAPH - Chemosensibilität von ZR 751 Zellen	48
3.5	EAR von ZR 751 Zellen unter Perfusion mit Bioreaktor - aktiviertem Cyclophosphamid	51
<b>4. DISKUSSION</b>		<b>53</b>
4.1	Diskussion der Methodik	56
4.1.1	Zellquelle: primäre Hepatozyten	57
4.1.2	Porkine Spenderspezies	59
4.1.3	Zellisolationmethode	61
4.1.4	Zellkulturbedingungen	64
4.1.4.1	Sandwich-Zellkulturmodell	64
4.1.4.2	Zellkulturmedium	67
4.1.5	Bioreaktorkonfiguration und Perfusionssystem	69
4.1.5.1	Überblick Hepatozytenbioreaktoren	69
4.1.5.2	Eigenes Bioreaktordesign	74
4.1.6	EAR als Metabolisations- und Toxizitätsmarker	76
4.2	Diskussion der Ergebnisse	79
4.2.1	Leistungsmerkmale des eigenen Perfusionssystems	79
4.2.2	Cyclophosphamid-Metabolisierung durch Schweinehepatozyten	82
4.2.3	Chemosensibilität der ZR 751 Zellen	84
4.3	Neuartiges Toxizitätsmodell der Hepatoaktivierung mit Überwachung des Zielzelleneffektes: Kombination des Bioreaktors mit dem Microphysiometer	85
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG</b>		<b>90</b>
5.1	Ziel der Promotionsarbeit	90
5.2	Methodik	90
5.3	Ergebnisse	91
5.4	Diskussion und Ausblick	93
<b>6. LITERATUR</b>		<b>94</b>
<b>7. ANHANG</b>		<b>108</b>
7.1	Veröffentlichte Teilaspekte der Arbeit	108
7.2	Abkürzungsverzeichnis	109
7.3	Danksagung	110
7.4	Curriculum Vitae	112

### 1. Einleitung

#### 1.1 Die Leber als Stoffwechselorgan

Die Leber ist das zentrale Stoffwechselorgan im Organismus und erfüllt Schlüsselfunktionen im Eiweiß-, Kohlehydrat-, Fett- sowie im Hormon und Vitaminstoffwechsel. Eine weitere Aufgabe besteht in der Entgiftung von endogen oder exogen zugeführten Substanzen.

Die kleinsten organisierten Funktionseinheiten sind die insgesamt ca.  $n = 5 \times 10^5$  Leberläppchen, die beim Menschen einen Durchmesser von 1-1,5 mm aufweisen. In der Mitte der Läppchen befinden sich die Zentralvenen als abführende Blutgefäße, die in Sammelvenen münden und schließlich als Lebervenen in die untere Hohlvene drainieren. Die Leberläppchen erhalten den Blutzufluss aus Ästen der Pfortader, die Blut vom Darmtrakt zur Leber leitet. Äste der Leberarterie verzweigen ebenfalls bis in die Läppchen-Ebene und verlaufen als vasa privata in den Grenz-Schichten.

Zusammen mit den intrahepatischen Gallengängen bilden die Blutgefäße dreieckige Bindegewebs-Formationen zwischen den Läppchen (die Lebertrias), die nach ihrem Erstbeschreiber Francis Glisson („Anatomia hepatis“, im Jahr 1654) Glisson-Dreiecke genannt werden. Zwischen den zuführenden Gefäßen und den Lebervenen strömt Blut in den Sinusoiden, einem kapillarähnlichen, gefensterten Kanalsystem, welches den transmembranösen Austausch von Makromolekülen (z.B. Albumin) zwischen Blut und den parenchymatösen Leberzellen, den Hepatozyten, ermöglicht. Ferner bildet die Leber Galle, die aus Gallenpigment und -säuren besteht. Diese wird in einem eigenen Kanalsystem zuletzt in das Duodenum geleitet. Als Gallenpigmente werden Abbauprodukte wie Bilirubin, Xenobiotika (exogen zugeführte Substanzen) und Toxine eliminiert, während Gallensäuren essentiell für

die Fettemulgierung und –resorption sind. Im menschlichen Organismus werden pro Tag etwa 500 ml Galle sezerniert. Davon wird ein Teil im Darm reabsorbiert und wieder der Leber zugeführt (enterohepatischer Kreislauf).

Pharmaka gelangen nach Resorption und einer möglichen ersten Metabolisierung (intestinaler first pass-Effekt) im Dünndarm ins Pfortaderblut. Bei der ersten Leberpassage werden einige Xenobiotika so rasch metabolisiert, dass ein großer Anteil der Substanz bereits aus dem Blut entfernt wird (hepatischer first pass-Effekt). Die Funktionalisierungsreaktionen der Leber werden in zwei Phasen unterteilt. Die dominierende Reaktion der Phase I ist eine Oxidation durch Monooxygenasen, die vor allem durch die Cytochrom P 450–abhängigen Enzymgruppen ausgeführt wird. In einer Phase II Reaktion erfolgen Kopplungs-Reaktionen z.B. an Glucuronsäure- oder Schwefelsäure-Reste, an die hydroxylierte - aber auch nicht hydroxylierte - Gruppen gebunden werden. Dabei katalysieren Konjugierungsenzyme, wie die Glucuronyltransferase und die Sulfotransferase, die Metabolisierung.

### **1.2 Toxische Mechanismen des Lebermetabolismus**

Der Lebermetabolismus verschiedener endogener und exogener Substanzen führt zu Detoxifizierungs-, aber auch zu Toxifizierungsreaktionen. Der Angriffspunkt einer toxischen Wirkung kann auf die Leber beschränkt sein, sich zusätzlich auf andere Organe oder global auf den Gesamtorganismus beziehen. Xenobiotika, die in die Blutbahn gelangen, werden bei der Passage durch die Leber potentiell metabolisiert. Substanzen, die bei der Leberpassage bereits in unveränderter Form eine toxische Wirkung auf die Leber entfalten, werden primäre Hepatotoxine genannt (Castell et al. 1997; Ballet 1997). Dagegen entfalten latente Hepatotoxine eine Lebertoxizität

sekundär nach ihrer Metabolisation; ein Prozess, der für neu entwickelte Xenobiotika nicht exakt vorhergesagt werden kann. Ein Hauptziel der präklinischen Xenobiotikaforschung besteht darin, latente oder direkte toxische Reaktionen von Fremdstoffen auf die Leber und den Gesamtorganismus zu erkennen und zu prognostizieren. Hepatotoxizität stellt den Hauptgrund für die Einstellung neuer Medikamente aus Sicherheitsgründen vor (31%) und nach Markteinführung (18%) dieser Präparate dar (Ballet 1997).

### **1.3 Biodynamische *in vivo* und *in vitro* Testverfahren in der pharmazeutischen Forschung der Xenobiotikaentwicklung**

Neben der Toxizität sind die Metabolisierungswege und die verfügbaren Wirkspiegel von potenziellen Medikamenten bei deren Entwicklung von großem Interesse. Besonders auch für die so genannten Prodrugs, die erst durch hepatischen Metabolismus und Bioaktivierung zu einem aktiven Metaboliten ihre Wirkung auf den Organismus entfalten, ist die Voraussage des qualitativen und quantitativen Metabolismus essentiell.

Die Untersuchung der Metabolisierungswege und der potenziellen Toxizität von Xenobiotika wird in frühen Stadien der pharmakologischen Forschung und Entwicklung (F&E) *in vivo* an Tieren und auch *in vitro* an Zellkulturen oder Mikrosomenaufbereitungen durchgeführt (Guillouzo et al. 1997; Davila et al. 1998; Guillouzo 1998; Morel et al. 1997).

Im Tierversuch kann die Wirkung und der Wirkspiegel eines Fremdstoffes auf den jeweiligen Gesamtorganismus beurteilt werden. Aufgrund diskrepanter Stoffwechselwege unterschiedlicher Spezies ist die Übertragung der im Tierversuch



erlangten Ergebnisse auf die Situation im menschlichen Organismus nicht immer gegeben (Berry et al. 1997; Castell et al. 1997; Guillouzo 1998).

Hepatozyten und Mikrosomenaufbereitungen von unterschiedlichen Spezies werden zusätzlich als *in vitro* Tests eingesetzt. Nach entsprechender Aufbereitung von Spender-Organen weniger Versuchstiere wird eine große Anzahl von *in vitro*-Untersuchungen ermöglicht, die z.B. das Stoffwechselverhalten von Testsubstanzen verschiedener Konzentrationen betreffen. Die Versuchsansätze können hierbei unter konstanten Bedingungen zeitgleich und kontrolliert durchgeführt werden.

Beim Einsatz von Zellkulturen werden meist primäre Hepatozyten von Ratten, aber auch humane Hepatozyten in einer Monolayerkonfiguration verwendet (Guillouzo 1998; Bisgaard et al. 1989; Paine 1990; Ulrich et al. 1995; Ohno et al. 1998). Für diese so genannten statischen Zellkultursysteme stellen Inkubatoren das physiologische Milieu sicher und gewähren stabile Kulturverhältnisse, während bei dynamischen Kulturmodellen ein externes Mediumzirkulationssystem mit einem organischen Funktionszentrum (Hepatozytenkultur) verbunden sind. Bei *in vitro* Metabolisationstests erfolgt die Bestimmung der durch die Hepatozyten verstoffwechselten Substanzen durch direkten laborchemischen Nachweis.

Auf die latente oder direkte Toxizität von Substraten und/oder Produkten auf die Hepatozyten selbst wird durch Funktions- und Vitalitätstests für die verwendeten Hepatozyten geschlossen.

Bei den *in vitro*-Testverfahren stellt sich – vergleichbar den o.g. Tierversuchen - ebenfalls die Frage der Übertragbarkeit auf den menschlichen Organismus, auch wenn primäre humane Hepatozyten zur Verfügung stehen, da die meisten *in vitro*-Versuchsverfahren nur ein monofaktorielles System darstellen. Die verschiedenen

physiologischen Interaktionen im *in vivo* Pharmakometabolismus wie der Leber-Darm -, oder der Leber-Nieren-Kreislauf werden hier nicht berücksichtigt. Dafür können die Experimente je nach Fragestellung flexibel gestaltet werden; Hepatozyten können mit anderen Zelltypen zur Untersuchung von Zell-Zell Interaktionen kokultiviert, radioaktiv-markierte Substanzen einfach inkubiert und Hepatozyten oder Mikrosomen für spätere Referenzversuche eingefroren werden. Die Aufbereitung z.B. nur einer Rattenleber ermöglicht die Durchführung von hohen Versuchszahlen (n-Zahl). Daraus resultiert eine Reduktion von Tierversuchen.

### 1.4 Biohybride Leberzellreaktoren in Forschung und Klinik

Biohybride Leberzellreaktoren - im weiteren Verlauf kurz Bioreaktoren genannt – verbinden ein organisches Funktionszentrum (Gewebe, Zellen, Zellbestandteile) mit einem technischen System aus Schlauchverbindungen, Inkubatoren/Oxygenatoren und Mediumreservoir in einem kontrollierten Umfeld.

Der Aufbau des Funktionszentrums beschreibt die Konfiguration der Hepatozyten im Leberzellbioreaktor. Als Zellkulturanordnung sind Hohlfasermembranen (Gerlach 1997; Flendrig et al. 1997b), Mikroträger (Kino et al. 1998; Flendrig et al. 1997a), Sphäroide (Naruse et al. 1996) und Mischformen (Ohshima et al. 1997) im Einsatz.

Hepatozytenbioreaktoren werden bislang primär beim künstlichen Organersatz der Leber als so genanntes „Bridging“ im Leberversagen während der Wartezeit auf ein Transplantationsorgan verwendet (Gerlach 1997; Hughes et al. 1995). Anwendungen von Hepatozytenbioreaktoren für den „*in vitro*-Leberersatz“ bei Metabolisations- oder Toxizitätsmodellen bieten darüber hinaus ein hohes Potential an Experimentiermöglichkeiten. Bei Bioreaktoren treten im Gegensatz zu den

Inkubatorculturen physiologische Fließgleichgewichte auf, die dynamische Prozesse und Anwendungen ermöglichen. Bis zum heutigen Zeitpunkt ist der Bioreaktoreinsatz als *in vitro* Metabolisations- und Aktivierungssystem im Bereich der experimentellen Pharmakologie nicht beschrieben, wird jedoch von verschiedenen Autoren propagiert (Wrighton et al. 1995; Guillouzo et al. 1997).

### **1.5 Extrazelluläre Azidifizierungsrate (EAR) als Parameter des Zellmetabolismus und der Toxizität**

Ein neuer *in vitro* Kontrollparameter für die toxische Wirkung an Zellen ist die extrazelluläre Azidifizierungsrate (EAR). Diese wird durch die Exkretion von Laktat und CO<sub>2</sub> bei der Verstoffwechslung von Glukose und Glutamin verursacht (Parce et al. 1989; McConnell et al. 1992; Wada et al. 1992; Ajilore et al. 1997). Eine Reduktion der EAR wird mit einem reduzierten Zellmetabolismus korreliert und dient entsprechend als Toxizitätsmarker (Parce et al. 1989; McConnell et al. 1992; Wada et al. 1992; Ajilore et al. 1997). Die EAR wird von einem Microphysiometer registriert und ausgewertet (McConnell et al. 1992; Ajilore et al. 1997; Wada et al. 1992; Parce et al. 1989). Dabei werden Zellen mit Medium, welches ein zu untersuchendes Agens enthält, perfundiert und kontinuierlich beobachtet. Die Perfusion dieses Systems mit Prodrugs (wie z.B. Cyclophosphamid) ohne vorherige Hepatoaktivierung zeigt in der Regel keine Wirkung auf die Zielzellen und somit keine Änderung der EAR. Bislang wurde noch keine Aktivierungseinheit in Verbindung mit einem Microphysiometer eingesetzt, die eine Untersuchung von Prodrugs ermöglicht.

### 1.6 Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung eines *in vitro* Testsystems für hepatoaktivierte Substanzen, dessen Kernsystem ein hepatozellulärer Bioreaktor bildet. Folgende Themen werden in der Arbeit behandelt:

- 1) Entwicklung und Evaluation eines neuen Hepatozytenbioreaktorsystems:
  - Überprüfung der biophysikalischen Stabilität.
  - Synthese-, Metabolisationsleistung und Zellintegrität im Langzeitversuch.
- 2) Die Testung der EAR als Toxizitätsparameter bei Zellkulturen (Tumorzelllinie und Hepatozyten) unter Verwendung eines zytotoxischen Prodrugs (Cyclophosphamid) und seines aktiven Metaboliten (4-OH-Cyclophosphamid).
- 3) Nachweis der Bioaktivierung von Cyclophosphamid durch porkine Hepatozyten.
- 4) Aktivierung eines zytotoxischen Prodrugs (CYCL) mit dem Leberzellreaktor und online Untersuchung der Toxizität auf die Ziellzelllinie mittels EAR-Messung.

Der Beschreibung von Methodik und Ergebnissen der untersuchten Themen folgt eine Diskussion der im Versuch erzielten Ergebnisse unter Einbeziehung aktueller Forschungspublikationen sowie ein Ausblick auf Nutzungsmöglichkeiten des neu etablierten Hepatozytenbioreaktorsystems in der Metabolisations- und Toxizitätsforschung.

## 2. Methoden

### 2.1 Lösungen, Medien, Zusätze

Zellisolation:

- Krebs-Ringer-Puffer I, (KRB I):

154 mM NaCl; 5,6 mM KCl; 25 mM NaHCO<sub>3</sub>; 20 mM HEPES; 5 mM Glukose;  
1 mM EDTA; pH auf 7,4 gestellt.

- Krebs-Ringer-Puffer II, (KRB II):

154 mM NaCl; 5,6 mM KCl; 25 mM NaHCO<sub>3</sub>; 20 mM HEPES; 5 mM Glukose

- PBS - Pufferlösung (Phosphate Buffered Saline) *Firma Sigma Chemie, Deisenhofen*

Zellkultur:

- L-15 Leibowitz'sches Medium: (*Bio-Whittaker, Boehringer Ingelheim Bioproducts*)

- DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium: (*Bio-Whittaker, Boehringer Ingelheim Bioproducts*) mit Zusatz von: 125 U/l Stock-Insulin, 60 µg/l Stock-Hydrokortison, 100 kU/l Penicillin, 100 µg/l Gentamycin, 10 µg/l Glucagon, 584 mg/l L-Glutamin

### 2.2 Zellisolation

Die für die Hepatozyten-Isolation benötigten Lebern wurden von Ferkeln (Schweine bis 25 kg Lebendgewicht) aus dem Münchener Schlachthof gewonnen. Die Methode entspricht den Prinzipien der von Seglen dargestellten Kollagenaseperfusion (Seglen 1976) und wurde in der eigenen Arbeitsgruppe modifiziert (Koebe et al. 1995). Die Lebern wurden jeweils direkt nach dem üblichen Schlachtvorgang entnommen, in einen Kunststoffbeutel überführt, und dieser in einer mit Eiswasser (4 °C) gefüllten Kühlbox ins Labor transportiert. Die Transportphase vom Schlachthof ins Labor nahm durchschnittlich 20 min in Anspruch. Der Lobus hepatis sinistra medialis wurde reseziert, die linke Vena hepatica kanüliert und die Lebern retrograd mit Krebs-Ringer-Puffer I (KRB I) perfundiert. Die Perfusionsanlage (siehe Abb.: 2.1) bestand aus einem Schlauchsystem (d) mit Pumpe (e) (Durchflussgeschwindigkeit 50 ml/min), einer Silikon-Karbogen-Begasungsanlage (f), einer Temperierungsspirale (g) (38 °C), einer Blasenfalle (h) und der Perfusionskanüle mit dem Leberstück (i). Wasserbäder (a, b) dienten der Temperierung der Perfusionslösungen (c). Die in einem Trichter gesammelten Lösungen wurden verworfen (j).

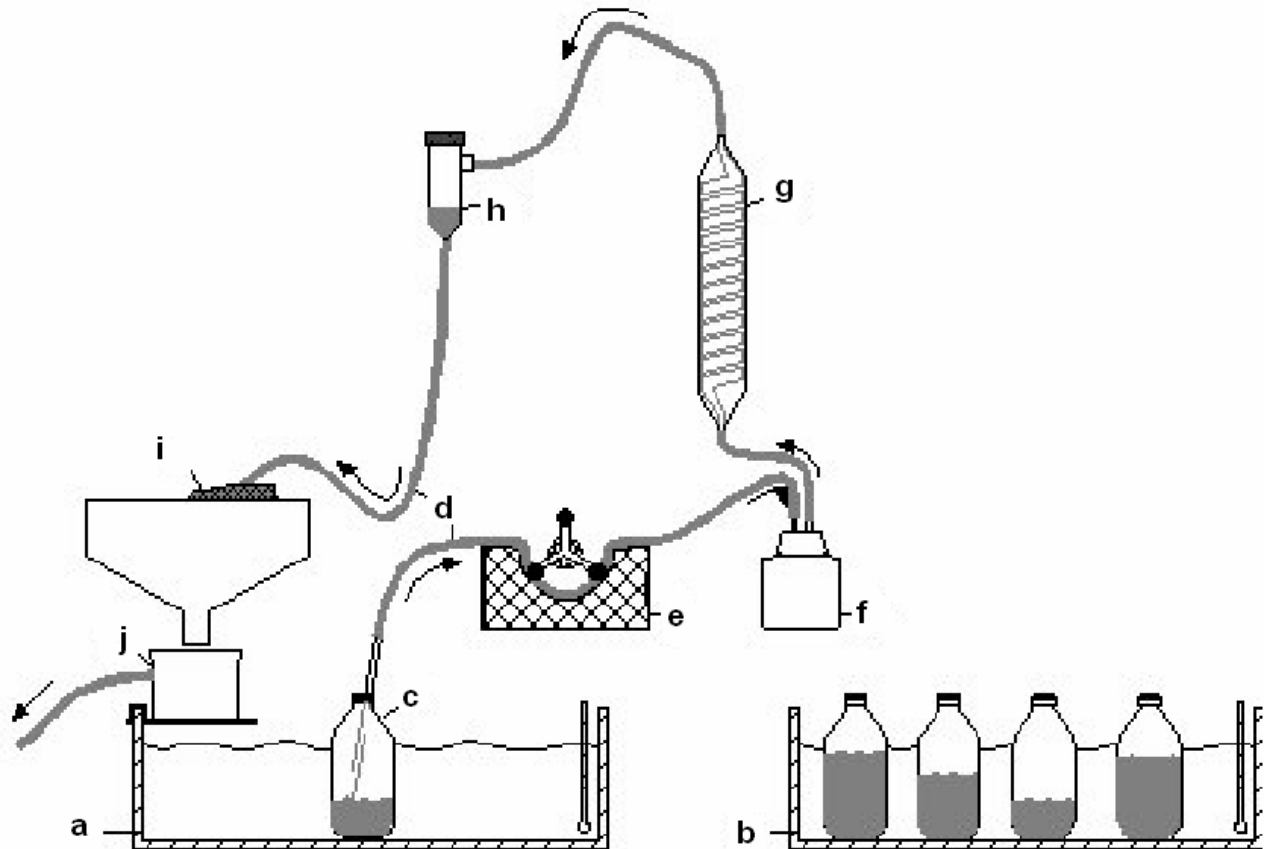


Abbildung 2-1 : Perfusionsanordnung zur enzymatischen Hepatozytenisolation: a)+b) Wasserbad; c) Perfusionslösung; d) Schlauchsystem; e) Rollerpumpe; f) Silikon-Karbogen-Begasungsanlage; g) Heizspirale; h) Blasenfalle; i) Perfusionstrichter mit Leberresektat; j) Abfallsammlung

Nach der Perfusion von 1000 ml KRB I mit 1 mM EDTA zur  $\text{Ca}^{++}$  - Komplexierung folgten 300 ml Krebs-Ringer-Puffer II (KRB II). Anschließend wurden 200 ml KRB II Lösung nach Zugabe von 0,05% (w/v) Kollagenase (*Serva, Feinbiochemica, Heidelberg*) und 2 ml 5 mM  $\text{CaCl}_2$  rezirkulierend perfundiert. Da der pH-Wert neben der Oxygenierung in der Rezirkulationsphase von großer Bedeutung ist (Lueck et al. 1970) wurde der Perfusionslösung Hepes (25 mmol/l) als Puffer zugesetzt. Diese

Andauungsphase dauerte etwa 10 min und wurde je nach Leberstückgröße und makroskopischer Auflockerung des Gewebes geringfügig variiert.

Im folgenden Schritt wurde das angedaute Lebergewebe mit einem Skalpell mechanisch zerkleinert und mit zusätzlich 200 ml KRB II in ein Schüttlergefäß unter Karbogen-Begasung für 5 min überführt. Nach einem Filtrierschritt mit einem 210 µm und einem 70 µm Sieb wurde die Zellsuspension unter Zugabe von Waschpuffer in 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und durchgehend gekühlt. Nach 5 min Zentrifugation bei 23 g wurde der Überstand abgesaugt, mit Waschpuffer aufgefüllt und wieder neu suspendiert. Nach zwei derartigen Waschvorgängen erzeugten 17 ml Zellsuspension und 12 ml Percoll®-Lösung (10,8 ml Percoll® und 1,2 ml 10 faches DMEM) bei 32 g in der Zentrifuge einen Dichtegradienten. Durch diesen Percoll®-Gradienten wurden Zellen mit niedriger Dichte, wie nicht-vitale und kleine Zellen, in einer oberen Phase abgetrennt (Kreamer et al. 1986). Die resultierende Hepatozyten-Phase wurde anschließend resuspendiert und zweimal gewaschen. Daraufhin folgte eine Zwischenlagerung in L-15 Medium (4°C).

Zur Bestimmung der Vitalität und Zellzahl wurde eine Zellzählung von 0,1 ml Zellsuspension und 0,9 ml PBS mit 0,2% Trypanblau durchgeführt. Zellen, die in einer Fuchs-Rosenthal Zählkammer blauen Farbstoff einlagerten, wurden als nicht vital eingestuft und in Relation zur Zellgesamtzahl gesetzt (Phillips 1973).

### **2.3 Zellkulturträger und Bioreaktormodule**

Als Kulturschalen fanden 225 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen mit abgeschrägtem Hals der Firma *Costar® Corporation, Cambridge, MA* Verwendung. Diese Kulturträger wurden durch Aufbohrung mit einem Zulauf und zwei Mediumabläufen versehen. Die



Verbindung zum Schlauchsystem erfolgte über in die Bohrlöcher eingesetzte Luer-Lock Konnektoren aus Polyethylen der Firma Postex (Bestellnr.: B700180700). Nach dieser Modifizierung der Kulturträger fand eine Gassterilisation statt. Um eine plane Kulturfläche zu erlangen, die einen ungehinderten Mediumfluß erlaubt, diente die eigentliche Deckfläche als Boden. Für Versuche mit dem Microphysiometer wurde ein weiterer Konnektor in der unmittelbaren Nähe der vorbestehenden Abläufe montiert, der die Verbindung zu den Microphysiometer-Perfusionskammern ermöglichte (Arbeitskreislauf).

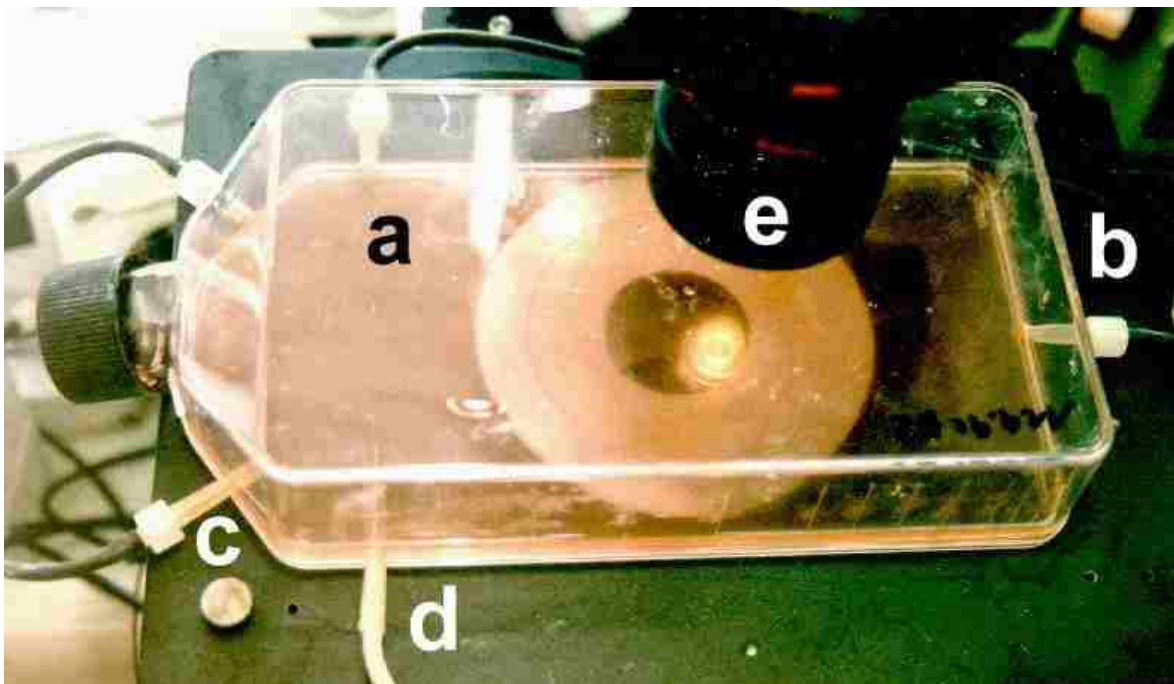


Abbildung 2-2: Das Bioreaktormodul (a) auf dem Mikroskop-Tisch (e). Medium wird über den Einlauf (b) in das Bioreaktormodul gepumpt. Auslässe befinden sich links im Bild am Modul (c). Ein weiterer Auslass (d) fördert Medium zum Microphysiometer (Arbeitskreislauf) .

### 2.4 Zellkulturkonfiguration

Jeder Bioreaktor beherbergte  $5 \times 10^7$  Schweinehepatozyten in Kollagensandwichtechnik (Dunn et al. 1989; Lee et al. 1993). Dabei wurden initial 10 ml Kollagen ausplattiert und für 30 min in den Inkubator verbracht (siehe auch Abb.: 2-3). Nach dieser Gelierungsphase wurden die Hepatozyten in 20 ml Suspensionsmedium mit 5% FCS (Fötale Kälberserum) ausgesät und für 24 h unter Standardbedingungen (37°C und pCO<sub>2</sub> 5%) inkubiert. Im fötalen Kälberserum befinden sich Proteine und nicht weiter definierbare Wachstumsfaktoren, die sich positiv auf die Adhäsionsphase auswirken. Am ersten Tag nach Isolation wurden die Zellkulturen mit PBS gewaschen und eine zweite 10 ml Kollagenschicht aufgetragen. Nach 30 min Kollagengelierungsphase kamen 20 ml serumfreies Medium hinzu, welches nur definierte Bestandteile (siehe 2.1) enthielt. Dieses Vorgehen ermöglichte die Quantifizierung der Protein-Biosynthese kultivierter Hepatozyten im weiteren Versuchsablauf.

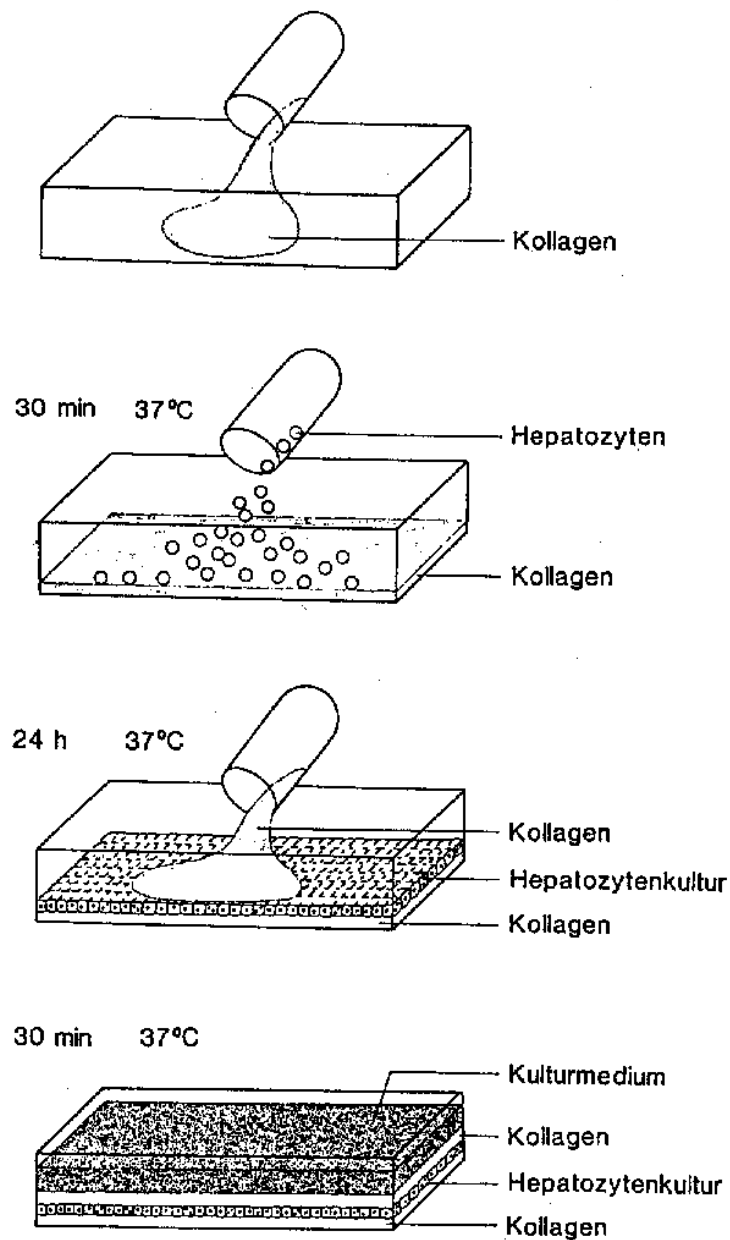


Abbildung 2-3: Kollagensandwichtechnik: Kollagen wird in die Kulturschale gegeben. Nach 30 min bei 27°C ist das Kollagen geliert und wird mit einer Hepatozytensuspension beschickt. Nach 24h Adhäsionsphase im Brutschrank wird die Kultur mit PBS gewaschen und der Überstand abgesaugt. Es folgt nun die Anlage einer zweiten Kollagenschicht. Nach 30 min Inkubation wird Kulturmedium aufgetragen.

## 2.5 Dynamisches Perfusionssystem

Im Gegensatz zu einem statischen Zellkultursystem, bei dem das Kulturmedium auf den Zellkulturen periodisch gewechselt wird und das auf einen Inkubator zur Aufrechterhaltung eines physiologischen Milieus angewiesen ist, ist das Medium bei einem dynamischen Kultursystem in Bewegung. Diese Perfusionskultur entspricht der *in vivo* Situation eher als die statische Technik.

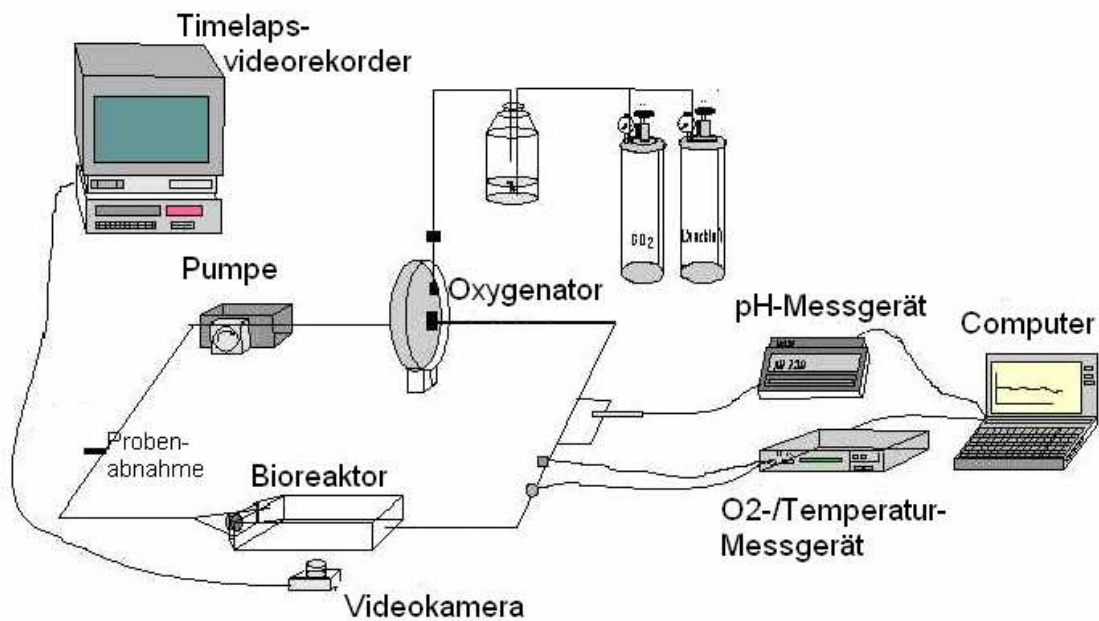


Abbildung 2-4: Schematische Abbildung der Anordnung

Die Abbildung 2-4 zeigt den Aufbau des dynamischen Kultursystems: Die Hepatozyten sind in einem Kulturträger zwischen Kollagenschichten (Bioreaktor) eingebettet. Der Bioreaktor befindet sich auf dem Objektisch eines Mikroskops, so dass eine online Morphologiebetrachtung mit dem Videomikroskop möglich ist. Das Schlauchsystem mit Rollerpumpe transportiert das Kulturmedium rezirkulierend, der Oxygenator und eine Kontrollmesseinheit kontrollieren den Sauerstoffgehalt, die Temperatur und den pH-Wert des Mediums.

Der Bioreaktor wurde am dritten Tag nach Kultur an das Perfusionssystem angeschlossen. Für die Etablierungsphase des Perfusionsmodells wurde das Kulturmedium (100 ml) im Verlauf der Perfusion nicht gewechselt, um ein annähernd geschlossenes System zu erhalten. Der Beobachtungszeitraum entspricht 6 Perfusionstagen.

Der Mediumverlust aufgrund von Kondensation betrug nach 6 Tagen weniger als 2%. Konzentrationseffekte konnten somit für die hier vorgestellten Auswertungen vernachlässigt werden.

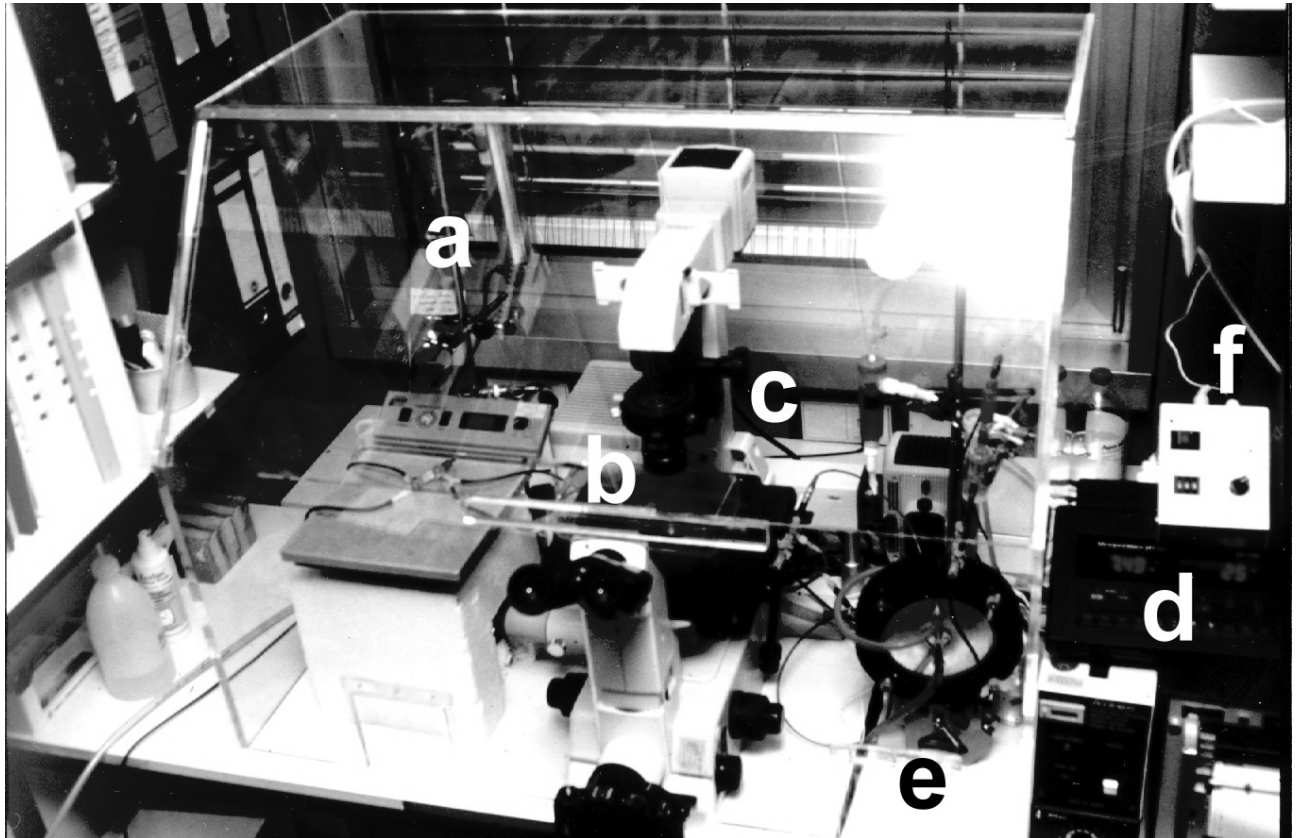


Abbildung 2-5: Bild der Perfusionsanlage: Die gesamte Anordnung des Systems befindet sich unter einer Kunststoff-Haube, die als Temperierungseinheit dient: (a) Begasungsregelung; (b) Bioreaktormodul; (c) Mikroskop; (d) PH-Messgerät; (e) Oxygenator; (f) Temperatursteuergerät

2.5.1 Gerätschaften mit Herstellernachweis

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Bioreaktormodul	225 cm <sup>2</sup> T-Flask	<i>Firma Costar® Corporation, Cambridge, USA</i>
Microphysiometer	Cytosensor® Microphysiometer System	<i>Firma Molecular Devices, CA, USA</i>
Oxygenator	Membranoxygenator	<i>Prof. Kvant, Moskau, Rus</i>
Schlauchsystem	Viton® - Schläuche	<i>Firma Thomaplast, D</i>
Rollerpumpe	Modell MC-MS CA-4/8,	<i>Firma Ismatec, Inc., USA</i>
Temperatursteuerung	HT 30 Pt 100	<i>Firma Horst, D</i>
Mikroskop	Diaphot 300	<i>Firma Nikon, Japan</i>
Videorekorder und Monitor	AG-6730 S-VHS und WV-CM/450	<i>Firma Panasonic, Japan</i>
PO <sub>2</sub> -Messgerät	Licox-Messgerät	<i>Firma GMS, D</i>
PH-Meter	Modell 538 RS	<i>Firma WTW, D</i>

2.5.2 Oxygenator, Begasungsanlage

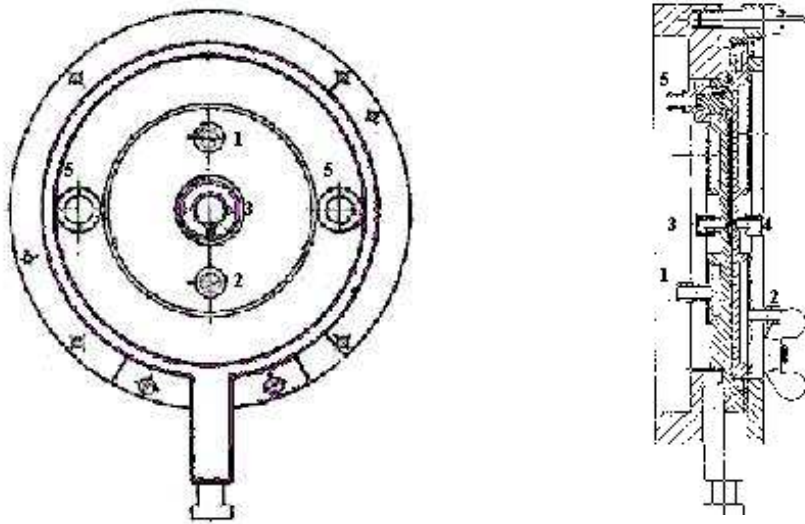


Abbildung 2-6: Der Kvant Membranoxygenator: Front- und Seitenansicht



Der Kvant Membranoxygenator wurde von Prof. Kvant, Moskau entwickelt. Die Temperierung des Oxygenators auf 38°C erfolgte durch ein Wasserbad, welches mit einem Pumpsystem zugleich auch das pH-Durchflussgefäß versorgte. Die entsprechenden Anschlüsse sind im obigen Schema (siehe auch Abb.: 2-6) mit 1 und 2 bezeichnet. Der Mediumein- und -ablass (3,4) verband den Oxygenator mit dem Schlauchsystem. Das Mediumfüllungsvolumen betrug 5 ml. Vor dem Einsatz im Perfusionsmodell wurde die Anlage mit Alkohol gespült. Eine Autoklavierung wäre prinzipiell möglich, wurde jedoch im beschriebenen Modell nicht angewandt, da der Zusammenbau unter sterilen Bedingungen hätte erfolgen müssen. In der Mitte des Oxygenators wurde die Begasungsmembran mit Metalloberfläche eingebracht und mit Flügelschrauben und einem Spannring gesichert. Die kreisrunde Membran wurde durch den Gaszu- und -ablauf (5) versorgt und hatte einen Radius von 5cm. Die Zusammensetzung des Gasgemisches erfolgte in Abhängigkeit vom pH-Wert. Druckluft wurde mit einem variablen CO<sub>2</sub>-Anteil versetzt - je nach gemessenem pH-Wert. Zielwert war ein pH von 7,4 wobei der eingestellte CO<sub>2</sub>-Anteil im Bereich von 1-5% reguliert werden musste.

### **2.5.3 Schlauchsystem, Pumpe**

Für die Schläuche des Perfusionssystems wurde ein inertes Material gewählt, um eine Adsorption von Substanzen im Medium möglichst gering zu halten. Eine eigentoxische Wirkung sollte ausgeschlossen sein.



*Viton®* - Schläuche der Firma *Thomoplast* erfüllen diese Forderungen und wurden daher verwendet. Der Innendurchmesser betrug 1,5 mm, der Außendurchmesser 3,2 mm. Das Schlauchvolumen umfaßte ca. 4 ml Flüssigkeit. Eine Schlauchpumpe der Firma *Ismatec, Modell MC-MS CA-4/8*, erhielt die Mediumzirkulation aufrecht. Als Durchflussgeschwindigkeit wurden 9 ml/min gewählt.

### 2.5.4 Temperaturregelung

Das Perfusionssystem wurde von einer speziellen Plexiglashaube mit Eingriffen zur Mikroskopbedienung umgeben, ein darin eingeschlossener, handelsüblicher Heizradiator temperierte den Versuchsraum. Eine Temperatursteuereinheit der Firma *HORST, HT 30 Pt 100* steuerte den Heizradiator. Dieser ermöglicht einen Regelbereich von 10-99°C in 0,1°C Schritten. Die Temperatur betrug auf Kulturträgerhöhe 37°C ± 1°C.

### 2.5.5 Mikroskop, Videobeobachtung

Der Bioreaktor wurde auf dem Mikroskopträger zur online Beobachtung montiert. Das Mikroskop der Firma *Nikon, Diaphot 300*, war mit einem Time Lapse Videorekorder der Firma *Panasonic, Modell AG-6730 S-VHS* mit Monitor *WV-CM/450* verbunden und ermöglichte somit Zeitrafferaufnahmen. Durch die temperierte Plexiglashaube konnte einer sonst störenden Kondenswasserbildung im Bioreaktor entgegengewirkt werden. Photoaufnahmen wurden mit einer Nikon F4

Kamera, die an der Mikroskopfront mit einem Bajonettverschluss befestigt war, durchgeführt.

### 2.5.6 Monitoring/Stabilität

#### 2.5.6.1 Licox-System mit $pO_2$ - und Temperatursonde

Zur online Kontrolle des  $O_2$ -Partialdruckes ( $pO_2$ ) im Medium wurde ein Licox-Messgerät der Firma *GMS* eingesetzt. Das Gerät verfügt über zwei Messkanäle: jeweils einen  $pO_2$ - und einen Temperatursensor mit der Dimension 0,5 x 200 mm. Die sterile, flexible, polarographische  $pO_2$ -Sonde mit Polyethylenoberfläche und die, als Ni/NiCr Thermoelement aufgebaute, Temperatursonde Typ K wurden an Dreiwege-Luerlock Verbindungen in das Schlauchsystem direkt vor dem Bioreaktor eingebracht. Am Licox-Messgerät wurde der bestimmte, temperaturabhängige  $pO_2$ -Wert angezeigt. Über eine *GMS-Licox* Software war die Datenübertragung auf einen Computer und eine damit verbundene Datenaufzeichnung möglich.

#### 2.5.6.2 pH - Messung

Die Überwachung des pH-Wertes erfolgte kontinuierlich online. Ein temperierbares Durchlaufgefäß der Firma *Ingold* (*Bestell Nr.: 106111000*) wurde parallel geschaltet und vom zirkulierenden Medium durchströmt. Eine dafür passende Einstabmesskette der Firma *Ingold* (*Bestell Nr.: 104054371*) war mit einem pH-Meter der Firma *WTW*, *Modell 538 RS*, verbunden und registrierte den pH-Wert. Über einen Computer und die *WTW-Achat* Software wurden die Daten aufgezeichnet.

### 2.5.6.3 Osmolalitätsbestimmung

Die Osmolalität des Kulturmediums wurde im Institut für Klinische Chemie des Klinikums der Ludwig-Maximilians-Universität, Großhadern (Direktor Prof. Dr. med. D. Seidel) bestimmt. Bei 2ml-Proben des Bioreaktormediums wurde in einer im Routinebetrieb des Klinikums benutzten Analyseeinheit die Gefrierpunktserniedrigung gemessen, die abhängig von der Osmolalität einer Lösung ist.

### 2.5.6.4 Mediumverlust

Der Mediumverlust wurde am Ende von drei Stabilitätsversuchen durch Abmessen des verbleibenden Kulturmediums ermittelt. Ein indirekter Parameter für den Kondenswasserverlust stellte die Osmolalitätsbestimmung dar.

## 2.6 Analyse- und Nachweisverfahren

Zur Validierung der Hepatozytenfunktion dienten bei der Etablierung des Bioreaktors die Beurteilung der Zellmorphologie, der Synthese- und Metabolisationsleistung, sowie der Zellintegrität (Enzymfreisetzung).

Die Einrichtung des Bioreaktors auf dem Mikroskopisch erlaubte die kontinuierliche Beobachtung der Zellmorphologie. Die Albuminsekretion in das Medium wurde als Parameter der Syntheseleistung verwendet. Die Cytochrom P450-abhängige Deethylierung von Ethoxykumarin zu 7-Hydroxykumarin diente als

Metabolisationsmarker. Durch Bestimmung der Laktatdehydrogenase (LDH) im Medium konnte die Enzymfreisetzung und somit die Zellintegrität der Hepatozyten beurteilt werden.

Die Angabe der LDH Aktivität, ECOD Metabolisierung und Albuminsekretion erfolgte normalisiert auf die gemessene Gesamt DNA-Menge einer Zellkultur.

### 2.6.1 Albumin

Die Albuminsekretion in den Überstand wurde durch einen ELISA (Enzyme Linked Immuno Absorbant Assay) mit Hilfe eines Ratten-anti-Schwein Albumin Antikörper (RAS w/ alb) (*Nordic Biogentia*) und eines Peroxidase konjugierten Schaf – Ratten Antikörper ((*Nordic Biogentia*) GAR / IgG (H+L) / PO) gemessen; Methodik nach Herstellerangabe. Die Extinktion wurde bei 450 nm mit einem Titertek Multiscan Plus Reader MK II der Firma *Flow Laboratories (Meckenheim, Germany)* bestimmt.

### 2.6.2 ECOD

Durch die Inkubation der Hepatozyten mit 7-Ethoxykumarin entstand freies 7-Hydroxykumarin sowie glukuronidierte und sulfatierte Konjugate. Nach Inkubation der Proben mit  $\beta$ -Glukuronidase und Sulfatase (*Sigma type H1 (G 0751)*) wurde 7-Hydroxykumarin fluorometrisch gemessen (Edwards et al. 1984).

In einem Vorversuch wurde zunächst die Stabilität von 7-Hydroxykumarin (verwendet wurde die Stammlösung des Assays (100  $\mu$ l/50 ml)) im bestehenden Standardbioreaktormodell mit Hepatozyten überprüft, um die kumulative Messung zu begründen. Dabei ließ sich nach sechs Tagen  $102\% \pm 4$  (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung) des initial inkubierten 7-Hydroxykumarins nachweisen.

Um die Enzymsättigung bei der ECOD-Metabolisation zu kontrollieren, wurden im Inkubator verschiedene Substratkonzentrationen sowohl intermittierend (alle 2 Tage), als auch drei verschiedene Konzentrationen Ethoxykumarin als Einmalbolus (200 /400 /600 µl) gegeben. Dabei zeigte sich, dass ein 200 µl Ethoxykumarinbolus bei 400µl Anfangsgabe im Bioreaktorkulturmodell nach vier Tagen Versuchsdauer keine deutliche 7-Hydroxykumarinsteigerung im Medium ergab, verglichen mit 600µl Anfangsgabe. Eine vergleichbare Konzentration wurde ebenso nach fünf Tagen bei 400 µl initialer Einzelgabe erreicht.

### 2.6.3 LDH

Die Laktatdehydrogenasenaktivität im Überstand wurde photometrisch bei 339 nm bestimmt. Pyruvat und NADH/H<sup>+</sup> wurden als Substrate hinzugegeben. Durch die Formel:  $\Delta A/\Delta t$  (in min) x 9918 wurde die LDH-Aktivität in U/l berechnet (Bergmayer, 1983).

### 2.6.4 DNA

Für die Bestimmung des DNA-Gehaltes einer Kultur war eine Homogenisierung der Hepatozyten notwendig. Mit einem Multiwell Platten Scanner (Titertek Fluoroscanner, Labsystems, Helsinki, Finland) wurde das Homogenat fluorometrisch analysiert ( $I_{ex}$  = 355 nm;  $I_{em}$  = 460 nm), modifiziert nach der Methode von Rago (Rago et al. 1990).

### 2.7 Extrazelluläre Azidifizierungsrate

Die Extrazelluläre Azidifizierungsrate (EAR) von Zellen als ein Parameter der Zelleistung wird vor allem durch die Exkretion von Laktat und CO<sub>2</sub> bei der Verstoffwechslung von Glukose und Glutamin verursacht (Parce et al. 1989; McConnell et al. 1992; Wada et al. 1992; Ajilore et al. 1997). Daraus wurde abgeleitet, dass ein reduzierter Zellmetabolismus mit einer Reduktion der EAR einhergeht (Parce et al. 1989; McConnell et al. 1992; Wada et al. 1992):

#### Microphysiometer System

Das Cytosensor® Microphysiometer wurde als Messgerät für die Protonenexkretion für 10E4 bis 10E6 Zellen eingeführt. (McConnell et al. 1992). Die Messung der EAR wird in der Rezeptorphysiologie und in der Toxizitätsbestimmung verwendet (Wada et al. 1992; McConnell et al. 1992; Brown et al. 1997; Baxter et al. 1994; Rabinowitz et al. 1997; Ajilore et al. 1997).

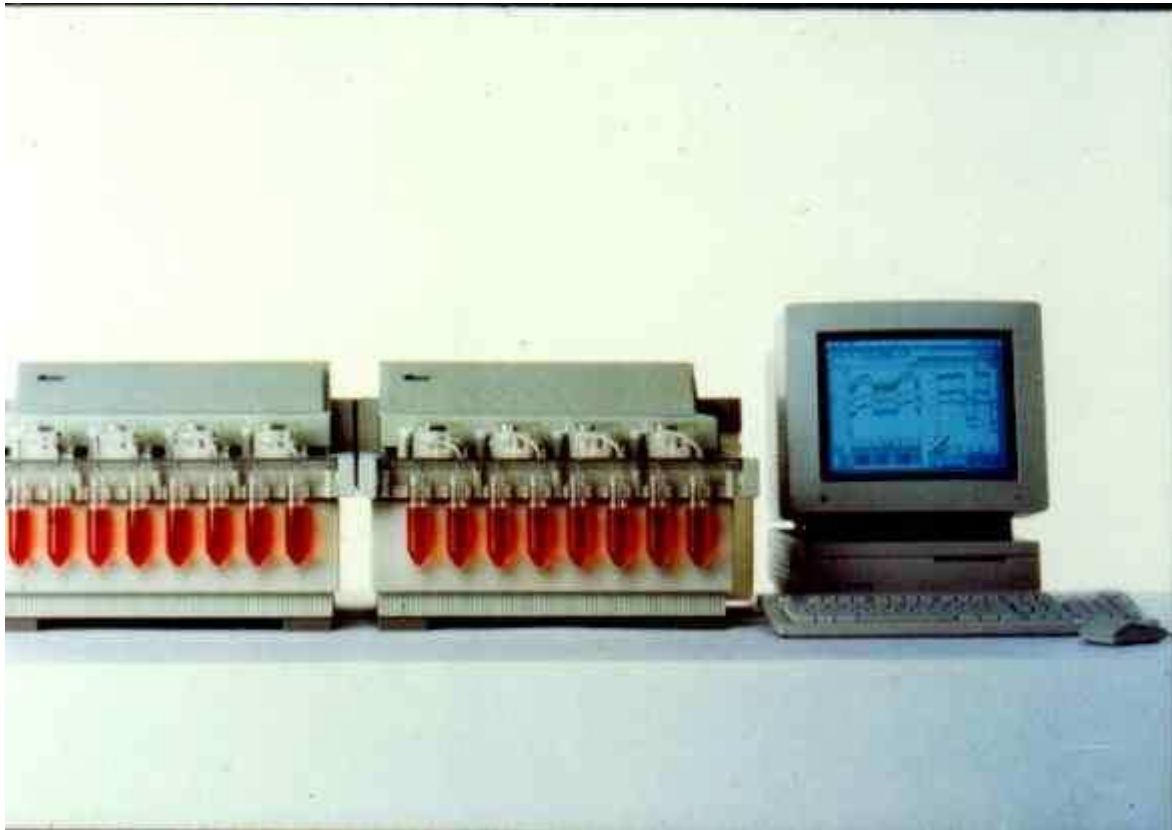


Abbildung 2-7: Photo einer Cytosensor® Microphysiometer System Acht-Kammer Einheit mit acht parallelen Perfusionskammern und Computerunit  
(Firma Molecular Devices, CA, USA)

Das Cytosensor® Microphysiometer System bestand aus mehreren unabhängigen Perfusionskammern (siehe Abb.: 2-8), die je einen potentiometrischen Sensor auf Silikonbasis enthalten, der pH-Änderungen von bis zu 1/1000 registrierte und in Echtzeit an die angeschlossene Computereinheit weitergab.

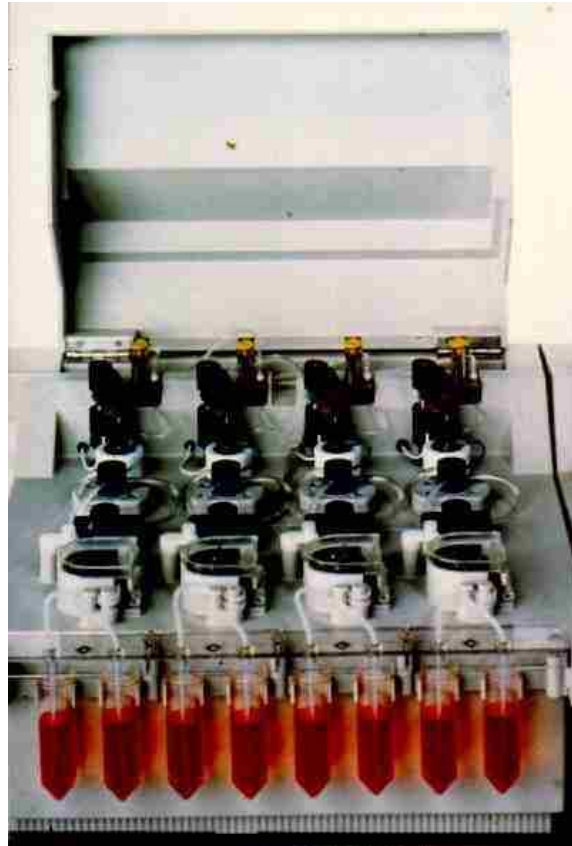


Abbildung 2-8: Geöffneter Microphysiometer mit vier unabhängigen Perfusionskammern

Pro Perfusionskammer kamen im vorgestellten Modell  $1,5 \times 10^5$  ZR 751 Brustkrebszellen als Target-Zellen zum Einsatz. Als Medium fand DMEM ohne Pufferlösung Verwendung und wurde mit einer Pumprate von  $150 \mu\text{l}/\text{min}$  zu den Perfusionskammern gefördert. Den Zellen wurde zunächst eine Adaptationsphase von 30 min gewährt und anschließend die EAR aller Zellen als 100% Ausgangswert bestimmt. Der weitere Verlauf wurde relativ zu diesem Basalwert berechnet. Alle 2 min hielt der Kontrollcomputer die Perfusion für 30 Sekunden an und evaluierte die Ansäuerung im Medium.



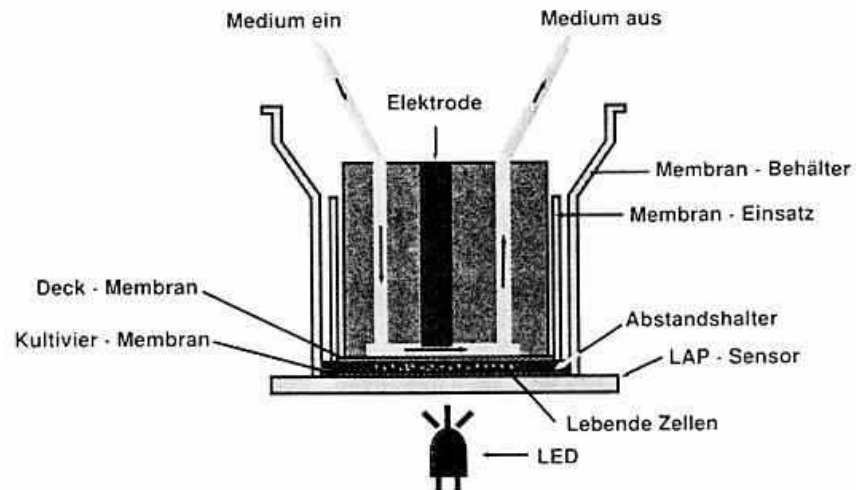


Abbildung 2-9: Die Cytosensor® Perfusionskammer. Entnommen aus „The Cytosensor Microphysiometer: Biological Applications of Silicon Technology.“ (McConnell et al. 1992)

Alle aufgezeichneten EARs wurden mit den korrespondierenden Kontrollen verglichen und semiquantitativ als Prozentwerte der Kontrollen angegeben. Die absoluten EAR-Werte der Kontrollzellen zeigten typischerweise im Verlauf einen Anstieg der EAR, der als Ausdruck der Zellproliferation und der damit verbundenen Zunahme des Zellmetabolismus gewertet wurde.

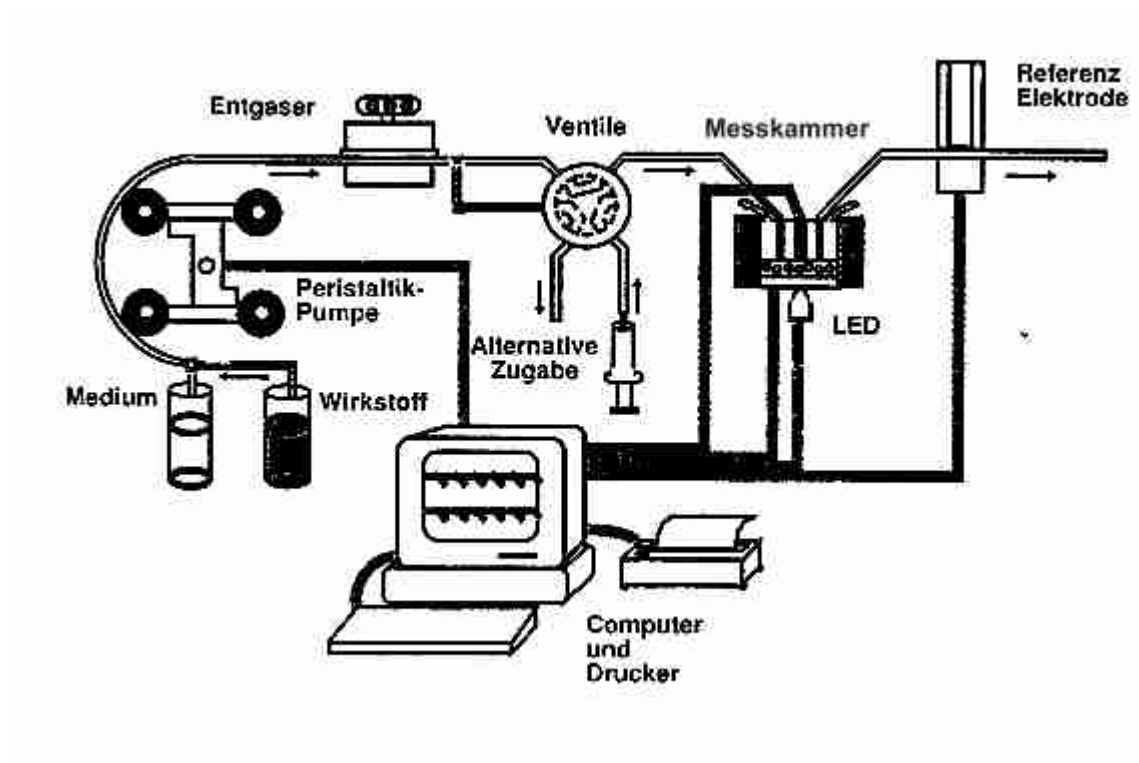


Abbildung 2-10: Schemazeichnung des Cytosensor®-Microphysiometer. Entnommen aus "The Cytosensor Microphysiometer: Biological Applications of Silicon Technology." (McConnell et al. 1992)

## 2.8 Verwendete Zelllinie ZR 751

Je  $1,5 \times 10^5$  ZR 751 Zellen (Brust Karzinom Zelllinie, ECACC Nummer 87012601) wurden pro Perfusionskammer des Cytosensor® Microphysiometers eingesetzt. In Vorversuchen wurde die Sensibilität von mehreren Zelllinien auf den aktiven Metaboliten von Cyclophosphamid getestet. Die Vorversuche werden in dieser Arbeit nicht gezeigt.

## 2.9 Modellsubstanzen Cyclophosphamid und Maphosphamid

Cyclophosphamid (Endoxan®, *Asta Medica, Frankfurt*) ist eine klinisch häufig verwendete alkalisierende zytotoxische Substanz, die Cytochrom-P450-abhängig zu ihrem aktiven Metaboliten 4-OH-Cyclophosphamid aktiviert wird (Yu et al. 1999; Bort et al. 1999; Busse, D et al. 1999) (siehe Abb.: 2-11).

Maphosphamid entspricht der stabilisierten Form von 4-OH-Cyclophosphamid. Maphosphamid (4-(2-Sulphoethyl)-thio-Cyclophosphamid) ist ein weißliches Pulver, welches spontan in 4-OH-Cyclophosphamid und Mercaptoethansulfat dissoziiert, wenn es in Wasser gelöst wird (Meyer et al. 1997).

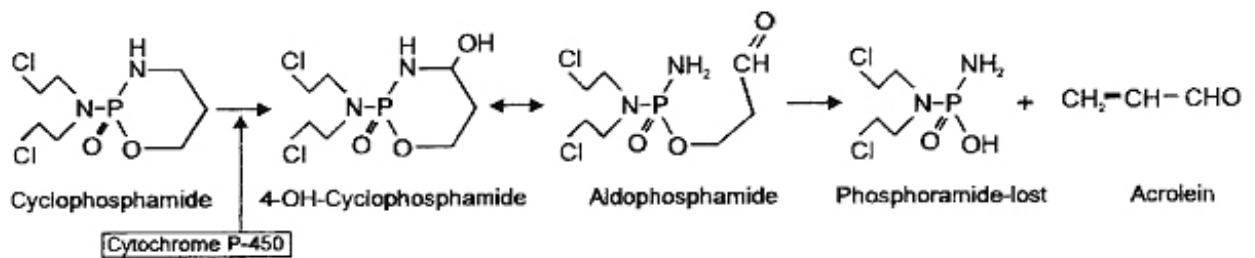


Abbildung 2-11: Metabolisationsweg von Cyclophosphamid

In den Bioreaktorexperimenten wurde Cyclophosphamid in einer hohen Dosierung (30 µg/ml) verwendet, was in etwa der 10-fachen TBC (Total Body Concentration) *in vivo* entsprach, um eine Substratsättigung zu garantieren. Eine mögliche Eigentoxizität dieser Dosierung auf Hepatozyten und ZR 751 Zellen wurde durch die EAR-Beobachtung unter Perfusion der Substanz in zwei Konzentrationen (1-fache und 10-fache TBC) untersucht.

### Acrolein

Acrolein, als Metabolit von Cyclophosphamid, wurde per HPLC (High-Performance Liquid Chromatographie) durch Dr. Bohnenstengel (Dr. Margarete Fischer-Bosch Institut der Klinischen Pharmakologie, Stuttgart) nachgewiesen (Bohnenstengel et al. 1997). Ferner sollte untersucht werden, ob eine Kollagendeckelung zu einer Beeinträchtigung der Abgabe von aktiven Metaboliten führte. Dazu wurden Schweinehepatozyten auf 6-well Platten mit 0,3 ml Kollagen ausplattiert; eine Gruppe (n=3) mit 1ml Kollagen gedeckelt, die andere Gruppe nicht. Am 3. Tag erfolgte die Inkubation mit 1 mg/ml Cyclophosphamid (Endoxan®) für 1, 2, 4 und 8 Stunden und der sofortigen Durchführung der Derivationsreaktion, um die Acroleinkonzentration zu messen.

### **2.10 Zusammenschluss mit dynamischem System: Metabolisationsmodell**

Nach der Etablierung des Hepatozytenbioreaktors mit stabilen biophysikalischen Parametern, dem Nachweis der Metabolisation bzw. Aktivierung von CYCL durch Schweinehepatozyten und dem Test der Chemosensibilität der ZR 751 Zellen gegenüber aktivierten Metaboliten von CYCL, wurde das Gesamtmetabolisationsmodell getestet. Die Muttersubstanz Cyclophosphamid sollte im Hepatozytenbioreaktor aktiviert werden und anschließend über die ZR 751 Zellen im Microphysiometer geleitet werden.

Bei dem Zusammenschluss des Hepatozytenbioreaktors mit dem Cytosensor® Microphysiometer wurden einige Modifikationen der Einzelsysteme vorgenommen. Das Zirkulationsmedium im Bioreaktor wurde auf 50 ml reduziert um ein höheres

Zell/Medium Verhältnis zu erreichen. Durch ein weiteres Bohrloch im Kulturträger mit eingefügtem Luer Lock Konnektor konnte mit Hilfe einer 8 cm langen Hohnadel Medium abgeleitet und kontinuierlich zum Microphysiometer gepumpt werden (150 $\mu$ l/min) (Abb.: 2-12). Durch Y-Verbindungsstücke wurde der Konnektionsschlauch mit drei Perfusionskanälen des Microphysiometers verbunden. Für die Verbindung wurde das pro Kanal bestehende Mediumansaugrohr umgangen. Die Pumpzeit zwischen Bioreaktor und Microphysiometer-Perfusionskammern betrug bei der verwendeten Pumprate von 150 $\mu$ l/min etwa 30 Sekunden.

Bereits drei Stunden vor der Verbindung der beiden Perfusionssysteme wurde das Substrat Cyclophosphamid in den Bioreaktorkreislauf eingefügt, um eine Basalkonzentration der aktiven Metaboliten im Arbeitskanal zu erreichen.

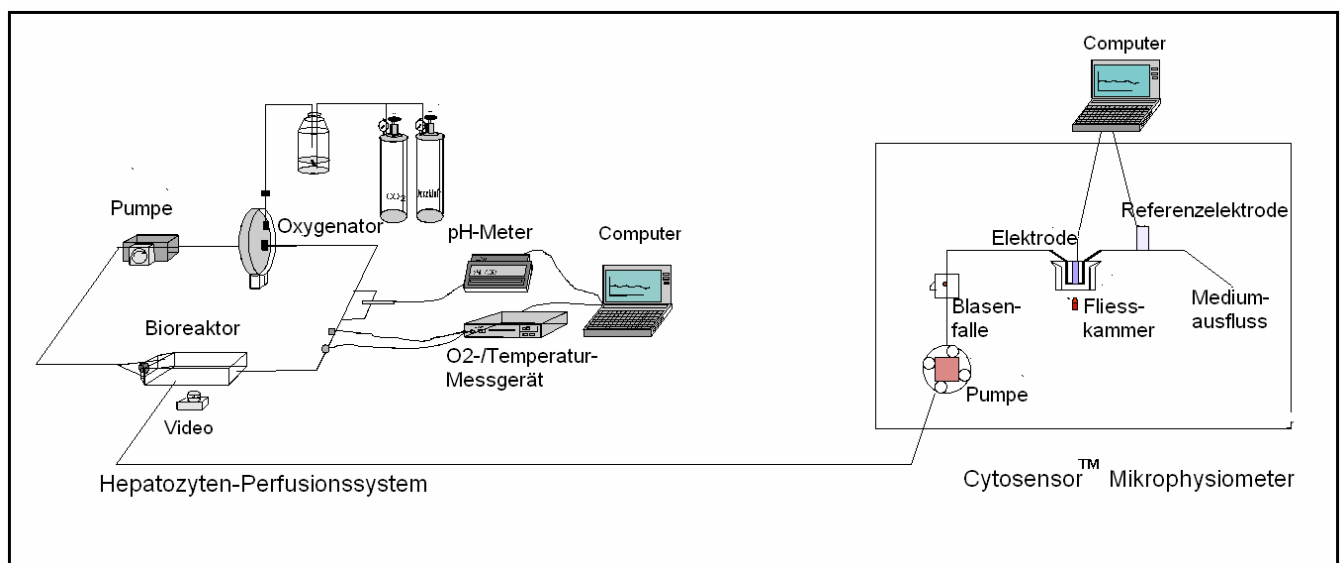


Abbildung 2-12: Schematischer Zusammenschluss des Bioreaktors mit drei Kanälen des Microphysiometers

### **3 Ergebnisse**

#### **3.1 Stabilität der biophysikalischen Parameter im Bioreaktor**

Die erhobenen biophysikalischen Parameter waren im Verlauf der Bioreaktoretablierungsversuche für 6 Tage stabil in physiologischen Grenzen (siehe Tabelle 3-1). (Siehe dazu auch 2.5.6)

<b>Parameter</b>	<b>Einheit</b>	<b>Wert</b>
pO <sub>2</sub>	mmHg	110 ± 15
Osmolalität	mosm	335 ± 20
PH	Units	7,3 ± 0,2
Temperatur	°C	37,0 ± 1,0

Tabelle 3-1: Biophysikalische Parameter des Hepatozytenbioreaktors

#### **3.2 Leistungsparameter des Hepatozytenbioreaktors**

Die Albuminsekretionsrate, die ECOD-Aktivität, die Zellintegrität in Form von LDH-Leakage und die mikroskopische Zellmorphologie dienten als Leistungsparameter. Neben der Bioreaktorgruppe wurde auch eine Inkubatorgruppe als Vergleichsgruppe herangezogen: Dabei waren die Zellkulturkonfiguration (50 Mio. Zellen, 225 cm<sup>2</sup> Flasks, 20 ml Kollagenmatrix), die Mediumgesamtmenge (100 ml), sowie die Probenabnahmezeitpunkte identisch zu der Bioreaktorgruppe. In der Bioreaktorgruppe entsprach der Perfusionstag 0 dem dritten Tag in Kultur. Analog wurden Untersuchungen an den Inkubatorkulturen am dritten Tag begonnen. Der Inkubator wurde bei den Kontrollversuchen auf 40% O<sub>2</sub> Gehalt eingestellt, um bei

einer verhältnismäßig hohen Mediummenge (100 ml) im Überstand auf Zellebene einen ähnlichen Partialdruck zu erreichen, wie er im Perfusionssystem des Bioreaktors gegeben war. Der O<sub>2</sub>-Partialdruck auf Zellebene wurde in beiden Kulturen (statisch und dynamisch) mit dem Licox-System ermittelt (s.u.). Der pO<sub>2</sub> betrug bei den statischen Kulturen 140 ± 25 mmHg, bei den dynamischen Kulturen 110 ± 15 mmHg.

### 3.2.1 Albuminsekretion

Die kumulative Albuminsekretion der Bioreaktorgruppe (n=3), bezogen auf den DNA-Gehalt der Kulturen [ $\mu\text{g}/\mu\text{g DNA}$ ], betrug am Perfusionstag eins (entspricht Tag vier in Kultur)  $2,02 \pm 0,21$  [ $\mu\text{g}/\mu\text{g DNA}$ ] (Mittelwert ± Standardabweichung) und am Perfusionstag drei  $8,06 \pm 1,98$  [ $\mu\text{g}/\mu\text{g DNA}$ ]. In der Inkubatorgruppe (n=5) zeigten sich vergleichbare Werte mit einer Albuminsekretion am Tag vier in Höhe von  $2,02 \pm 0,69$  [ $\mu\text{g}/\mu\text{g DNA}$ ] und am sechsten Tag von  $8,20 \pm 1,87$  [ $\mu\text{g}/\mu\text{g DNA}$ ].

Nach drei Perfusionstagen (entsprechend Tag 7 in Kultur) zeigten sich vergleichbare Werte in beiden Gruppen, die jedoch deutliche Standardabweichungen hinsichtlich der Albuminsekretion aufwiesen (siehe Abb.: 3-1).

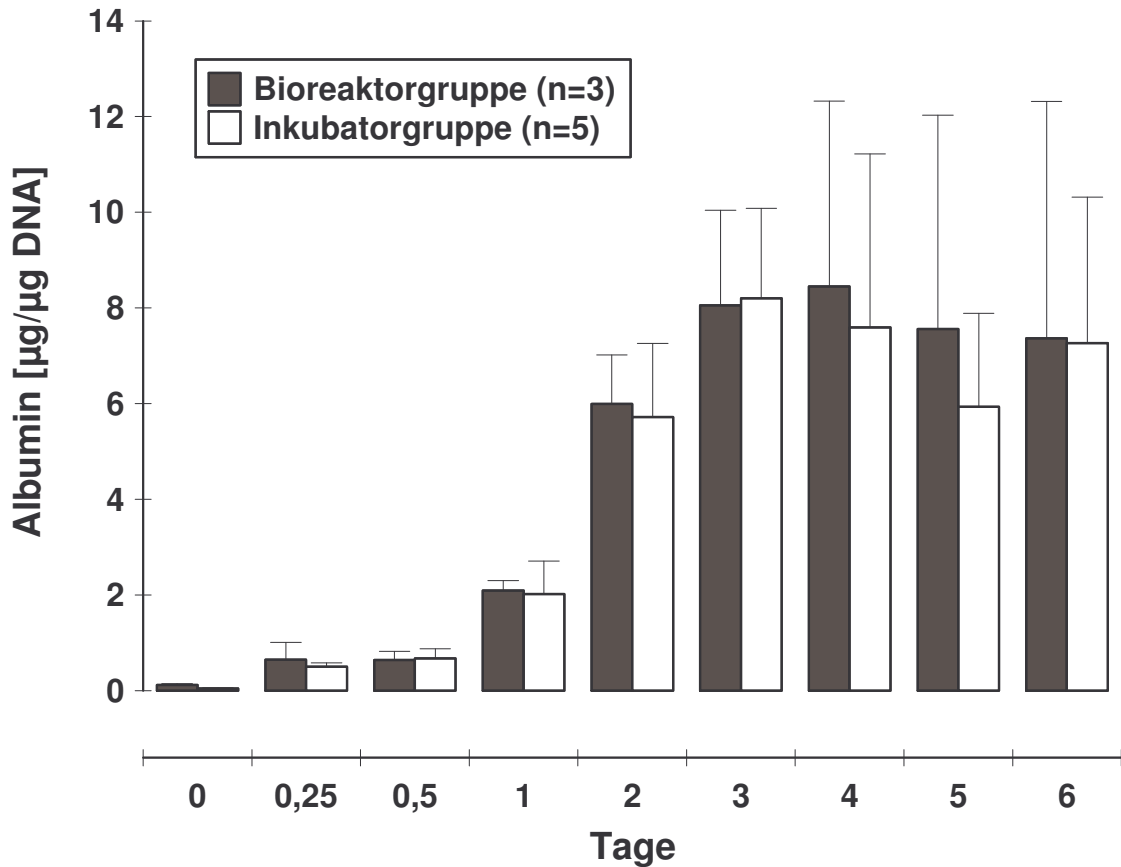


Abbildung 3-1: Albuminsekretion der Bioreaktorgruppe (n=3) verglichen mit der Inkubatorgruppe (n=5). Die Albuminsekretion war in beiden Gruppen vergleichbar, zeigte allerdings 3 Tage nach Experimentbeginn größere Abweichungen vom Mittelwert innerhalb der Gruppen. Die Werte sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben in [µg/µg DNA] Albumin.

### 3.2.2 Ethoxykumarin Metabolismus

Die Cytochrom P450 abhängige Ethoxykumarin-Deethylase-(ECOD) Aktivität der Hepatozyten wurde kumulativ als Produktmessung und bezogen auf den Zell-DNA-Gehalt angegeben [pmol 7-Hydroxykumarin/µg DNA].



Dem Medium der Bioreaktorgruppe und der Inkubationsgruppe wurden jeweils 400 µl Stammlösung von Ethoxykumarin zugegeben. Die Bioreaktorgruppe (n=3) metabolisierte kumulativ  $1,82 \pm 0,84$  [pmol 7-Hydroxykumarin/µg DNA] (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung) innerhalb 24h (entspricht Tag 4 in Kultur) und  $20,32 \pm 5,38$  innerhalb fünf Tagen in Perfusion (Tag 8 in Kultur). Die vergleichbaren 7-Hydroxykumarinspiegel bei der Kontrollgruppe im Inkubator (n=4) waren  $3,13 \pm 1,26$  [pmol 7-Hydroxykumarin/µg DNA] nach 24h am vierten Kulturtag und  $42,55 \pm 7,50$  am fünften Versuchstag (Tag 8 in Kultur) (siehe Abb.: 3-2).

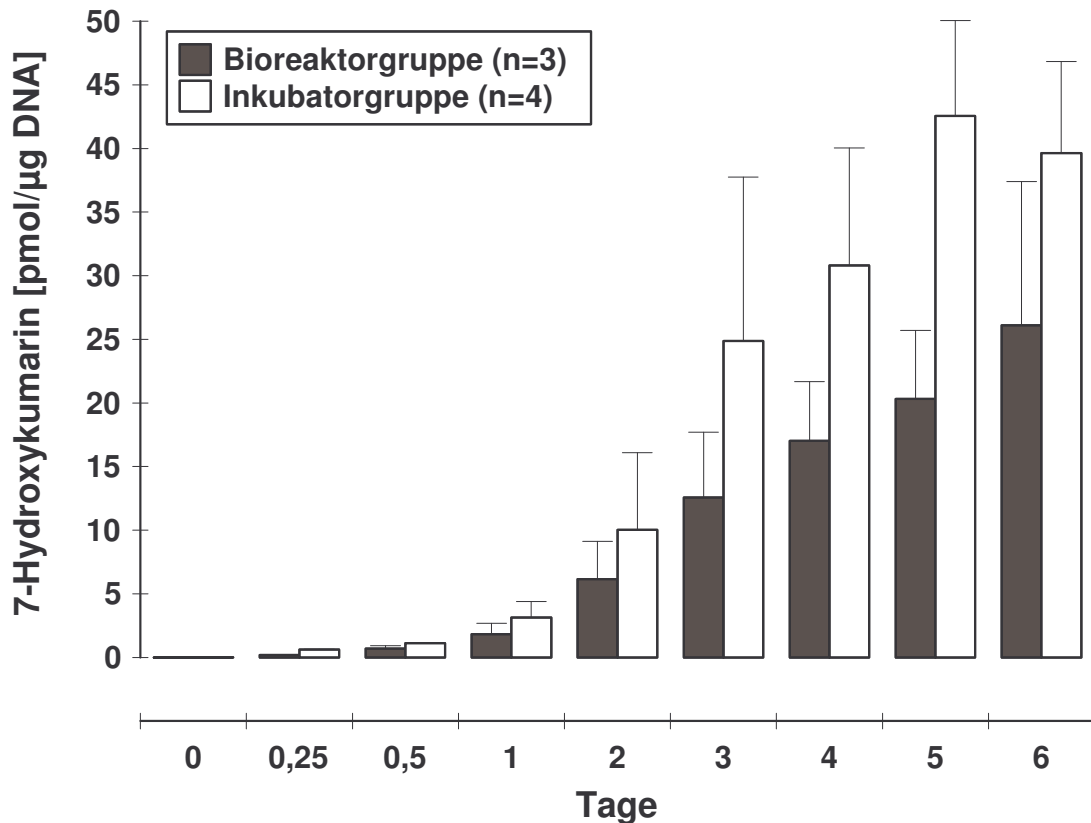


Abbildung 3-2: ECOD-Metabolismus der Bioreaktorgruppe verglichen mit der Inkubatorgruppe. Die Inkubatorgruppe zeigte höhere Metabolitenspiegel als die Bioreaktorgruppe. Die Werte repräsentieren Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von 7-Hydroxykumarin [pmol/μg DNA]. Nach 6 Tagen war der Unterschied zwischen den Gruppen im Students t-Test nicht signifikant ( $p > 0,16$ ).

### 3.2.3 LDH Leakage

Der Untergang von Zellen führt zu einer Freisetzung (Leakage) von streng intrazellulären Enzymen. Die Laktatdehydrogenase (LDH) ist ein intramitochondriales

Enzym, welches bei Zelluntergang im Medium nachgewiesen und als indirekter Zellvitalitätsparameter verwendet werden kann.

Ein Vorversuch zur Halbwertszeit von LDH ergab eine leichte Reduktion der LDH-Aktivität nach wenigen Tagen: Gepoolter Mediumüberstand mit hoher LDH-Aktivität wurde bei 37°C im Inkubator für mehrere Tage aufbewahrt. Nach acht Tagen war die kumulativ gemessene Enzymaktivität  $80\% \pm 4$  (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung) ( $n=3$ ) der initial gemessenen Aktivität. Von dieser Instabilität der nachzuweisenden Enzymaktivität waren beide Versuchsgruppen betroffen; daher konnte der Parameter ohne Korrekturfaktor in die Berechnung einfließen.

Die LDH-Aktivität im Medium der Bioreaktorgruppe ( $n=3$ ), bezogen auf den DNA-Gehalt der Kulturen [mU/ $\mu$ g DNA], betrug  $3,22 \pm 2,90$  (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung) am Tag 4 und  $11,97 \pm 4,82$  am Tag 9 nach Zellaussaat (entspricht Perfusionstag 6). Im Medium der Inkubatorkontrollgruppe ( $n=3$ ) wurde  $2,25 \pm 0,80$  [mU/ $\mu$ g DNA] am Tag 4 und  $13,53 \pm 0,69$  am Tag 9 nachgewiesen (siehe Abb.: 3-3).

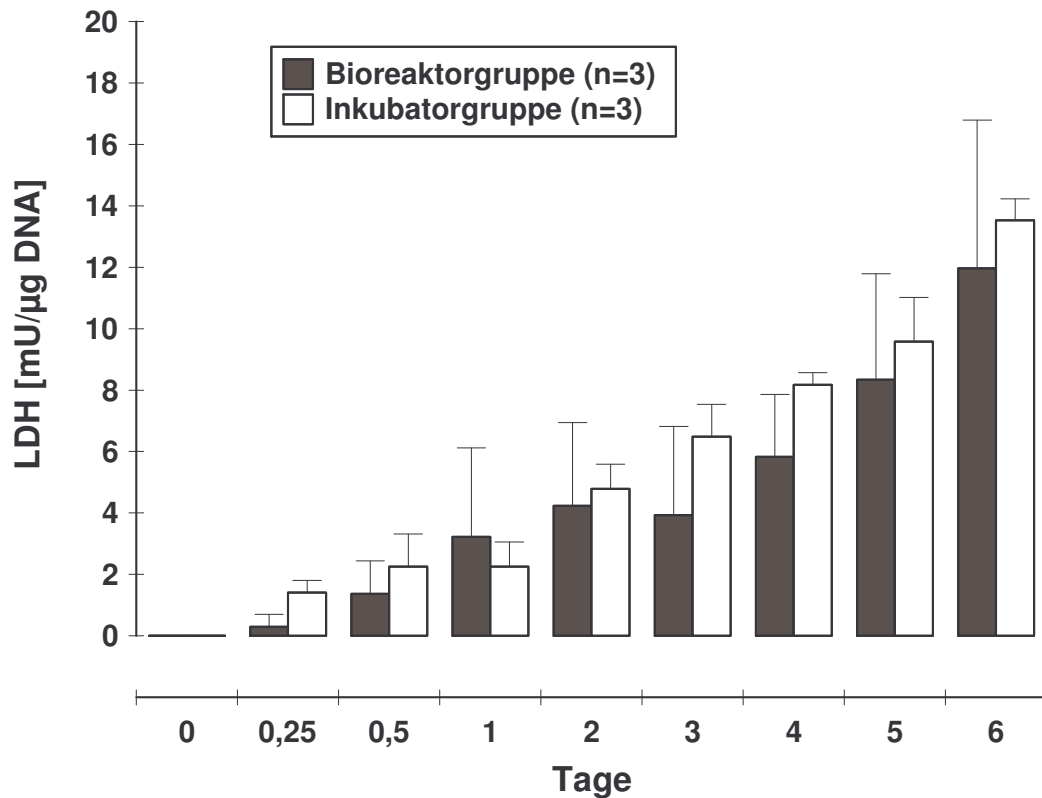


Abbildung 3-3: LDH-Aktivität im Medium der Bioreaktorgruppe verglichen mit der Inkubatorgruppe als indirekter Vitalitätsparameter. Die Bioreaktorgruppe zeigte eine leicht geringere Enzymfreisetzung als die Inkubatorgruppe, die sich jedoch nicht signifikant unterscheidet. Die Werte repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von LDH im Medium auf DNA bezogen [mU/µg DNA]

### 3.2.4 Morphologie der Hepatozyten während der Perfusion

Durch die Position des Kulturträgers auf dem Mikroskop-Tisch konnte eine videoassistierte Langzeitbeobachtung morphologischer Veränderungen im Kulturverbund realisiert werden. Dabei zeigten die Bioreaktorkulturen bei Beginn der Perfusion (Tag drei nach Isolierung) eine sehr gute Morphologie mit deutlicher Kernpräsentation, klaren Zellgrenzen und ohne wesentliche Zelleinschlüsse. Über vier Tage in Perfusion blieb die Morphologie weitgehend intakt (siehe Abb.: 3-4).

Eine Zunahme von intrazellulären Vakuolen begann etwa nach 24 Stunden in Perfusion. Nach Tag 7 unter Perfusion zeigten sich bei mehr als 50% der Hepatozyten Zeichen eines Zelluntergangs. Dagegen konnte bei Inkubationskulturen über einen Zeitraum von bis zu 14 Tagen eine gut erhaltene Zellmorphologie beobachtet werden (siehe Abb.: 3-5).

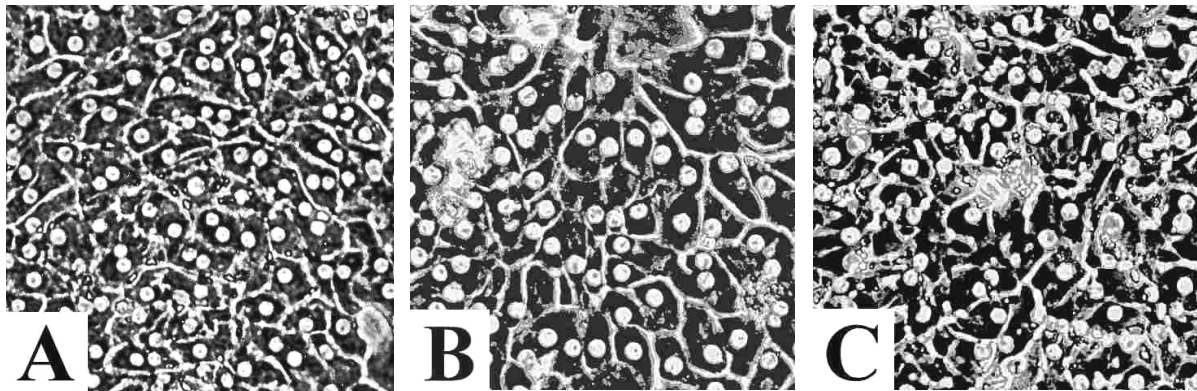


Abbildung 3-4: Mikroskopische Morphologie der Hepatozyten im Bioreaktor nach a) 1, b) 3 und c) 5 Tagen unter Perfusion (entspricht Tag 4, 7, 9 in Kultur). 200 fache Vergrößerung.

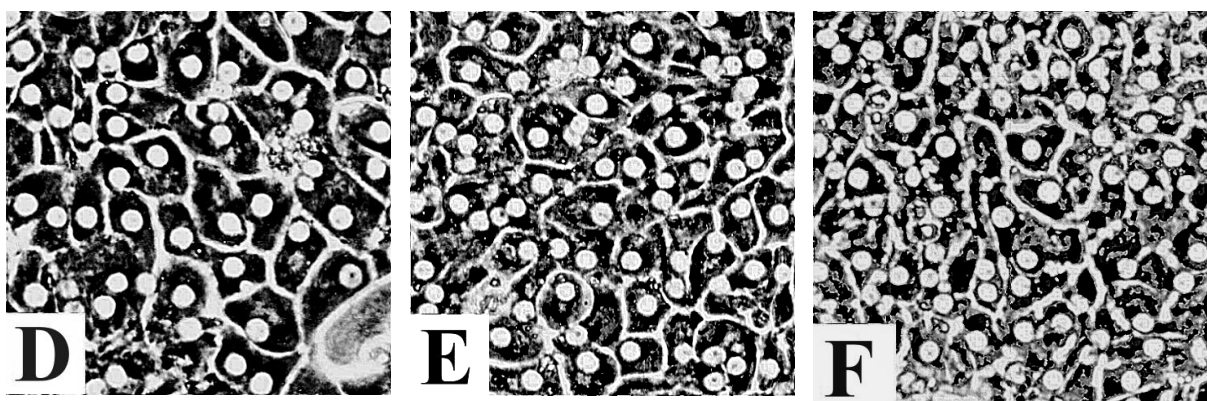


Abbildung 3-5: Morphologie der Hepatozyten im Inkubator nach d) 4, e) 7 und f) 9 Tagen. 200 fache Vergrößerung.

### **3.3 Cyclophosphamid-Metabolisation und -Aktivierung durch Schweinehepatozyten**

In zwei Vorversuchen wurde die Fähigkeit von Schweinehepatozyten, Cyclophosphamid zu verstoffwechseln, untersucht. Zum einen wurde der direkte Nachweis eines Metaboliten (Acrolein) durch HPLC angestrebt, zum anderen durch EAR-Messungen an Hepatozyten unter Cyclophosphamid- und Maphosphamid-Perfusion versucht, einen indirekten Aktivierungsnachweis zu erbringen.

#### **3.3.1 Acroleinnachweis als Metabolit von Cyclophosphamid**

Um den Nachweis der Metabolisation und Aktivierung von Cyclophosphamid durch Schweinehepatozyten zu erhalten, wurde Acrolein, ein Stoffwechselprodukt des aktivierten 4-OH-Cyclophosphamids, per HPLC (High-Performance Liquid Chromatographie) nachgewiesen (Bohnenstengel et al. 1997).

Um die Gesamtmenge der Substanzaktivierung im Kultursystem mit und ohne Kollagendeckel vergleichen zu können, wurden die gemessenen Ergebnisse im Medium mit dem Faktor 1,3 bei ungedeckelten Kulturen und mit dem Faktor 2,3 bei kollagengedeckelten Kulturen multipliziert, was dem Verteilungsvolumen (Medium und Kollagenschicht) in ml entsprach.

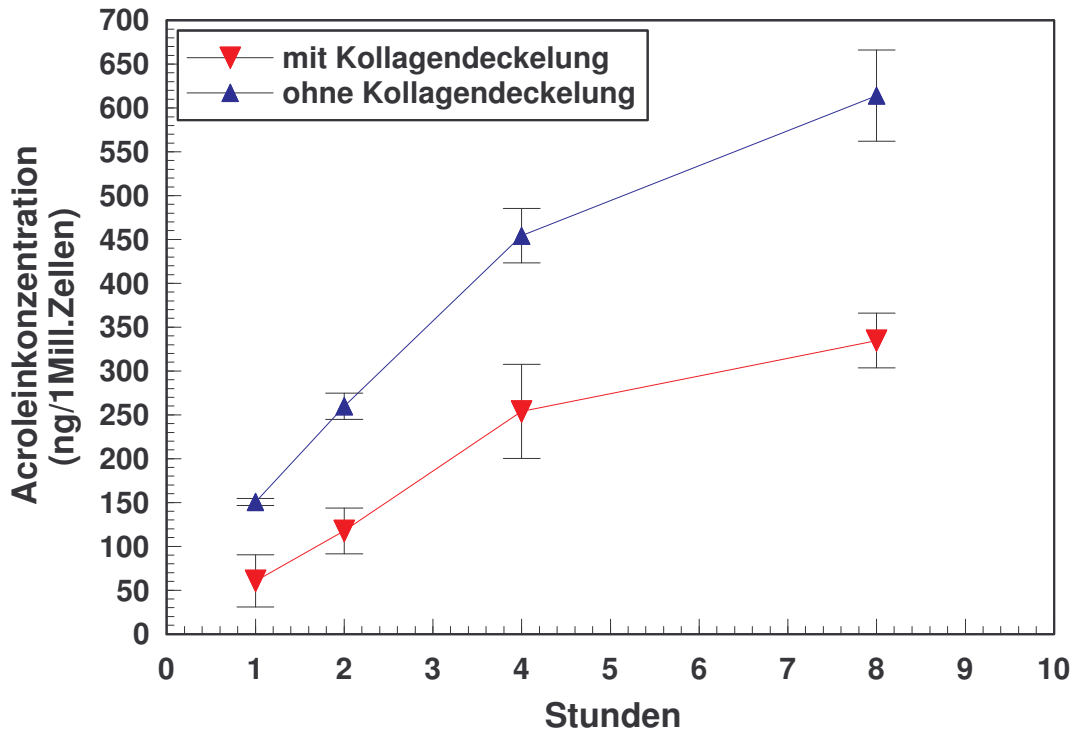


Abbildung 3-6: Acroleinnachweis in porkinen Hepatozytenkulturen durch HPLC. Die Inkubation erfolgte mit 1 mg/ml Cyclophosphamid. Die Werte repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung Acrolein im Extrazellulärraum (Kollagenschicht und Medium). Bei beiden Gruppen wurden die Hepatozyten auf eine 0,3 ml Kollagenschicht aufgebracht. Eine Gruppe wurde noch mit 1 ml Kollagen gedeckelt. Zum direkten Vergleich der Acroleinmenge im Extrazellulärraum wurden die im Medium gemessenen Werte mit dem extrazellulären Volumen multipliziert.

### 3.3.2 Indirekter Nachweis der Aktivierung von Cyclophosphamid

Ein weiterer Nachweis der Metabolisierung und Aktivierung von Cyclophosphamid wurde indirekt durch das Cytosensor® Microphysiometer geführt. In eine 12-well Kulturplatte, die speziell für das Microphysiometer erhältlich ist, wurden jeweils  $1,5 \times 10^5$  Schweinehepatozyten auf der Basalmembran kultiviert. Am dritten Tag erfolgte die Einbringung der Zellen in das Microphysiometer und die Perfusion mit Cyclophosphamid 3 und 30  $\mu\text{g/ml}$ , sowie mit Maphosphamid 3 und 30  $\mu\text{g/ml}$ . Als Medium wurde jeweils pufferfreies DMEM verwendet. Jeweils  $n=3$  bzw.  $n=2$  Zellpräparationen wurden für die Versuchsgruppe (Cyclophosphamidgruppe bzw. Maphosphamidgruppe) konsekutiv eingesetzt. Die jeweiligen Konzentrationen der beiden Substanzen wurden in zwei unabhängigen Perfusionskammern pro Zellpräparation parallel getestet, gemittelt (Doppelbestimmung) und mit der EAR von Schweinehepatozyten unter Perfusion von Kontrollmedium verglichen (Kontrollen wurden als 100% definiert). Nach 15 Stunden Perfusion zeigten die Schweinehepatozyten  $52,45\% \pm 16,76$  der EAR bei 3  $\mu\text{g/ml}$  und  $45,45\% \pm 14,64$  bei 30  $\mu\text{g/ml}$  CYCL (MW  $\pm$  Std.Abw.) im Vergleich zu den Kontrollzellen (100%). MAPH diente der internen Kontrolle, um die Chemosensibilität der Schweinehepatozyten auf die aktiven Metaboliten des CYCL nachzuweisen. MAPH zeigte ebenso Einfluss auf die EAR der Hepatozyten: nach 14 Stunden war die EAR  $81,4\% \pm 12,3$  bei 3  $\mu\text{g/ml}$  und  $75,9\% \pm 5,0$  bei 30  $\mu\text{g/ml}$  MAPH (siehe Abb.: 3-7 und Diskussion 4.2.2).



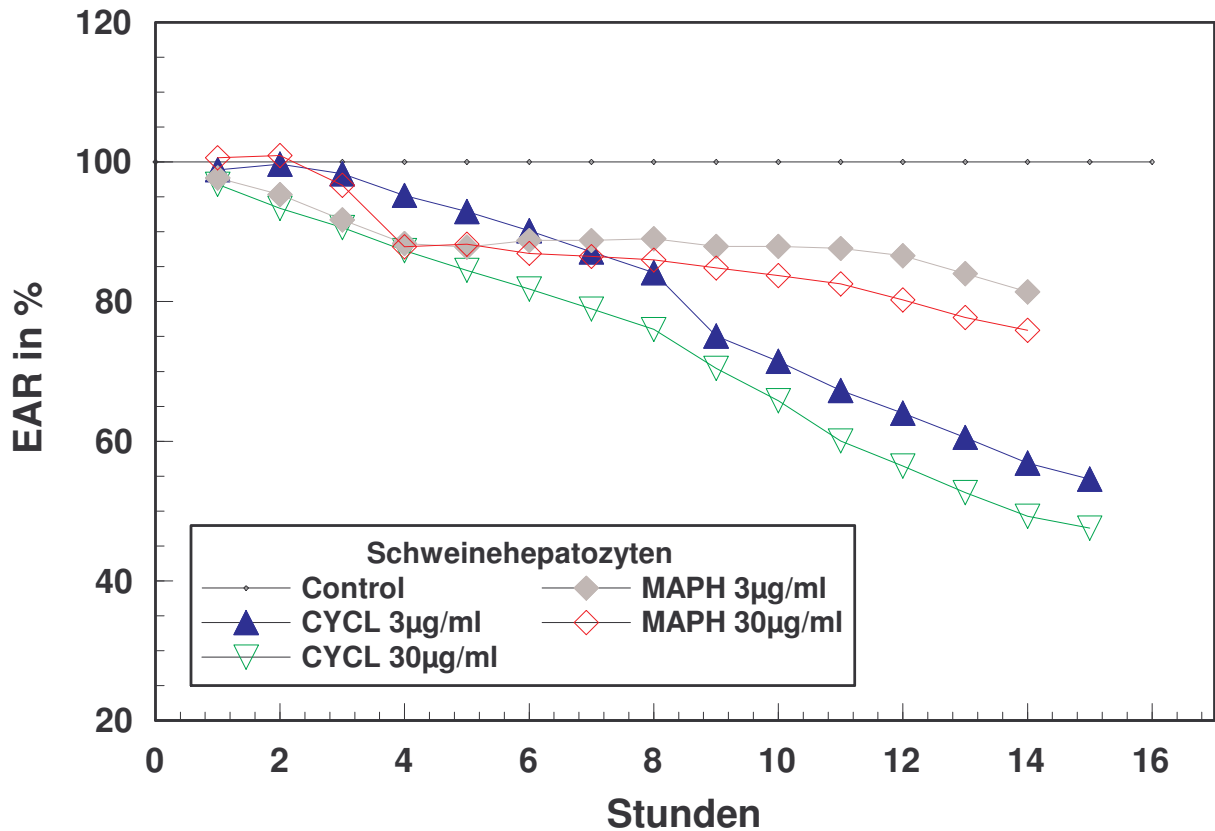


Abbildung 3-7: EAR von Schweinehepatozyten unter Cyclophosphamid- und Maphosphamidperfusion. Werte repräsentieren den Mittelwert. Cyclophosphamidgruppe (n=3), Maphosphamidgruppe (n=2). Die Cyclophosphamid-perfundierten Zellen zeigten einen stärkeren Abfall der EAR nach 8 Stunden.

### 3.4 CYCL und MAPH - Chemosensibilität von ZR 751 Zellen

Die Frage nach der Wirksamkeit (Chemosensibilität) der aktiven und der inaktiven Substanz auf die ZR 751 Zelllinie (humane Brustkrebszelllinie) gegenüber CYCL und MAPH wurde mit dem Cytosensor® Microphysiometer untersucht und ergänzend eine toxische Wirkung der inaktiven Substanz CYCL auf die ZR 751 Zellen

## Ergebnisse

---

ausgeschlossen. Die EAR der Zelllinie wurde unter Perfusion von zwei verschiedenen CYCL und MAPH Konzentrationen (3 und 30 µg/ml) gemessen.  $1,5 \times 10^5$  ZR 751 Zellen wurden pro Perfusionskammer installiert und DMEM ohne Puffer als Medium benützt. Perfundiertes CYCL (n=3, Doppelbestimmung) in seiner inaktiven Form zeigte nach neun Stunden keinen signifikanten Unterschied zu parallel getesteten ZR 751 Kontrollzellen (mit entsprechender EAR von 100%) ohne CYCL:  $96,28\% \pm 4,83$  (MW.  $\pm$  Std.Abw.) bei 3 µg/ml CYCL, bzw.  $100,11\% \pm 4,74$  bei 30µg/ml CYCL. Die aktive Substanz MAPH (n=3, Doppelbestimmung) zeigte nach neun Stunden eine Reduktion der EAR auf  $88,09\% \pm 10,09$  bei 3µg/ml MAPH und  $50,06\% \pm 23,65$  bei 30µg/ml gegenüber den Kontrollzellen (siehe Abb.: 3-8).

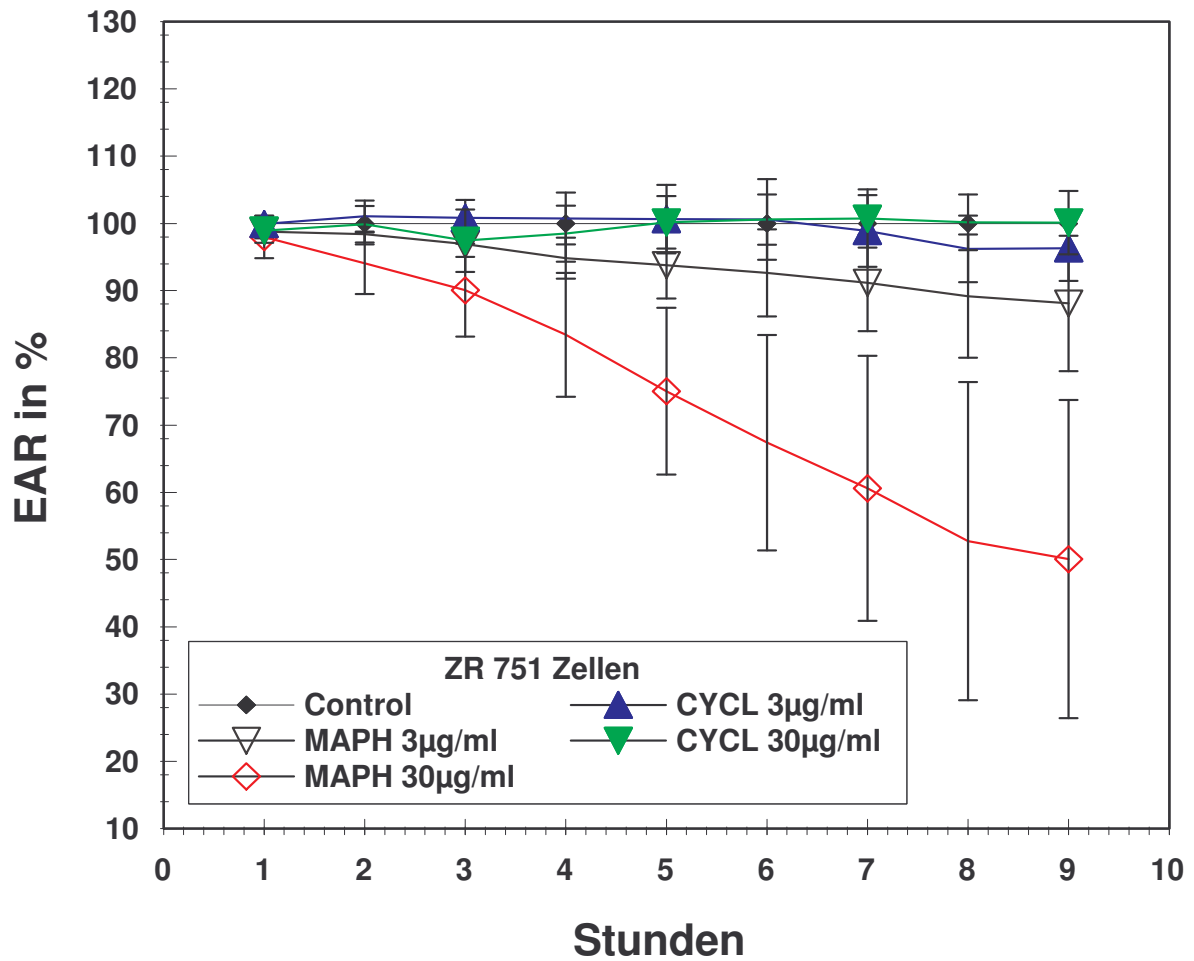


Abbildung 3-8: EAR von ZR 751 Zellen unter isolierter CYCL- und MAPH-Perfusion. Werte repräsentieren den Mittelwert mit Standardabweichung. Die Cyclophosphamid-perfundierten Zellen zeigten keine Veränderung in der EAR, während die Maphosphamid-perfundierten Zellen eine Dosis-abhängige Reduktion der EAR aufwiesen.

### 3.5 EAR von ZR 751 Zellen unter Perfusion mit Bioreaktor-aktiviertem Cyclophosphamid

Die Verbindung des Bioreaktors mit dem Microphysiometer erfolgte mit 50 ml pufferfreiem Medium und 30µg/ml Cyclophosphamid nach dreistündiger Vorperfusion des Bioreaktors in der beschriebenen Weise (siehe 2.10).

Es wurden vier Experimente mit Hepatozytenbioreaktoren durchgeführt, deren Zellen aus konsekutiven Isolationen stammten. Diese wurden jeweils mit drei Microphysiometer–Perfusionskammern verbunden (Versuchsanordnung siehe Abb.: 2-12). Als Kontrollgruppe wurden Perfusionen ohne hinzugefügtes CYCL gemessen. Die EAR der Kontrollgruppe entsprach definitionsgemäß 100% Aktivität. Nach einer Stunde zeigte die ZR 751 Zelllinie unter CYCL eine EAR von  $98,99\% \pm 3,15$  (MW.  $\pm$  Std.Abw.) und nach sieben Stunden  $79,44\% \pm 12,62$ , verglichen mit der Kontrollgruppe. Vergleicht man diesen 7-Stunden Wert mit dem analogen EAR-Wert der ZR 751 Zellen mit inaktivierten CYCL (30 µg/ml) aus dem bereits beschriebenen Versuch ( $100,72\% \pm 5,31$ ; siehe auch Abb.: 3-8), so stellt dies im ungepaarten Students t-Test einen signifikanten Unterschied dar ( $p < 0,05$ ) (siehe Abb.: 3-9).

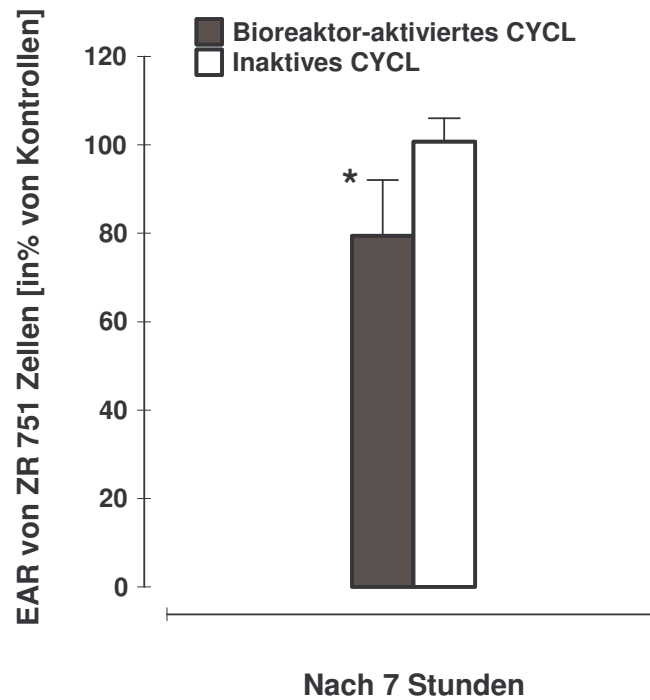


Abbildung 3-9: EAR von ZR 751 Zellen nach 7 Stunden im Direktvergleich: Der linke Balken entspricht Zellen, die mit Bioreaktor-aktiviertem Cyclophosphamid perfundiert wurden im Vergleich zu einem Kontrollversuch ohne Cyclophosphamid. Der rechte Balken zeigt Zellen, die mit Cyclophosphamid ohne Bioreaktoraktivierung perfundiert wurden im Vergleich zu einem Kontrollversuch ohne Cyclophosphamid. Werte repräsentieren den Mittelwert und Standardabweichung. ( $p < 0,05$ , im Students t-Test)

## Ergebnisse

Medium für das Microphysiometer enthielt	EAR der ZR 751 Zellen nach 1h (Vergleich zu Kontrolle)	EAR nach 7 h (Vergleich zu Kontrolle)	Anzahl der Experimente
Cyclophosphamid 3 µg/ml	99.91% ± 1.26	98.87% ± 5.34	n=3
Cyclophosphamid 30 µg/ml	98.94% ± 1.83	100.72% ± 5.31	n=3
Maphosphamid 3 µg/ml	98.81% ± 1.03	91.15% ± 7.19	n=3
Maphosphamid 30 µg/ml	97.96% ± 3.14	60.60% ± 19.70	n=3
Bioreaktoraktiviertes Cyclophosphamid 30 µg/ml	98.99% ± 3.15	79.44% ± 12.62	n=4

Tabelle 3-2: Zusammenfassung der EAR-Veränderungen unter Perfusion von CYCL, MAPH isoliert und CYCL nach Bioreaktoraktivierung. Die Ergebnisse zeigen eine gleichsinnige Beeinflussung der EAR durch den aktiven Metaboliten und die aktivierte Muttersubstanz.

## 4. Diskussion

Während der präklinischen Entwicklungsphase von neuen Medikamenten wird versucht (siehe auch 1.3) die Veränderung einer Substanz durch deren Metabolisation in der Leber vorherzusagen. Dabei werden präklinisch Kombinationen von *in vivo* und *in vitro* Untersuchungen an verschiedenen Tier-Spezies eingesetzt. Die Untersuchungen sollen die Bioverfügbarkeit, die direkte und latente Toxizität und die Metabolisationswege neuer Substanzen präzisieren (vgl. 1.3 / 4.1).

Für die Bestimmung der Toxizität von Xenobiotika werden bei den *in vitro* Versuchen Leberzellen in verschiedenen Konfigurationen verwendet (Guillouzo et al. 1997; Davila et al. 1998; Guillouzo 1998; Morel et al. 1997). Dabei überprüfen die meisten *in vitro* Toxizitätstests die Wirkung der untersuchten Stoffe vor und nach Biotransformation (direkte und latente Toxizität) nur auf die Hepatozyten selbst

(Ballet 1997; Castell et al. 1997). Hepatozyten werden dabei in ihrer jeweiligen *in vitro*-Aufbereitung (Suspension / Kultur / Gewebsscheiben / Mikrosomen) mit verschiedenen Stoffen und in unterschiedlichen Konzentrationen inkubiert, wobei jeweils Syntheseleistung, Metabolisierungs-Kapazität und morphologische Zellintegrität getestet wird.

Einige Substanzen (z.B. Prodrugs) können ihre Wirkung am Zielorgan im Körper erst nach einer Bioaktivierung durch die Leber entfalten. Andere Substrate entwickeln bei der Leberpassage Metaboliten, welche an Zielzellen toxische Effekte bewirken können. Für beide Konstellationen kann Cyclophosphamid als stellvertretende Modellsubstanz herangezogen werden, da es eine zytostatische, also toxische Wirkung auf proliferierende Zellen nach der Leberpassage besitzt. Diese Situation der Zielzellenwirkung ist in Versuchsmodellen bislang schwer nachzuahmen.

Einige *in vitro*-Modelle wurden für den Zweck, eine Zielzellenwirkung nach Lebermetabolisierung von Substanzen zu untersuchen, vorgestellt, werden aber noch nicht routinemäßig eingesetzt. Sie verwenden in der Regel direkte statische Kokulturen von Hepatozyten oder Hepatomazelllinien als exogenes Bioaktivierungssystem in Verbindung mit Zielzellen in einer Zellkulturschale oder Zielgeweben (El-Mir et al. 1998; Ozolins et al. 1995; Scholz et al. 1998; Fabre et al. 1990; Guillouzo 1998; Oglesby et al. 1986). Ozolins et al. kokultivierte Hepatozyten von adulten Mäusen für 24 Stunden mit Mäuseembryonen und demonstrierte eine Abhängigkeit der Cyclophosphamid-Embryotoxizität von der Präsenz der mütterlichen Hepatozyten. Die Toxizität des zugefügten Cyclophosphamids wurde an einer signifikanten Störung der Embryonenentwicklung in Kokultur gezeigt und war ohne kokultivierte mütterliche Hepatozyten nicht nachweisbar (Ozolins et al. 1995).

Als weitere Kokulturform werden Zellkulturinserts mit Cytochrom P 450-transfizierten V79-Hamsterfibroblasten in Zielzellkulturen (nicht transfizierte V79-Fibroblasten) eingesetzt, um eine kontinuierliche Metabolisierung von Substanzen wie Cyclophosphamid zu erreichen (Philip et al. 1999). Der toxische Effekt an den Zielzellen wird nach der Kokultivierung mit einem MTT-Test untersucht, der auf der Reduzierung eines Tetrazolium-basierten Stoffes (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)2,5-Diphenyltetrazoliumbromid) durch vitale Zellen zu einem bläulichen Formazan-Produkt beruht (Ballet 1997; Philip et al. 1999). Nach CYCL-Inkubation zeigten die nicht transfizierten V79 Zellen alleine keine signifikante Zytotoxizität im MTT-Test. Bei der Kokultur mit CYP 2B1 - transfizierten V79 Zellen wurde nach 48 Stunden CYCL-Inkubation (5mM) eine Reduktion der Vitalität im MTT-Test um etwa 30%, bei mit CYP 3A4- transfizierten Zellen um 20% beobachtet (Philip et al. 1999) und so die Aktivierung indirekt nachgewiesen.

Ein weiteres *in vitro*-System stellt die Mikrosomeninkubation dar. Hier werden Mikrosomen von Hepatozyten aufbereitet und alleine (Newman et al. 1990; Onderwater et al. 1999), oder auch als Kokultur zur Untersuchung der Metabolitenwirkung an Zielzellen verwendet. Meyer et al. untersuchte die Cyclophosphamid- und Ifosphamidaktivierung durch Mikrosomen an einer zytotoxischen Wirkung auf Neuroblastomzellen, die als Zielzellen verwendet wurden (Meyer et al. 1997). Ferner verglich er dieses System mit einer aufwendigen Rattenleberperfusionsmethode, bei der im Intervall Proben eines Ifosphamidperfusats entnommen und auf Neuroblastomzellkulturen gegeben wurden. Anschließend durchliefen diese den MTT-Test. Die verwendete SK-N-LO Neuroblastom-Zelllinie zeigte nach 4 Stunden Kokultivierung mit Rattenmikrosomen eine konzentrationsabhängige Reduktion der Vitalität um 80% bei 10000µMol/l CYCL



nach 4 Tagen und eine ähnliche Reduktion unter Inkubation von Ifosphamid, welches ebenso durch Mikrosomen aktiviert werden muss wie CYCL. Ohne Mikrosomenzusatz zeigte die Zelllinie keine toxische Reaktion. Die Ergebnisse der Ifosphamid-Rattenleberperfusion waren - bei höherem technischen Aufwand - mit den Ergebnissen der Mikrosomenkokultivierung vergleichbar.

Das in dieser Arbeit vorgestellte Toxizitätsmodell besteht aus einem Hepatozytenbioreaktor, der in einem neuartigen kombinierten Versuchsansatz als Metabolisationseinheit verwendet wird. Das metabolisierte Produkt (CYCL) wird dabei an Zielzellen in der angeschlossenen Indikatoreinheit untersucht. In den folgenden Abschnitten werden die Etablierung dieses Modells und eine exemplarische Anwendung im Einzelnen diskutiert.

### 4.1 Diskussion der Methodik

Für die Etablierung eines *in vitro* Hepatozytenbioreaktors, der die hepatische Metabolisation *in vivo* präzisieren soll, muss die Auswahl eines Zellkulturmodells und die Wahl der Zellspenderspezies und -quelle getroffen werden. Ferner müssen die Zellen in geeigneter Weise in einem Perfusionssystem eingesetzt werden, um einen Bioreaktor zu bilden. In den folgenden Punkten werden die Methodiken des Bioreaktor-Aufbaus mit seinem organischen Funktionszentrum (4.1.1 - 4.1.5) und die verwendete Messung der extrazellulären Azidifizierungsrate als Parameter der Toxizität (4.1.6) diskutiert.

### 4.1.1 Zellquelle: primäre Hepatozyten

Leberzellen als biologische Funktionsträger werden in unterschiedlichen Aufbereitungen für die Untersuchung der *in vitro* Metabolisation eingesetzt: Hierzu zählen die isolierte Organperfusion, die Leberscheibchentechnik („Liver slices“), Hepatom Zelllinien, Mikrosomen, genetisch veränderte Zelllinien und primäre Hepatozyten.

Für die isolierte Leberperfusion (Meyer et al. 1997) wird ein operativ isoliertes Organ perfundiert und das Perfusat untersucht. Die Perfusion z.B. einer Rattenleber erlaubt einen Beobachtungszeitraum von 2-3 Stunden und testet ein einziges Substrat (Morel et al. 1997). Für umfassende Untersuchungen sind viele Organe notwendig, eine Einsparung von Tierversuchen ist nicht zu realisieren.

Bei der Leberscheibchentechnik („Liver slice“), bei der kleinste Scheiben der Leber als Funktionseinheit hergestellt werden, sind die morphologischen Strukturen der Läppchen und die Enzymaktivität bis zu 2 Tage erhalten. Reihenexperimente mit mehreren Substraten sind mit einer aufbereiteten Rattenleber oder einem humanen Lebersegment möglich, wobei es jedoch zu einer Variabilität unter den Leberscheibchen kommt (interassay variability), da nicht alle mit gleicher Qualität erhalten werden können (Guillouzo et al. 1997; Morel et al. 1997). Diese Technik gewann aufgrund der einfachen Durchführung in der pharmakologischen Forschung zunehmend an Bedeutung (Guillouzo 1998).

Hepatom Zelllinien sind künstlich immortalisierte Hepatozyten, die in größerer Zahl zur Verfügung stehen, da sie passagierbar und somit vermehrbar sind. Sie sind in vielen originären Funktionen, wie in der zuverlässigen Aufrechterhaltung des Phase I und II Metabolismus (siehe auch 1.1) limitiert. Es kommt im Kulturverlauf zu einem

variablen Verlust der Enzymausstattung und zu einer Instabilität des Genotyps, weshalb sie keine sicher übertragbaren metabolischen Ergebnisse zulassen (Guillouzo et al. 1993; Guillouzo 1998). Für metabolische Untersuchungen ist der Einsatz dieser stetig verfügbaren Zelllinien daher nicht gut geeignet.

Für die Mikrosomenzubereitung werden Hepatozyten lysiert und deren Mikrosomen extrahiert und eingefroren. Mit diesen können kurzzeitige Metabolisationsversuche (1-2 Stunden) des Phase I Stoffwechsel durchgeführt werden. Bei der Phase I werden Stoffe vorwiegend durch die Cytochrom P 450 Enzymgruppen oxydiert und hydroxyliert. Da die Phase II Reaktionen (Koppelungsreaktionen an Glucuronsäuren oder Schwefelsäuren an hydroxylierten und nicht hydroxylierten Gruppen) im Zytosol der Hepatozyten vorgenommen werden, können sie mit Mikrosomen nicht durchgeführt werden (Morel et al. 1997). Mikrosomenuntersuchungen sind beispielsweise für die orientierende Strukturanalyse von Phase I Metaboliten neuartiger Xenobiotika sinnvoll, wenngleich kein vollständiges Metabolismusprofil erstellt werden kann. Mikrosomen sind jederzeit verfügbar, was ihren häufigen Einsatz in der Metabolisationsforschung erklärt (Yamazaki et al. 1996; Bohnenstengel et al. 1997; Guillouzo 1998).

Zelllinien, die mit einem oder mehreren Cytochrom P 450 Enzymen transfiziert wurden (Philip et al. 1999), sind eine neue Alternative in der Metabolisationsforschung. Diese gentechnisch veränderten Zellen weisen keine physiologischen Cytochromspiegel auf, sondern exprimieren die transfizierten Cytochrome in unphysiologischer Menge. Sie sollten daher nur für qualitative Metabolisationsversuche eingesetzt werden (Guillouzo et al. 1997). Da nicht alle Cytochromfamilien exprimiert werden, können diese Zelllinien nicht als präklinisches Metabolisations-Screening neuartiger Substanzen dienen. Ihr Haupteinsatz liegt in

der Metabolisation und Aktivierung von Substanzen, deren Metabolisationswege bereits bekannt sind, oder selektiv überprüft werden sollen (Guillouzo et al. 1997).

Die bei den beschriebenen Versuchen eingesetzten primären Hepatozyten werden durch Zellisolierung gewonnen und anschließend kultiviert. In dieser Form können Hepatozyten *in vitro* differenzierte leberspezifische Funktionen für mehrere Tage aufrechterhalten, wie den Phase I und II Metabolismus und die Proteinsynthese (Morel et al. 1997; Guillouzo et al. 1997). Verschiedene Enzymsysteme können ähnlich der *in vivo* Situation induziert und inhibiert werden (Berthiaume et al. 1996; Ulrich et al. 1995; DelRaso 1993; Martin et al. 1998). Daher sind primäre Hepatozyten (Ratte/Mensch) sehr gut für die prädiktiven Stoffwechseluntersuchungen von neuartigen Substanzen geeignet und werden oft in der pharmazeutischen Forschung eingesetzt (Guillouzo 1998).

### 4.1.2 Porkine Spenderspezies

Für die Xenobiotika-Forschung ist die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf das menschliche Metabolisationsprofil sowie die zuverlässige Verfügbarkeit und die Reproduzierbarkeit eines Testsystems wichtig (Davila et al. 1998).

Bei prädiktiven Metabolismusuntersuchungen für den Menschen sind humane Hepatozytenpräparationen am besten geeignet, da andere Spenderspezies, wie die häufig verwendeten Rattenspezies, teilweise eine unterschiedliche Enzymausstattung aufweisen und gewonnene Ergebnisse nicht immer auf den Menschen übertragbar sind (Berry et al. 1997; Castell et al. 1997; Ulrich et al. 1995). Selbst innerhalb der humanen Spezies treten bereits verschiedene Expressionsmuster der Cytochromfamilie P450 auf, die auf Induktionsphänomenen,

z.B. nach Medikamenteneinnahme und auf genetischen Faktoren beruhen (Guillouzo 1998).

Die Verfügbarkeit von primären humanen Hepatozyten für die Forschung ist limitiert. Sie ist von der Aktivität Chirurgischer Kliniken abhängig, die Lebereingriffe durchführen. Humane Hepatozyten mit guter Qualität können bei primären und sekundären Lebertumorresektionen gewonnen werden (Guillouzo 1995). Bei der Verwendung dieser Hepatozyten sind die angewandten Untersuchungen an die Verfügbarkeit gekoppelt und damit zeitlich nicht planbar und örtlich an die Kliniken gebunden. Die Möglichkeit einer Konservierung von Hepatozyten in Form einer Zellbank ist durch die schlechte Reproduzierbarkeit von den Ergebnissen existierender Einfrierprotokollen limitiert; bis zu 50% der in Stickstoff kryokonservierten humanen Hepatozyten verlieren die Fähigkeit zur Adhäsion an eine Kulturoberfläche (Guillouzo 1998). Bei der Verwendung von menschlichen Geweben ergibt sich zudem eine „ethische“ Problematik, die sich vor allem bei kommerziellen Untersuchungen für die pharmazeutische Industrie mit humanen Hepatozyten ergibt (Guillouzo 1998).

Jederzeit im Rahmen von bewilligten Tierversuchen verfügbar sind Hepatozyten von Lebendspendern, wie Ratten (Paine 1990; Ulrich et al. 1995; Ohno et al. 1998) oder weniger häufig andere Kleinnager, Hunde und weitere Spezies (Singh et al. 1996; Reitz et al. 1996; Chenery et al. 1987). Entsprechend werden insbesondere primäre Rattenhepatozyten für Metabolisations- und Toxizitätsexperimenten verwendet (Guillouzo 1998; Bisgaard et al. 1989). Aus den o.g. Gründen der Berücksichtigung interindividueller Spezies-Unterschiede und aus tierschützerischer Motivation besteht der Bedarf nach alternativen Zell-Quellen.

Die Verwendung von primären Schweinehepatozyten aus Schlachthoforganen für *in vitro* Versuche erfüllt die Anforderungen nach kurzfristiger Verfügbarkeit sowie tierschützerischen Aspekten (Koebe et al. 1995; Kane et al. 1994). Auch eine Massenzellisolation ist möglich, wie es aufwendigere Experimente und der Einsatz in Bioreaktoren erfordern, da Schlachthoforgane in großer Menge zur Verfügung stehen (Gerlach et al. 1994; Gerlach 1996; Koebe et al. 1995). Neuere Untersuchungen demonstrieren zudem, dass porkine Hepatozyten ein ähnliches Cytochrom P450-Metabolisationsmuster wie humane Mikrosomen und Hepatozyten aufweisen und beispielsweise Testosteron fast identisch metabolisieren (Donato et al. 1999; Desille et al. 1999). Somit empfehlen sich porkine Hepatozyten für weitere Metabolisationsuntersuchungen, in deren Verlauf die Vergleichbarkeit zu humanen Zellen weiter überprüft werden muss.

Die ethischen Vorzüge dieser Form der Zellgewinnung sind evident: Die Tiere müssen nicht für wissenschaftliche Untersuchungen isoliert geschlachtet werden, sondern dienen ohnehin der Fleischgewinnung. Hierdurch wird die Forderung nach einer Reduktion von Tierversuchen erfüllt, die viele Autoren stellen (Koebe et al. 1995; Jackson 1998; Goldberg 1995; Davila et al. 1998).

### 4.1.3 Zellisolationmethode

Die verwendete Zwei-Schritt-Kollagenaseperfusion zur Gewinnung von Leberzellen ist das Ergebnis eines Entwicklungsprozesses, der 1953 mit der Isolierung und Charakterisierung der Kollagenase von *Clostridium histolyticum* durch Mandl (Mandl et al. 1953) begann. Lasfargues isolierte 1957 mit diesem Enzym erfolgreich Epithelzellen (Lasfargues 1957). Ab 1961 war Kollagenase durch die *Worthington*

*Biochemical Corporation* kommerziell erhältlich und wurde für die Bearbeitung von verschiedenen Geweben genutzt. 1967 berichtete Howard et al. über die erste erfolgreiche Isolation von intakten Hepatozyten aus Rattenlebern (Howard et al. 1967). Er injizierte in alle größeren Sinusoide einer Rattenleber eine  $\text{Ca}^{2+}$ -freie balancierte Salzlösung (Hanks' Medium), die 0,05% Kollagenase und 0,1% Hyaluronidase enthielt. Anschließend wurde die Leber in Scheiben geschnitten, die wiederum in einer Enzymlösung inkubiert wurden. Diese Methode erlaubte es, etwa 3-5% der Leberzellen eines Organs intakt zu gewinnen. 1969 konnten Berry und Friend über eine Verbesserung der Methode durch eine in situ-Reperfusion der Leber mit Kollagenase-Andauung unter Oxygenierung berichten (Berry & Friend 1969). Sie erzielten mit dieser Ein-Schritt-Perfusion eine bis zu sechsmal höhere Zellausbeute als Howard. Berry und andere Autoren sahen die Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  als wichtigsten Faktor für die Trennung der Desmosomen und somit der Zellseparation an, da eine Zellseparation auch ohne proteolytisches Enzym erzielt werden konnte (Meredith 1988; Berry et al. 1997). Allerdings wurde festgestellt, dass bei einer niedrigen extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration auch eine Störung der  $\text{Na}^{+}$ - und  $\text{K}^{+}$ -Gradienten auftraten (Baur et al. 1975; Kolb et al. 1976). Daraufhin fügten die Befürworter der Ein-Schritt-Perfusion (ohne Kollagenase) nach der  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Perfusion wieder  $\text{Ca}^{2+}$  zu (early  $\text{Ca}^{2+}$  replacement) (Berry et al. 1991; Meredith 1988). Eine ähnliche Lösung des Problems erreichte zuvor Seglen mit seiner Zwei-Schritt-Kollagenaseperfusion (Seglen 1976). Er fügte nach einer 10 minütigen  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Perfusion einen Kollagenaseperfusionsschritt mit  $\text{Ca}^{2+}$  (1 mmol/l) hinzu, denn die Aktivität der Kollagenase bei der Leberperfusion war nach seinen Untersuchungen an die Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  (Seglen 1972) gebunden.

Es gab Versuche mit anderen Enzymen, wie beispielsweise Trypsin, um eine Optimierung der Zellpräparation zu erreichen (Miyazaki et al. 1988). Dies setzte sich allerdings wegen ungenügender Zellausbeute nicht durch.

Bei den hier vorgestellten Untersuchungen wurde eine Zellisolierungsmethode (siehe auch 2.2) verwendet, die der Zwei-Schritt-Perfusionsmethode von Seglen (Seglen 1976) mit einigen Modifikationen entspricht (Koebe et al. 1995):

Bei der Isolation der Hepatozyten aus porkinen Schlachthoftieren erwiesen sich die Ischämiezeiten und die Kollagenaseandauung als kritische Faktoren. Die Ischämiezeit war ein variabler Parameter, der unter anderem abhängig von den Schlachthofabläufen und damit wenig beeinflussbar war.

Die Aktivität der Kollagenase bei der Rezirkulation erwies sich als chargenabhängig und stark unterschiedlich, da die kommerziell erhältlichen Kollagenasepräparationen meist einen stark variierenden unreinen Anteil anderer Enzymeigenschaften wie Clostripain, tryptische- und Caseinase-Aktivität enthalten (Berry et al. 1997). Wir folgten den Empfehlungen, verschiedene Kollagenase-Chargen auszutesten, um dann einen geeigneten Batch zu definieren, der vergleichbare Ergebnisse bei der Zellisolation ermöglichte (Berry et al. 1997).

Die Zellausbeute dieser Methode liegt bei  $1,92 \pm 0,5 \times 10^9$  Zellen pro Leberlappen mit einer Vitalität von  $93\% \pm 2$ , was einer Zellausbeute von  $1,0 \pm 0,3 \times 10^7/g$  Lebergewebe entspricht (Koebe et al. 1995). Die Kontamination der gewonnenen Zellsuspension mit nichtparenchymale Zellen (NPZ) (Kupffer -, Endothel-, oder Itozellen) betrug unter 5%. Durch die in 2.2 beschriebene Isolationsmethode konnten Schlachthoforgane als Spender erfolgreich verwendet werden, die bei anderen Autoren nur mit deutlich schlechteren Ergebnissen als Zellspender eingesetzt



wurden (Gerlach et al. 1993). Das häufig diskutierte erhöhte Kontaminationsrisiko bei der Verwendung von Schlachthoforganen führte bei den eigenen Untersuchungen nicht zu Sterilitätsproblemen. Die Zahl der beobachteten Kontaminationen war mit unter 3% gering.

### 4.1.4 Zellkulturbedingungen

#### 4.1.4.1 Sandwich-Zellkulturmodell

Ein hepatozelluläres *in vitro* Primärzellkultursystem zur Metabolisations- und Toxizitätstestung soll dem Untersucher für einen ausreichenden Zeitraum die Zellintegrität und den Phase I und II Metabolismus stabil zur Verfügung stellen. Dabei ist die Aufrechterhaltung der Vitalität der Hepatozyten in einem physiologischen Milieu von entscheidender Bedeutung (Guillouzo 1998; Guillouzo et al. 1997; Morel et al. 1997; Kuiper 1996). Eine schnelle Verfügbarkeit und eine einfache Handhabung des Zellkultursystems sind wünschenswert.

Bei der Verwendung von Perfusionskulturen werden besondere zusätzliche Anforderungen an das Zellkulturmodell gestellt, da eine mechanische Belastung auf die Zellen im Kulturverband in Form von Scherwirkungen auftritt (Berthiaume et al. 1996).

Verschiedene zur Verfügung stehende Zellkulturmodelle für primäre Hepatozyten stellen entweder eine Nativkultur dar, wie die Suspensions- oder die Plastikträgerkulturen, oder basieren auf einer zusätzlichen extrazellulären Zellmatrix. Hauptunterschied bei den Kulturmodellen ist die mögliche Dauer der Aufrechterhaltung von leberspezifischen Funktionen und des Zellüberlebens.

Auf Plastikträgern überleben Rattenhepatozyten wenige Tage als Primärkultur und zeigen zudem einen raschen Verfall der leberspezifischen Funktionen (Bissell et al. 1973). In Suspension mit Medium ohne Kultivierung zeigen humane Hepatozyten bereits nach einigen Stunden einen Funktionsabfall und Vitalitätsverlust (Tee et al. 1985).

Hepatozyten, die nach der Isolierung auf einer extrazellulären Matrix, wie einer gelierten Kollagenschicht kultiviert werden, können dagegen ihre hepatozellulären Metabolisationsfunktionen länger aufrechterhalten (Michalopoulos et al. 1975). Die Hepatozyten adhären im Kulturvorgang spezifisch auf den Matrixproteinen. Besonders bei einer kollagenhaltigen Matrix bilden sich dabei morphologisch *in vivo*-Charakteristika aus (Michalopoulos et al. 1975; Hughes et al. 1987; Gerlach et al. 1990a). Andere Matrixproteine, wie Fibronectin, zeigen keine eindeutige Verbesserung der Zellkultur im Vergleich zu Kollagen (Marceau et al. 1982; Hughes et al. 1987) und werden daher selten eingesetzt.

Eine Reihe von Matrices auf der Basis einer Kollagenpräparation findet bei den verschiedenen Kulturmodellen Verwendung und bietet gute Kultureigenschaften für Hepatozyten. Dazu gehören die Biomatrix, das Matrigel®, das Vitrogen® und die Sandwichtechnik.

Die „Biomatrix“ stellt eine komplexe Bindegewebsmatrix dar, die aus homogenisierter Rattenleber hergestellt wird und alle bekannten Kollagentypen sowie Basalmembranen enthält. Mit dieser Methode werden Hepatozytenkulturzeiten von Ratten bis zu 5 Monaten beschrieben (Reid et al. 1980; Rojkind et al. 1980).

Das Matrigel®, aus dem Engle-Holm-Swarm-Sarkom der Maus gewonnen, wurde ebenso als komplexe extrazelluläre Matrixzusammensetzung vorgestellt (Orkin et al.

1977) und ist kommerziell erhältlich. Diese Matrix enthält Laminin, Kollagen Typ IV und Heparansulfatproteoglykan als Hauptbestandteile und wurde für die Anwendung in Zellkultursystemen adaptiert (Bissell et al. 1987; Schuetz et al. 1988). In diesem Milieu schaffen sich die Hepatozyten eine dreidimensionale Ausrichtung, präsentieren eine intakte morphologische Ultrastruktur und zeigen ein erhaltenes Transkriptions- und Expressionsmuster von leberspezifischen Genen (Bissell et al. 1987; Guzelian et al. 1988; Schuetz et al. 1988; Hunt et al. 1991).

Unter Verwendung von Vitrogen®, einem kommerziell erhältliches hydriertes Typ-I-Kollagen wird eine Kulturdauer von Rattenhepatozyten von bis zu 5 Wochen unter der Beibehaltung von biochemischen und morphologischen Charakteristika beschrieben (Waxman et al. 1990; Lindblad et al. 1991).

Die Sandwichtechnik besteht in der Hinzufügung einer Kollagenschicht als so genannten „Deckel“ zu einem bestehenden Hepatozytenmonolayer (Dunn et al. 1989). Diese Technik der Kultivierung zwischen zwei Kollagenmatrixschichten wird häufig auch als Double-Gel-Technik bezeichnet und ermöglicht den Hepatozyten eine *in vivo* ähnliche dreidimensionale Ausrichtung in der Kulturkonfiguration, wobei Albumin-, Harnstoff- und Gallensynthese, sowie Cytochrom-P450-Aktivität für bis zu 6 Wochen nachweisbar ist (Dunn et al. 1989; Berthiaume et al. 1996; Gomez-Lechon et al. 1998; Kern et al. 1997). In dieser einfach herzustellenden Sandwichkonfiguration ergeben sich bei Rattenhepatozyten signifikant höhere transkriptionale Aktivitäten für Albumin m-RNA als in den konventionellen Kulturen ohne Kollagendeckel, die den *in vivo* gemessenen Werten entsprechen (Dunn et al. 1992). Humane Hepatozyten können über ein bis zwei Monate im Sandwichsystem kultiviert werden und zeigen ihre typische polygonale Morphologie (Ryan et al. 1993).

Für porcine Hepatozyten in der Sandwichkultur wurde über eine Überlebenszeit von etwa zwei Wochen berichtet, wobei der Grund für die limitierte Lebensdauer der Zellen im Vergleich zu anderen Spezies nicht bekannt ist. (Pahernik et al. 1996; Koebe et al. 1995). Diesem Umstand wurde in der Wahl des Zeitfensters der eigenen Untersuchungen mit porcinen Hepatozyten Rechnung getragen.

Das Sandwichkulturverfahren bietet aus den vorgenannten Beobachtungen eine stabile physiologische Umgebung für primäre Hepatozytenkulturen *in vitro* und wurde daher als Methode für die eigenen Versuche verwendet. Das verwendete Sandwichverfahren eignet sich zudem besonders für Anwendungen im Perfusionskulturmodell, denn der Kollagendeckel schützt die Zellen vor den auftretenden Scherkräften und verhindert das Ablösen der Zellen von der Kulturmatrix (Berthiaume et al. 1996). Daraus resultiert eine verbesserte mechanische Stabilität des biologischen Funktionszentrums im Bioreaktor.

#### 4.1.4.2 Zellkulturmedium

Bei den Zellkulturmedien für Hepatozytenkulturen wurden verschiedene Zusätze zur Kulturoptimierung beschrieben (Berthiaume et al. 1996). Das in den eigenen Untersuchungen verwendete Kulturmedium enthielt DMEM mit dem Zusatz von Hydrokortison, Insulin, Glucagon und Fetalem Kälberserum (FCS; nur am ersten Kulturtag) in den Konzentrationen, die im Methodenteil angegeben wurden (siehe 2.1) (Koebe et al. 1994).

Einige Autoren berichten, dass der Mediumzusatz von L-Prolin und EGF zu einer vermehrten Albuminsekretion und verbesserten Kulturbedingungen führt (Lee et al. 1993; Berthiaume et al. 1996). Diese Zusätze fanden bei der Gestaltung des

Versuchsaufbaus keine Berücksichtigung, da auf ein gut definiertes Modell Wert gelegt und die Mediumzusätze auf ein erforderliches Minimum reduziert wurden. Die Kulturstabilität könnte durch eine entsprechende Modifikation der Zufügung von L-Prolin und EGF weiter verbessert werden.

Der Bioreaktor wurde als geschlossenes System konzipiert. Das Medium zirkulierte im Reaktor und wurde für die Dauer eines Versuches nicht gewechselt. Lediglich der durch die Probenabnahme erzeugte geringe Mediumverlust wurde mit der entsprechenden Menge an neuem Medium ersetzt. Dies stand im Gegensatz zu offenen Systemen, in denen das gesamte Medium in Intervallen gewechselt wird, oder nicht rezirkulierend perfundiert und somit immer frisch zugeführt wird. Das geschlossene System eröffnete die Möglichkeit, Synthese- und Metabolisationsprodukte akkumulierend zu messen. Ferner erlaubte ein geschlossenes System die Anhäufung bioaktiver Substanzen und ermöglichte so höhere Wirkspiegel der aktiven Metaboliten.

Ein geschlossenes System schließt die Gefahr des Substratmangels und der Anhäufung von Abfallstoffen nach mehreren Tagen und damit verbundenen möglichen negativen Kultureigenschaften mit ein. Für die Verwendung des Bioreaktors wurde daher ein entsprechend kleines Zeitfenster für die Untersuchungen in Verbindung mit dem Microphysiometer gewählt, in dem sich der Bioreaktor zuvor in den Untersuchungen zur Zellintegrität und den leberspezifischen Leistungen stabil gezeigt hatte (siehe auch 4.2.1). Auf die Problematik des Mediumverlustes in einem geschlossenen System durch Diffusion und Kondensation wird unter 4.1.5.2 im Detail eingegangen. Für eine Langzeitverfügbarkeit der Perfusionskultur müssen Modifikationen im Versuchsaufbau vorgenommen werden, die einen kontinuierlichen Mediumwechsel erlauben.

### 4.1.5 Bioreaktorkonfiguration und Perfusionssystem

#### 4.1.5.1 Überblick Hepatozytenbioreaktoren

Hybride Bioreaktoren verbinden ein organisches Funktionszentrum, welches Gewebe, Zellen oder Zellbestandteile enthält, mit einem technischen System aus Schlauchverbindungen, Inkubatoren und Mediumreservoir. Hepatozytenbioreaktoren wurden bislang vorwiegend für Anwendungen als Leberersatz-Verfahren entwickelt. In einigen Zentren befinden sich derartige Reaktoren in vorklinischen oder klinischen Tests, wobei unterschiedliche Systeme vorgestellt wurden (Chen et al. 1996; Watanabe et al. 1997; Busse, B et al. 1999; Riordan et al. 2000). Hier besteht das Fernziel in der Entwicklung einer „künstlichen Leber“ zur Behandlung des Leberversagens. Ohne an dieser Stelle auf die noch ungelösten Probleme dieser Forschungsrichtung eingehen zu können, darf hierzu zusammenfassend formuliert werden, dass es überzeugender Nachweise der Zell-Vitalität und funktionalen Aktivität der Hepatozyten bedarf, bevor die Stufe der klinischen Etablierung hybrider Leberersatz-Verfahren realisiert werden kann (Koebe et al. 1998).

Die Hepatozytenbioreaktoren unterscheiden sich in der Art und Organisation des organischen Funktionszentrums, also der Auswahl und Anordnung der Funktionsträger sowie in der Ausführung des technischen Systems, welches die Mediumzufuhr und die Aufrechterhaltung des biophysikalischen Milieus steuert. Bei Leberzellbioreaktoren werden meist ausschließlich Hepatozytenpräparationen verwendet. Nur vereinzelt berichteten Autoren über die Verwendung von Kokulturen in Bioreaktoren. Bhatia et al. setzte Hepatozyten gemeinsam mit anderen Zelltypen, wie epitheliale- oder mesenchymale Zellen, ein (Bhatia et al. 1998). Bhatia beschrieb

eine Steigerung der Albumin- und Harnstoffproduktion in Anwesenheit von Fibroblasten. Das von ihm vorgestellte Perfusionssystem existiert bislang nur als „small scale“ Modell, dessen Umsetzung in ein größeres Bioreaktorsystem noch aussteht.

Es können drei Hauptgruppen als Organisationsform von Hepatozyten im Funktionszentrum eines Bioreaktors unterschieden werden (Gerlach 1997): Suspensions-, Adhäsions- und Sphäroidkulturen, wobei die Abgrenzung der Methoden Unschärfen enthält.

Bei der Suspensionskultur werden die Zellen nach der Isolation im Kulturmedium resuspendiert. Die Hepatozyten können in hoher Zelldichte mit einem effektiven Zell-Medium Verhältnis kultiviert werden (Olumide et al. 1977). Die Zellen haben in der Suspensionsform optimalen Zugang zum Kulturmedium und somit zu den darin gelösten Nährstoffen. Da die Funktion der Hepatozyten an eine extrazelluläre Verankerungspflicht der Zellen mit ihrer Umgebung und untereinander gebunden ist (Berthiaume et al. 1996), zeigt sich ein Verlust der leberspezifischen Funktionen bei den Perfusions-Suspensionskulturen binnen weniger Stunden (Gerlach et al. 1989), wie zuvor bereits für die statischen Suspensionskulturen beschrieben worden war (Tee et al. 1985). Der Einsatz von Suspensionskulturen eignet sich nicht für *in vitro* Techniken, die eine längerfristige Funktion der Zellen in Kultur voraussetzen.

Die Adhäsionskultur (Attachmentkultur) ist bei den meisten derzeit verwendeten Bioreaktoren der Ausgangspunkt des Zellkulturmodells und trägt der o.g. Verankerungspflicht der Hepatozyten Rechnung (Berthiaume et al. 1996). Dabei werden die Hepatozyten auf einem Kulturuntergrund immobilisiert. Nachteile von immobilisierten Zellkulturen ergeben sich im Zell-Medium Verhältnis, da die adhärennten Zellen eine größere Oberfläche als Suspensionskulturen bilden.

So wurden Hepatozyten beispielsweise von Yanagi et al. auf 40 rotierenden und mit Hydrogel beschichteten Platten kultiviert und deren Harnstoffproduktion dokumentiert (Yanagi et al. 1989). Uchino et al. immobilisierten Hepatozyten auf 200 kollagenbeschichteten Borsilikatglasplatten und zeigten eine Vitalität der Zellen von bis zu vier Wochen (Uchino et al. 1988). Auf neueren ungewobenen Polyester-matrizes können Hepatozyten, die in hoher Dichte direkt nach der Zellisolation in einen Reaktor eingebracht wurden, unter Produktion einer eigenen Matrix entweder direkt oder als Aggregat immobilisieren (Flendrig et al. 1997a). Flendrig et al. zeigten die Synthese von Harnstoff, die Elimination von Galaktose und Lidocain, sowie die Proteinsekretion noch nach vier Tagen Perfusion ihres Bioreaktors, der bereits für den klinischen Einsatz konzipiert wird. Nach ihren Untersuchungen ist die Harnstoffsyntheseleistung der aggregierten Hepatozyten im Perfusionsmodell der Monolayerkonfiguration überlegen.

Immobilisierte Hepatozyten können über einen deutlich längeren Zeitraum ihre hepatozytenspezifischen Funktionen aufrechterhalten als Suspensionskulturen und als Basis des organischen Funktionszentrums von Bioreaktoren dienen.

Als weitere Zellorganisationsform gelten Hepatozytensphäroidkulturen (Landry et al. 1985; Tong et al. 1992; Li et al. 1992). In dieser Kulturform immobilisieren sich die Hepatozyten als kugelähnliche Gebilde an vorgeformten Mikroträgern oder an sich selbst und können so in Bioreaktoren eingebracht werden (Li et al. 1993). Sie zeigen abhängig von der Größe der Sphäroide eine höhere Aktivität und Überlebenszeit als Suspensionskulturen. Dabei bieten die Sphäroide die Vorteile einer Suspensionskultur – guter Mediumzugang bei hohem Zell-Mediumverhältnis – in der Regel ohne die Nachteile der Diffusionsgradienten von Membranen und der



Oxygenationsproblematik. Bei großen Sphäroiden kann es jedoch zu einer Substrat- und Sauerstoff-Minderversorgung der zentraler gelegenen Zellen kommen.

Eine Modifikation der Sphäroidkultur stellt die Mikroverkapselung mit Calciumalginat dar (Takabatake et al. 1991; Selden et al. 1999). Dabei werden Hepatozyten in kugeligen Alginatpräparationen immobilisiert und eingekapselt. Diese Sphäroide werden dann in einen Bioreaktor eingebracht. Takabatake et al. zeigten in einem solchen Bioreaktor eine lineare Harnstoff und Albuminsynthese für 64 Stunden (Takabatake et al. 1991). Joly et al. demonstrierten ein Überleben von Schweinehepatozyten in einer Alginateinbettung über eine Periode von etwa 10 Tagen und wiesen Protein- und Harnstoffsynthese, sowie Phase I und II Metabolismus nach (Joly et al. 1997).

Der Übergang von Sphäroidkulturen zu Suspensions- und Attachmentkulturdesigns ist oft fließend. So beschrieb Flendrig sowohl eine Sphäroidbildung als auch eine Adhäsion der Zellen in seinem Polyestermatrix-Bioreaktormodell (Flendrig et al. 1997a). Reine Sphäroidkulturen können ihre leberspezifische Funktionen besser und länger als Suspensionskulturen aufrechterhalten, aber erreichen die Langzeitkulturergebnisse der Adhäsionskulturen in der Regel nicht.

Neben der Art der Zellenorganisation ist auch der Aufbau des technischen Systems, welches die Aufrechterhaltung der biophysikalischen Parameter, die Versorgung mit Nährstoffen und den Abtransport von Zellprodukten zur Aufgabe hat, von Bedeutung für den Biorektoraufbau.

Häufig kommen in Bioreaktoren Kapillarsysteme zum Einsatz, die in Anlehnung an Ultrafiltrathohlfaserkartuschen aus der Dialyse-Therapie entstanden. Im Vergleich zu planen Monolayern ermöglichen sie eine höhere Verdichtung der Zellkulturen und einen ausreichenden Metaboliten- und Nährstoffaustausch auch bei dreidimensional

angeordneten Zellkonfigurationen über Konzentrationsgradienten (Giorgio et al. 1993). Kapillarmembranen für diesen Zweck wurden bereits 1972 von Knazek vorgestellt (Knazek et al. 1972) und später mit Kollagen oder Fibronectin vorbeschichtet, als Attachmentunterstützung für Hepatozyten (Shatford et al. 1992; Gerlach et al. 1990a; Nyberg et al. 1992). Hydrophobe Polypropylenmembranen fanden dabei sowohl für die Mediumversorgung als auch für die Oxygenation von komplexen Kulturverbänden Verwendung (Gerlach et al. 1990b).

Das Einbringen von Zellen in die beschriebenen Hohlfaserkartuschen erfolgt auf unterschiedliche Weise und hängt von den bereits beschriebenen Zellkulturformen ab. So wurden von der Arbeitsgruppe um Demetriou beispielsweise Hepatozyten, die auf kollagenbeschichteten Celluloseacetat-Microcarriern bereits vorimmobilisiert waren, in die Hohlfaserkartuschen eingebracht (Arnaout et al. 1990). Ein deutlicher Nachteil bei der Verwendung von Hohlfaserkartuschen als Bioreaktormodul besteht in der unmöglichen direkten (mikroskopischen) Vitalitätskontrolle der Hepatozyten „Black Box“.

Neben dem Funktionszentrum ist weiterhin die Ausrüstung mit einem Pump-, Schlauch- und Oxygenierungssystem notwendig, welches ebenso wie die Hohlfaserkartuschen meist aus Dialysegeräten abgeleitet wurde.

Toxikologische *in vitro* Anwendungen für Bioreaktoren, wie in dieser Arbeit vorgestellt, werden zur Ergänzung der bislang bestehenden statischen *in vitro* Tests vorgeschlagen (Wrighton et al. 1995; Guillouzo et al. 1997). Perfusionsanordnungen mit *in vitro* Bioreaktoren bieten die Möglichkeit der Ausbildung von Fließgleichgewichten, Auswaschversuchen und online Analysen, sie werden aber wegen des großen Aufwandes bisher als *in vitro* Testsystem nicht verwendet.

### 4.1.5.2 Eigenes Bioreaktordesign

In Vorversuchen wurde ein einfaches Perfusionsmodell konstruiert, welches auf der Double-Gel Hepatozytenmonolayerkultur basierte und bereits eine Perfusionskultur von 96 h mit Nachweis von Albuminsynthese und Ethoxykumarinmetabolisierung erlaubte (Dähnhardt 1997). Dabei handelte es sich um ein einfaches Kollagen-Attachmentmodell in modifizierten T-Flask-Zellkulturschalen, die mit Konnektoren und Luerlockverschlüssen versehen wurden. Nachteile bestanden in der Verdunstung und resultierender Kondensatbildung an den Zellkulturschalen, die zu Konzentrationseffekten führten und somit die Ergebnisse bei der Berechnung der Syntheseleistung und Metabolisation beeinflussten. Durch die Montage des gesamten Systems unter einer speziell entwickelten, beheizten Plexiglasabdeckung konnte auf die zuvor benutzte Heizschlange zur Mediuenerwärmung verzichtet werden. Die Außenhaut des Bioreaktors, die Begasungsanlage und die Mediumleitungen konnten nun gleichmäßig temperiert werden. Daraus resultierte eine deutliche Reduktion der Kondensatbildung am Bioreaktor. Diese ermöglicht beim optimierten System auch Videoobservierungen. Die Kontrolle der Mediumosmolalität, wie auch die Messung des Mediumdefizits dienten der Reduktion von Konzentrationseffekten durch Kondensation.

Der Mediumverlust konnte dabei von zuvor 7% in 4 Tagen auf 2% in 6 Tagen reduziert werden. Dies ermöglichte den Verzicht auf eine Blasenfalle, die auch als Mediumreservoir diente, und die Reduktion der Medium-Gesamtmenge von 150 ml auf 100 ml, was einem günstigeren Zell-Mediumverhältnis entsprach.

Bei den Versuchen des Bioreaktors in Kombination mit dem Microphysiometer wurde schließlich nur noch 50 ml Medium im primären Hepatozyten-Perfusionssystem verwendet, um die Substratkonzentration der Bioreaktorprodukte zu erhöhen und den Wirkungsgrad des Reaktors weiter zu optimieren.

Die gemischte Oxygenierung mit Druckluft und regulierbarem CO<sub>2</sub>-Anteil ermöglichte eine verlässliche pH-Regulierung, so dass die bisher notwendige Zugabe von HEPES als Puffer entfallen konnte. Eine solche Reduzierung des Puffergehaltes im Medium war besonders für die Versuche in Verbindung mit dem Microphysiometer von Bedeutung, da eine Pufferung die Messung der EAR-Veränderung im Medium gestört und somit die Sensibilität des Versuchsaufbaus herabgesetzt hätte.

Die Pumprate im Rezirkulierungssystem von 9 ml/min wurde konstant beibehalten, da sich dadurch ein gutes Mediumverteilungsverhalten bei geringer Turbulenzbildung im Reaktor zeigte, was für diesen Reaktoraufbau bereits demonstriert werden konnte (Dähnhardt 1997).

Die geschilderten Veränderungen am Aufbau des Perfusionssystems resultierten in der beschriebenen verbesserten Temperaturverteilung, der Reduktion des Mediumverlustes und der damit verminderten Kondensatbildung. Die erhöhte Stabilität der biophysikalischen Parameter ermöglicht jetzt die stabile Perfusionskultur von porcinen Hepatozyten in einem definierten Zeitfenster vom dritten bis mindestens zum sechsten Tag nach Zellisolation (siehe auch 4.2.1) und erlaubt dabei funktionelle Anwendungen dieses Bioreaktormodells.

### 4.1.6 EAR als Metabolisations- und Toxizitätsmarker

Die extrazelluläre Azidifizierungsrate (EAR) entspricht der Ansäuerung des extrazellulären Milieus und wird durch aktive Zellstoffwechsellleistungen begründet. Die Azidifizierung wird durch die Exkretion von Laktat und CO<sub>2</sub> im Zuge der Verstoffwechslung von Glukose und Glutamin erzeugt (McConnell et al. 1992; Parce et al. 1989; Wada et al. 1992; Ajilore et al. 1997).

McConnell stellte 1992 ein Messsystem für die EAR, basierend auf Silikontechnologie, in Zusammenarbeit mit der Firma Molecular Devices (CA, USA) vor (McConnell, 1992). Bei diesem System besteht die Hauptmesseinheit aus einem Silikon (Si)-Sensor mit einer dünnen Isolierungsschicht auf der Oberfläche. Der Silikonchip ist durch eine externe Schaltung, die einen Ohmschen Widerstand enthält, mit einer wässrigen Lösung verbunden, welche wiederum mit der Isolierungsschicht in Verbindung steht. Diese Schaltung kontrolliert das Potential zwischen Silikonchip und der wässrigen Phase und misst die alternierende Photoladung. Diese Photoladung generiert sich, wenn der Silikonchip durch eine LED (Light Emiting Diode) illuminiert wird. Die Oberfläche der Silikonnitritisolierungsschicht enthält Hydroxyl- und Aminofunktionen, welche beide als Funktion des pH titriert werden können. Daher ist das Oberflächenpotential am Flüssigkeits-Isolatoren-Interface pH-sensitiv (McConnell et al. 1992). Eine richtig präparierte Si-Nitrit-Oberfläche sollte genügend titrierbare Gruppen besitzen, so dass das Oberflächenpotential gemäß der Nernst'schen Gleichung reagiert (61 mV pro pH Unit bei 37 °C) (McConnell et al. 1992; Wada et al. 1992). Die Empfindlichkeit liegt bei dem von Molecular Devices Corp. entwickelten Microphysiometer zwischen

0,0005 und 0,001 pH-Einheiten. Die typischerweise erzeugte Azidifizierung im Medium beträgt unter 0,1 pH Einheiten/min.

Am Beginn einer Messphase wird der Medium-pH bestimmt, anschließend die Perfusion des Mediums intermittierend gestoppt und die Azidifizierung gemessen. Der Messbereich am Silikonchip wird durch die LED-Illumination bestimmt. Obwohl sich etwa  $1-10 \times 10^5$  Zellen pro Hauptkammer befinden, wird nur eine kleine Fraktion von etwa 3000 Zellen tatsächlich durch den Sensor beobachtet (Wada et al. 1992).

Um diese Hauptmesskammern befindet sich das Kontrollgerät, welches den Mediumstrom durch Pumpen und Ventile steuert, eine Oxygenierung ermöglicht, die elektronische Steuerung der Abläufe vornimmt und Daten mit einem Desktopcomputer austauscht. Durch den Desktopcomputer können alle beschriebenen Prozesse geregelt und die Daten berechnet werden.

Dieses Messverfahren analysiert keine morphologischen Strukturen, sondern bietet eine Grundlage für Bioassays, die indirekt das Zellwachstum und biochemische Veränderungen anhand transmembranöser Potentiale untersuchen (McConnell et al. 1992; Wada et al. 1992). Aufgrund der kurzen Zeit, die dieses Gerät auf dem Markt erhältlich ist, sind bislang nur wenige Berichte über Anwendungen publiziert. So wurden bisher Anwendungen in der Rezeptorphysiologie (Baxter et al. 1994; Brown et al. 1997; Kuo et al. 1993), in der Xenobiotikaforschung (Rabinowitz et al. 1997) sowie in der Toxizitäts- und Chemosensibilitätsforschung (Wada et al. 1992; Cao et al. 1998; Libby 1998; Ajilore et al. 1997) beschrieben.

Parce et al. beschrieben 1989 den Einsatz eines Silicon-Biosensors zur Messung der zellulären Antwort auf toxische Substanzen (Parce et al. 1989) und legten den Grundstein für die Toxizitätsforschung mit dem Microphysiometer. Da die EAR einer

aktiven Zell-Metabolismusleistung entspricht, darf eine beobachtete Reduktion dabei als toxische Reaktion interpretiert werden. Parce et al. beschrieben die Verwendung eines bis dato nicht kommerziell erhältlichen Microphysiometers, um die Chemosensibilität von MES-SA, einer humanen Uterussarkomzelllinie, und Dx5, einer durch Doxorubicin selektierten multidrugresistenten Zelllinie der MES-SA Zellen, in Bezug auf Doxorubicin und Vincristin zu testen. Dabei zeigten die Dx5 Zellen nach Gabe von 1  $\mu$ M Doxorubicin einen leichten, absoluten Anstieg der EAR bis 50 Stunden, während die MES-SA Zellen 30 Stunden nach Doxorubicingabe nur noch etwa 60% ihrer initialen EAR aufwiesen. Bei Vincristin kam es bei beiden Zelllinien zu einer Reduktion der EAR. Wada et al. stellten 1992 noch einmal die gleichen Ergebnisse mit dem kommerziell erhältlichen Microphysiometer vor und fügten Untersuchungen an HIV-infizierten Maus-L-Zellen und CD4-transfizierten HeLa Zellen hinzu (Wada et al. 1992). Sie zeigten die Inhibierung oder zumindest Verzögerung des zytotoxischen Abfalls der EAR bei infizierten L-Zellen nach Ribaviringabe (Wada et al. 1992).

Der dargestellte Vorteil dieser Methodik besteht in der online Darstellung der Ergebnisse ohne die Notwendigkeit einer Zerstörung von Zellkulturen für die durchzuführende Analytik, da der Nachweis indirekt geführt wird. Färbungsreaktionen oder andere weitere Analyseschritte entfallen. Dadurch werden Inhibierungs- oder „wash out“-Untersuchungen möglich. Für andere Testsysteme, wie z.B. einer MTT-Reduktion (Reduzierung eines Tetrazolium-basierten Stoffes durch vitale Zellen zu einem bläulichen Formazan-Produkt) (Ballet 1997; Waterfield et al. 1998; Meyer et al. 1997; Philip et al. 1999), einer ATP-Messung (Castell et al. 1997), dem Neutral Red Uptake (Amacher et al. 1998) oder dem Enzym Leakage

Assay sind die Zerstörung der Zellkulturen, sowie weitere Analyseschritte erforderlich (Waterfield et al. 1998), um die toxische Reaktion an den Zielzellen zu erforschen.

Nachteile in der Verwendung des Microphysiometersystems als Toxizitätstest bestehen in der kostenintensiven Anschaffung und dem Unterhalt des Microphysiometers, sowie im aufwendigen Umgang mit dem Perfusionssystem. Da der Nachweis der Toxizität indirekt und im Vergleich zu anderen Zellen erfolgt, ist das System störanfälliger als bestehende direkte Assays, da Störfaktoren einfließen können, die nicht sofort offensichtlich werden wie beispielsweise unbemerkte pH-Veränderungen im Medium.

### **4.2 Diskussion der Ergebnisse**

Nach der Beschreibung und Diskussion des methodischen Aufbaus in 4.1 wird in den folgenden Abschnitten (4.2.1-4.2.3) das Ergebnis der durchgeführten Untersuchungen dargestellt und bewertet.

#### **4.2.1 Leistungsmerkmale des eigenen Perfusionssystems**

Als Leistungsmerkmal des Bioreaktors wurde Albumin als Synthesemarker, Ethoxykumarin als Metabolisationsmarker und LDH als Zellintegritätsmarker herangezogen. Diese wurden mit den Leistungsmerkmalen baugleicher Kontrollreaktoren ohne Mediumperfusion - statische Kulturen im Inkubator – verglichen.

Die Albumin-Syntheseleistung wurde im Medium kumulativ gemessen. Sie war bei der Inkubator- wie bei der Bioreaktorgruppe bis zum dritten Tag nach Versuchsbeginn, was dem sechsten Tag in Kultur entsprach, konstant nachweisbar.



Danach pendelte der Albuminspiegel um einen etwa gleich bleibenden Wert (siehe 3.2.1). Die Änderung der de-novo-Synthese am sechsten Tag in Kultur wird potentiell durch eine Konzentrationsinhibierung bedingt, was weiterer Abklärung bedarf. Weitere potentielle Einflussfaktoren auf die beobachtete Reduktion der Albuminsekretion sind eine Syntheseinhibierung aufgrund der Akkumulation von toxischen Substanzen oder ein Substratmangel. Dieses resultiert aus der Verwendung eines geschlossenen Perfusionssystems, bei dem das Medium nicht erneuert wird, was im Zeitraum von mehreren Tagen zu einer Akkumulierung von toxischen Abfallprodukten und der Unterversorgung mit, für die Proteinsynthese wichtigen, Substraten und Kofaktoren führt.

Bei Zugabe von Ethoxykumarin im Medium wurde über 6 Tage ein kontinuierlicher Anstieg des Stoffwechselproduktes 7-Hydroxykumarin gemessen und somit die Aktivität der Ethoxykumarindeethylase nachgewiesen (siehe 3.2.2). Das Kumarinderivat wird durch das Cytochrom P450 1A1/2, aber auch durch die 2A, 2B und 2E1 Untergruppen metabolisiert (Kuhn et al. 1998; Yamazaki et al. 1996). Die bei den Inkubatorulturen gemessenen 7-Hydroxykumarinabsolutwerte, bezogen auf den DNA-Gehalt, lagen bis zu 2-fach höher als im Bioreaktormodell (siehe 3.2.2). Im Bioreaktormodell standen etwa 14 ml Medium (=14% des Gesamtmediums) nicht dem Bioreaktor zur Verfügung, da es durch das Schlauch- und Oxygenatorsystem zirkulierte. Hier könnte eine suboptimale Sättigung der Ethoxykumarindeethylase im Bioreaktor kausal für die beobachtete Aktivitätsdifferenz sein, die sich im Sinne eines langsameren Diffusionsaustausches des Substrats auswirkte. Eine Absorption des Substrats Ethoxykumarin oder eines Produkts am Schlauchsystem oder anderen Bioreaktorbestandteilen ist denkbar, scheint aber nach Herstellerangaben unwahrscheinlich. In einem Vorversuch wurde zudem die Stabilität von

zirkulierendem 7-Hydroxykumarin über 6 Tage in unserem Bioreaktormodell nachgewiesen (siehe 2.6.2). Eine Adsorption oder Desintegration des Metaboliten 7-Hydroxykumarin erscheint daher im Versuchsrahmen wenig wahrscheinlich und die kumulative Messung gerechtfertigt.

Die Laktatdehydrogenase (LDH) wurde als Zellintegritätsmarker verwendet und tritt im Kulturmedium als Zellzerfallsfolge auf. Bei intakten Zellen ist das Enzym LDH streng intrazellulär (Bergmayer, 1983). Die Bioreaktorgruppe zeigte eine stete Zunahme der LDH-Aktivität im Medium mit deutlichem Anstieg nach 3 Tagen Perfusionbetrieb (6 Tagen in Kultur) als Zeichen eines kontinuierlichen Zelluntergangs und war hierin vergleichbar mit den statischen Kontrollkulturen (siehe 3.2.3). Dabei konnte eine parallele Entwicklung zu den morphologischen Veränderungen der Zellen aufgezeigt werden, wobei die LDH-Leakage dem morphologischen Bild der Zellauflösung vorausging. Am fünften Perfusionstag zeigten die Kulturen Zelleinschlüsse und zunehmend Zeichen des Zelluntergangs, wie verschwommene Zellgrenzen und fehlende Kernprominenz. Am siebten Perfusionstag waren ca. 50% der Zellen morphologisch zerstört. Diese Zahl konnte nicht weiter objektiviert werden und unterlag damit subjektiven Bewertungsmaßstäben, da nur ein Ausschnitt der Kultur und nicht der gesamte Bioreaktor systematisch untersucht werden konnte. Die Morphologiebetrachtung kann somit nur als Hinweis auf eine eingeschränkte Kulturstabilität dienen und ist in ihrer Aussage limitiert.

Die kurz dauernde Stabilität der Zellkulturen in der Bioreaktorgruppe und der Inkubatorgruppe mit porkinen Hepatozyten in dieser Arbeit steht im Kontrast zu Kulturzeiten von über 14 Tagen, die bei reinen Inkubatorkulturen bereits erzielt werden konnten (Koebe et al. 1995). Sie ist bei dem verwendeten geschlossenen

System ohne Mediumwechsel am ehesten durch Substratmangel, den Anfall von toxischen Produkten und eine Produktinhibierung limitiert. Ferner ist die Verteilung von Substraten bei der Bioreaktorgruppe aufgrund der Mediumzirkulation verändert.

Der vorgestellte Bioraktor demonstrierte zusammenfassend jedoch eine ausreichende funktionelle Stabilität für angewandte Untersuchungen und ermöglicht diese in einem zeitlichen Fenster von mindestens drei Tagen, wobei eine kontinuierliche Metabolisationsleistung der Zellen über fünf Tage erwartet werden kann.

### **4.2.2 Cyclophosphamid-Metabolisierung durch Schweinehepatozyten**

Die Metabolisierung von Cyclophosphamid (CYCL) wird durch Hydroxylierung zu 4-OH-CYCL von den Enzymen CYP 450 2B, 2C und alternativen Metabolisationswegen wie CYP 3A4 (Bort et al. 1999; Yu et al. 1999; Busse, D et al. 1999; Philip et al. 1999) initiiert. Die weiteren Metabolismusstufen laufen spontan ab, was die kurze Aktivität des aktiven Metaboliten und auch des hydrolysierten Maphosphamids erklärt (Singh et al. 1993; Meyer et al. 1997). Durch den Nachweis der ECOD Metabolisation, bei welchem die Metabolisation durch das Cytochrom P450 1A1/2, aber auch durch die 2A, 2B und 2E1 Untergruppe beschrieben wurde (Kuhn et al. 1998; Yamazaki et al. 1996), konnte die Aktivität der porkinen Hepatozyten für bestimmte CYP-Untergruppen nachgewiesen werden. Die Aktivierung von CYCL entspricht nicht genau den Metabolisationswegen von ECOD, da andere CYP-Untergruppen notwendig sind. Deshalb wurden zur Vorevaluation für die Umwandlung von Cyclophosphamid durch porkine Hepatozyten von

Schlachthoftieren zwei Versuchsreihen gebildet. Die Metabolisierung von CYCL sollte direkt durch den Nachweis von Acrolein (siehe 3.3.1) und indirekt durch Eigentoxizitätsbeobachtungen der Hepatozyten bei Metabolisierung von CYCL (siehe 3.3.2) nachgewiesen werden. Acrolein, als Metabolisationsprodukt von Cyclophosphamid, wurde bei Inkubationen mit porkinen Hepatozyten direkt durch eine HPLC (High-Performance Liquid Chromatographie) Methodik nachgewiesen (Bohnenstengel et al. 1997). Dabei wurde Acrolein auch im Medium von überproportional Kollagen-gedeckelten Kulturen (1 ml bei 6 well Platten) nachgewiesen, um die Diffusionsfähigkeit von Cyclophosphamid durch die Kollagenmatrix zu demonstrieren. Nach der Einbeziehung des veränderten Verteilungsvolumens durch den Kollagendeckel ergab sich der Nachweis von Acrolein im Medium quantitativ um etwa 50% vermindert im Vergleich zur ungedeckelten Kultur. Betrachtet man das um 1 ml erhöhte Verteilungsvolumen des extrazellulären Raumes bei den „Deckelkulturen“, war auch das Substratangebot (CYCL) der Inkubationslösung weiter verdünnt und somit niedriger als bei ungedeckelten Kulturen, was einen niedrigeren Umsatz in diesen Kulturen erklärt. Es wäre auch eine inkomplette Diffusionsbarriere oder eine Teil-Absorption von CYCL durch die Kollagenmatrix zu diskutieren. Der überdimensionierte Kollagendeckel könnte dies durch ungünstige Kultureigenschaften noch verstärken. Dieser Vorversuch demonstrierte jedoch qualitativ die Aktivierung von CYCL durch porkine Hepatozyten und die Kollagendiffusionsfähigkeit von aktiven Metaboliten und Cyclophosphamid.

Als weiterer, indirekter Test der Aktivierung wurde die Eigentoxizität anhand der EAR bei Selbstaktivierung von CYCL herangezogen und mit der toxischen Wirkung von MAPH, dem aktivierten Metaboliten von CYCL, verglichen. Nach 14 Stunden wurde

bei den porkinen Hepatozyten, die mit CYCL perfundiert wurden, EARs von etwa 50% im Vergleich zu Kontrollhepatozyten (normales Perfusionsmedium) gemessen. Dies deutet auf die Aktivierung der Muttersubstanz CYCL hin. Das bereits aktivierte MAPH zeigte eine deutlich geringere Reduktion der EAR, die bei etwa 80% lag. Dieses erklärt sich vermutlich durch die sehr kurze Halbwertszeit der wassergelösten Substanz MAPH. Das im Perfusionsmedium gelöste MAPH verlor im Versuch schnell an toxischer Wirkung, während CYCL auf Grund der kontinuierlichen Aktivierung durch die Hepatozyten ständig neue toxisch wirksame Metaboliten generierte. Auch eine Analyse der Ergebniskurve (Abb.: 3-6) bestätigt diese Vermutung. In den ersten 5 Stunden liefen die EAR Kurven der MAPH und der CYCL Gruppen parallel, mit einem weiteren Abfall der EAR-Werte der CYCL Gruppe. Die MAPH Gruppe zeigte hingegen eine Abflachung der Kurve, entsprechend einer geringeren toxischen Wirkung des MAPH.

### **4.2.3 Chemosensibilität der ZR 751 Zellen**

Um die toxische Wirkung der aktivierten und inaktivierten Form von CYCL zu untersuchen, wurde die EAR der ZR 751 Zelllinie unter dem Einfluss dieser Substanzen in zwei Konzentrationen (3 µg/ml und 30µg/ml) gemessen. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Muttersubstanz ohne hepatozelluläre Aktivierung nach 9 Stunden in beiden Konzentrationen keine Reduktion der EAR im Vergleich zu einer Kontrollmediumperfusion erzeugen konnte, während der aktive Metabolit eine dosisabhängige Reduktion der EAR bei den ZR 751 Brustkrebszellen bewirkte. Die Reduktion der EAR wurde als Reduktion des Gesamtmetabolismus der Zielzellen gedeutet (Parce et al. 1989) und somit die Sensibilität der Zellen auf die toxische

Wirkung der aktiven CYCL-Metaboliten nachgewiesen. Die inaktive Muttersubstanz zeigte unabhängig der Konzentration keine toxische Wirkung. Dabei entsprach die höhere Konzentration von 30 µg/ml, die später auch im Bioreaktormodell verwendet wurde, der 10-fachen im klinischen Einsatz üblichen Konzentration. Somit konnte in unserem Modell eine intrinsische Toxizität der Muttersubstanz ausgeschlossen werden. Die Notwendigkeit der Aktivierung von CYCL für eine toxische, bzw. zytostatische Wirkung wurde oft beschrieben (Horner et al. 1985; Fantel et al. 1979; Yu et al. 1999). In der Literatur fanden sich keine gesonderten Untersuchungen über die Chemosensibilität der ZR 751 Zelllinie auf die zytostatische Wirkung von aktiviertem Cyclophosphamid.

### **4.3 Neuartiges Toxizitätsmodell der Hepatoaktivierung mit Überwachung des Zielzelleneffektes: Kombination des Bioreaktors mit dem Microphysiometer**

Der Zusammenschluss des optimierten Hepatozytenbioreaktors mit dem Microphysiometer System resultierte in einer neuartigen Versuchsanordnung für die Metabolismus- oder Toxizitätsforschung. Bei der Entwicklung neuer Xenobiotika ist es essentiell, Metabolisationswege bereits frühzeitig zu untersuchen, um eine Risikoabschätzung sowohl hinsichtlich der Toxizität, als auch der Bioverfügbarkeit der Substanz zu treffen (Wrighton et al. 1995; Davila et al. 1998; Lotti 1995). Dabei spielt die Metabolisierung des Fremdstoffes in der Leber die größte Rolle (Berry et al. 1997; Fabre et al. 1990; Guillouzo et al. 1993). Der „first pass“ Effekt einer Substanz beschreibt die Metabolisierung in der Leber vor Erreichen des Zielorgans, was eine Inaktivierung der Substanz nach sich ziehen kann (Wrighton et al. 1995).

Neben der Inaktivierung kann eine Testsubstanz durch die Leberpassage so weit verändert werden, dass eine unbekannte Wirkung am Zielorgan und/oder am gesamten Organismus hervorgerufen wird.

Dieser „first pass“ Mechanismus wird bei Prodrugs genutzt, um oral verfügbare Medikamente bereitzustellen, wenn der aktive Metabolit entweder unverträglich, oder im Magen-, Darmtrakt nicht resorbierbar ist. Ein weiterer Vorteil bei der medikamentösen Gabe von Substanzvorstufen liegt in der Aufrechterhaltung einer kontinuierlichen Bioverfügbarkeit durch stetige Neuaktivierung, falls der aktive Metabolit, wie im Fall von Cyclophosphamid, eine enorm kurze Halbwertszeit aufweist. Für den zuverlässigen Einsatz von Prodrugs muss der Metabolismus in der Leber für den aktiven Metaboliten vorhergesagt und getestet werden können.

In der pharmazeutischen Forschung werden mit den herkömmlichen *in vitro*-Modellen (siehe auch 1.3) derzeit die direkte und die latente Hepatotoxizität von Xenobiotika (Ballet 1997; Castell et al. 1997; Guillouzo 1998) und deren Metabolismus durch die Leber untersucht (Wrighton et al. 1995; Berry et al. 1997). Bislang war Hepatotoxizität der Hauptgrund für die Einstellung neuer Medikamente aus Sicherheitsgründen vor und nach ihrer Markteinführung (Ballet 1997).

Die Substanzeffekte auf Zielzellen anderer Organe oder Gewebe werden routinemäßig nicht im *in vitro*-Modell geprüft (Glatt et al. 1987), sondern mit Hilfe von *in vivo*-Tests. Der Einsatz von *in vitro*-Modellen für die Erforschung von Zielzellenwirkungen ermöglicht die Reduktion von Tierversuchen in der präklinischen Forschung. Um den Effekt von aktivierten Metaboliten *in vitro* an bestimmten Zielzellen zu untersuchen, wurden die Effektorzellen u.a. mit Hepatozyten-Mikrosomen (Meyer et al. 1997), mit primären Hepatozyten (Ozolins et al. 1995; El-

Mir et al. 1998; Oglesby et al. 1986) oder anderen Zelllinien mit transfiziertem Cytochrom P 450 (Philip et al. 1999) kokultiviert.

Unser neu vorgestellter optimierter Hepatozytenbioreaktor bietet die Möglichkeit der Kultivierung von primären Hepatozyten verschiedener Spezies, einschließlich humaner Zellen. Dieser wird mit einem in Serie geschalteten Microphysiometer-System verbunden und bildet nun einen neuartigen Bioassay. Dieser vereint die Vorteile der online EAR-Messung mit der Möglichkeit der umfassenden biochemischen und katalytischen Potenz eines primären Hepatozytenbioreaktors. Als Überprüfung der Bioreaktorleistung wurde die Aktivierung von Cyclophosphamid durchgeführt, der Effekt semiquantitativ auf einer Brusttumorzelllinie als „Biosensor“ verfolgt und mit einer Kontrollkultur verglichen. Nach 7 Stunden lag die EAR der Zielzellen nach Perfusion mit Bioreaktor-metabolisierten CYCL - im Vergleich zu nicht Bioreaktor-metabolisierten CYCL - bei etwa 80% (siehe 3.5). Der Unterschied war signifikant. Die hier gezeigte Reduktion um etwa 20% nach 7 Stunden kann noch keine Auskunft über die Zuverlässigkeit dieser Methode geben. Parallelexperimente mit mehreren Bioreaktoren wären notwendig, um verschiedene Konzentrationen von Xenobiotika, inklusive verwendeter Kontrollen, unter gleichen Bedingungen zu testen. Bei der kommerziellen Anwendung eines solchen Systems wäre diese Forderung unbedingt zu stellen, um die Sensitivität und die Spezifität des Testsystems zu ermitteln (Davila et al. 1998). Bei den vorliegenden Untersuchungen wurden die Versuche in Reihe durchgeführt, weshalb sich die Zellen teilweise in anderen Zellzyklen oder unter nicht kontrollierten leicht veränderten Bedingungen befanden. Die Vergleichbarkeit der Ergebnisse war somit nicht optimal gegeben und schränkt die Auswertung der Beobachtungen ein.



Da keine direkte örtliche bidirektionale Beziehung der Hepatozyten im Reaktor mit den Zielzellen besteht, kann dieses Kulturmodell nicht als Kokulturmodell im herkömmlichen Sinn bezeichnet werden. Vielmehr ist es als exogenes Bioaktivierungssystem in der Lage, herkömmliche lebertypische Funktionen auszuführen und die Produkte als Perfusionssystem anderen Zielsystemen zur Verfügung zu stellen. Dabei tritt eine geringe zeitliche Latenz für die Nachweisreaktion von etwa 30 Sekunden auf, welche durch den Transport des Bioreaktormediums bis zum Zielgerät bedingt ist. Höchst instabile Metaboliten könnten während dieser Pumpphase übersehen werden. Dieser Umstand wurde bereits bei dem Modell der Leberperfusion als Nachteil beschrieben (Meyer et al. 1997).

Das online Toxizitätsmodell erlaubt so genannte „wash out“ oder Inhibierungsversuche: Nach der Inkubation mit einer Substanz kann diese ausgespült oder mit einer anderen Substanz inhibiert werden. Anschließend kann die Erholungstendenz bei den Zielzellen untersucht werden.

Durch das Bioreaktordesign ist es ferner möglich, flexible Aufbaumöglichkeiten zu realisieren. Dabei ist es vorstellbar, verschiedene Analysegeräte online anzuschließen, oder an einem Analysegerät verschiedene Parallelexperimente vorzunehmen. So bietet der kommerziell erhältliche Cytosensor® Microphysiometer bis zu acht unabhängige Perfusionskammern, die mit verschiedenen Zellen bestückt werden können. Bei unseren Versuchen wurde diese Option wegen der geringen verfügbaren Mediummenge aus dem Bioreaktor (50ml) zunächst nicht genutzt.

Der Anschluss von modernen Massenspektrographen an den Bioreaktor könnte computergesteuerte, automatisierte Metabolisationstests ermöglichen. Es wäre

denkbar, in computergesteuerten Zeitintervallen Funktionen des Überstandes in den Massenspektrographen zu pumpen, um ihn dort sofort automatisiert zu analysieren.

Zusammenfassend eröffnen sich in der Metabolisations- und Toxizitätsforschung mehrere Einsatzmöglichkeiten für das vorgestellte Bioreaktorsystem als *in vitro* Lebermodell:

In der prädiktiven Metabolisationsforschung neuer Substanzen können vom Bioreaktor erzeugte Inkubationsprodukte – auch online - untersucht werden. Auf die hepatische Abbaugeschwindigkeit neuer Substanzen kann durch Probengewinnung im zeitlichen Verlauf geschlossen werden. Bei der Prodrugtestung kann die Aktivierung und Bioverfügbarkeit der aktiven Substanz untersucht werden. Die Aktivierung kann dabei kontinuierlich erfolgen. In der Toxizitätsforschung können potentiell toxische Metaboliten vom Bioreaktor auf Zielzellen und -gewebe geleitet und der Effekt isoliert und kontrolliert beobachtet werden.

### 5. Zusammenfassung

#### 5.1 Ziel der Promotionsarbeit

Eine Vielzahl von Substanzen und Medikamenten wird in der Leber metabolisiert und somit auch hinsichtlich ihrer Wirkung verändert. Bei Prodrugs wird dieser Effekt pharmakologisch gezielt eingesetzt, um die Bioverfügbarkeit der Wirksubstanz zu verbessern, oder die orale Aufnahme überhaupt zu ermöglichen. Derzeitige *in vitro* Systeme erlauben es nur ungenügend, die Wirkung von Xenobiotika und deren Metaboliten auf Zielzellen zu untersuchen. Die toxikologischen Beobachtungen *in vitro* beschränken sich meist auf die Hepatotoxizität, also auf die Hepatozyten selbst. Ziel dieser Arbeit war die Modifikation und Optimierung eines Hepatozyten-Perfusionsmodells für die Verwendung als *in vitro* Bioreaktor-Metabolisationseinheit. Exemplarisch wurde die Produktwirkung eines zytotoxischen Prodrugs auf Zielzellen (Tumorzelllinie) in einer angeschlossenen Indikatoreinheit (Microphysiometer) online untersucht.

#### 5.2 Methodik

- A) Primäre porkine Hepatozyten wurden in einer Zwei-Schritt-EDTA/Kollagenase-Perfusionstechnik aus Schlachthoforganen gewonnen und auf der vorbereiteten Kollagenmatrix der Bioreaktormodule (modifizierte 225 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen) immobilisiert (5 x 10<sup>7</sup> Hepatozyten/Modul). Nach 24 Stunden Adhäsionsphase wurde eine zweite Kollagenschicht aufgetragen (Sandwichkultur).
- B) Nach der initialen Kulturphase von 3 Tagen wurden die Bioreaktoren an ein inertes Schlauchsystem mit einem Membranoxygenator, einer Rollerpumpe und online-Messeinheiten für die Kontrolle von pH, O<sub>2</sub>-Partialdruck und Temperatur

angeschlossen. Der pH-Wert des zirkulierenden Mediums (100ml) wurde durch ein variables CO<sub>2</sub>-Druckluft Mischverhältnis am Membranoxygenator reguliert. Das Kreislaufsystem wurde mit einem videoassistierten Lichtmikroskop unter einer temperierten Plexiglashaube installiert, durch die eine online Beobachtung der Hepatozytenkulturen in den Bioreaktormodulen möglich war.

- C) Das hepatozytäre Funktionszentrum wurde anhand von biophysikalischen Parametern und Indices für Synthese, Metabolismus und Zellintegration auf seine Stabilität hin überprüft.
- D) Die extrazelluläre Azidifizierungsrate (EAR) als Parameter der Zelleistung wird durch die Exkretion von Laktat und CO<sub>2</sub> bei der Verstoffwechslung von Glukose und Glutamin verursacht. Ein Cytosensor® Microphysiometer-System ermöglicht die Detektion von pH-Änderungen bis zu 1/1000 auf der Basis von potentiometrischen Sensoren auf Silikonbasis. EAR-Werte wurden semiquantitativ in Prozent von der Kontrollgruppe angegeben.
- E) Die EAR-Veränderungen einer Brustkrebszelllinie (ZR 751) unter Perfusion mit dem aktiven zytotoxischen Metaboliten Maphosphamid (MAPH) und der inaktiven Muttersubstanz Cyclophosphamid (CYCL) wurden isoliert gemessen.
- F) Für die Testung der Bioreaktoraktivierung von CYCL wurden Reaktormodule mit mehreren Perfusionskammern des Microphysiometer-Systems verbunden und Reaktormedium automatisch in die Microphysiometer-Einheit gepumpt.

### 5.3 Ergebnisse

- A) Die biophysikalischen Parameter pO<sub>2</sub>, Osmolalität, pH-Wert und Temperatur konnten im Hepatozytenbioreaktor 7 Tage lang stabil aufrechterhalten werden.

- B) Im Bioreaktormodell wurde eine stabile Albuminsynthese über 3 Tage, eine Cytochrom-P450-abhängige Ethoxykumarinmetabolisierung über 6 Tage und die morphologische Integrität der Zellkultur-Verbände bis zu 5 Tagen nachgewiesen. Die Perfusionsmodule zeigten eine vergleichbare Syntheseleistung und Zellintegrität (LDH-Anstieg) wie entsprechende Einheiten im Inkubator, die jeweils als Kontrollkulturen dienten. Die Deethylierung von Ethoxykumarin zu 7-Hydroxykumarin war in den Kontrollen etwa um den Faktor 1,5 stärker ausgeprägt. Aus diesen Ergebnissen ließ sich im vorgestellten Bioreaktormodell ein Versuchszeitraum-Fenster von 3 Tagen definieren - mit stabilen Integritäts-, Aktivitäts-, Differenzierungs- und Funktionsparametern der Hepatozyten.
- C) Nach 15 Stunden Perfusion von CYCL im Microphysiometer zeigten porkine Hepatozyten eine Reduktion der EAR auf  $52,45\% \pm 16,76$  bei  $3 \mu\text{g/ml}$  und  $45,45\% \pm 14,64$  bei  $30 \mu\text{g/ml}$  CYCL im Vergleich zu Kontrollen. Durch die Reduktion der EAR als Zeichen der hepatotoxischen Wirkung konnte der indirekte Nachweis der Aktivierung von CYCL durch die Hepatozyten geführt werden. Der direkte Nachweis von Acrolein (einem CYCL-Metaboliten) konnte nach CYCL-Inkubationen im Überstand von porkinen Hepatozyten mittels HPLC-Analyse erbracht werden.
- D) ZR 751 Brustkrebszellen zeigten keine Veränderung der EAR bei Perfusion mit  $3 \mu\text{g/ml}$  und  $30 \mu\text{g/ml}$  CYCL im Vergleich zu Kontrollzellen. Bei Perfusion der aktiven Substanz (MAPH) über 7 Stunden war die EAR der ZR 751 Zellen auf  $91,15\% \pm 7,19$  bei  $3 \mu\text{g/ml}$  und  $60,60\% \pm 19,70$   $\mu\text{g/ml}$  reduziert worden.
- E) Bei Verwendung des Hepatozytenbioreaktors als Prodrugaktivator von CYCL  $30 \mu\text{g/ml}$  zeigten die ZR 751 Zellen nach 7 Stunden eine Reduktion der EAR auf

79,44%  $\pm$  12,62, verglichen mit Kontrollzellen, die mit CYCL-freiem Bioreaktorüberstand perfundiert wurden.

### 5.4 Diskussion und Ausblick

Der vorgestellte Hepatozytenbioreaktor zeigte mit porkinen Zellen stabile *in vitro* Funktions- und Integritätsmerkmale bis zum 6.Tag in Kultur. Für sich alleine bietet das Bioreaktorsystem die Voraussetzungen für dynamische Versuchsvorhaben im Bereich Metabolismus von Xenobiotika. Der Reaktor erlaubt einen Produktzugriff ohne Kulturbeeinträchtigung, sowie Inhibierungs- oder Auswaschversuche für die jeweils untersuchten Substanzen. Die Verwendung von Schlachthoforganen oder humanen Hepatozyten ermöglicht in der präklinischen Xenobiotikaforschung eine Reduktion von Tierversuchen. Für die industrielle Nutzung wäre dabei die Verwendung paralleler Ansätze (höhere n-Zahl) von Bedeutung, um eine Optimierung der toxikologischen oder metabolischen Sensitivität der Prädiktion zu erreichen und somit die Aussagesicherheit zu erhöhen. Bei Verwendung von direkt mit dem Bioreaktor verbundenen Analysegeräten erschließen sich neuartige Testverfahren, wie das vorgestellte Toxizitätsmodell oder eine denkbare automatisierte Metabolitenanalyse. Bei dem Toxizitätsmodell wurde der Funktionsbioreaktor als Metabolisationseinheit für ein zytotoxisches Prodrug verwendet und dessen Produktwirkung auf Zielzellen in einem angeschlossenen Microphysiometer untersucht. Der Microphysiometer erlaubte als Biosensor eine online Bestimmung der EAR, einem Zellfunktionsparameter, wodurch direkt auf eine toxische Wirkung des aktiven Metaboliten geschlossen werden konnte. Das vorgestellte Modell kann somit als ein *in vitro* Marker für Hepatozyten-aktivierte Toxizität von Testsubstanzen auf Zielzellen eingesetzt werden.

## 6. Literatur

1. Ajilore, O. A. & Sapolsky, R. M. 1997, "Application of silicon microphysiometry to tissue slices: detection of metabolic correlates of selective vulnerability", *Brain Res.*, vol. 752, pp. 99-106.
2. Amacher, D. E., Fasulo, L. M., Charuel, C., Comby, P., & Beaumont, K. 1998, "In vitro toxicity of zamifenacin (UK-76,654) and metabolites in primary hepatocyte cultures", *Xenobiotica*, vol. 28, pp. 895-908.
3. Arnaout, W. S., Moscioni, A. D., Barbour, R. L., & Demetriou, A. A. 1990, "Development of bioartificial liver: bilirubin conjugation in Gunn rats", *Journal of Surgical Research*, vol. 48, pp. 379-382.
4. Ballet, F. 1997, "Hepatotoxicity in drug development: detection, significance and solutions", *Journal of Hepatology*, vol. 26 Suppl 2, pp. 26-36.
5. Baur, H., Kasperek, S., & Pfaff, E. 1975, "Criteria of viability of isolated liver cells", *Hoppe Seylers.Z.Physiol Chem.*, vol. 356,no. 6, pp. 827-838.
6. Baxter, G. T., Young, M. L., Miller, D. L., & Owicki, J. C. 1994, "Using microphysiometry to study the pharmacology of exogenously expressed m1 and m3 muscarinic receptors", *Life Sciences*, vol. 55, pp. 573-583.
7. Bergmayer, H.U., 1983, "Enzymes 1: Oxidoreductases, Transferases.," in *Methods of Enzymatic Analysis. Third Edition*, Third Edition edn, vol. Vol. III Verlag Chemie, Weinheim, pp. 118-126.
8. Berry, M. N., Edwards, A. M., & Basabe, J. C. Isolated hepatocytes. Preparation, properties and application. 1991. Amsterdam, Elsevier Science. Ref Type: Serial (Book, Monograph)
9. Berry, M. N. & Friend, D. S. 1969, "High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study", *Journal of Cell Biology*, vol. 43, pp. 506-520.
10. Berry, M. N., Grivell, A. R., Grivell, M. B., & Phillips, J. W. 1997, "Isolated hepatocytes--past, present and future", *Cell Biology and Toxicology*, vol. 13, pp. 223-233.

11. Berthiaume, F., Moghe, P. V., Toner, M., & Yarmush, M. L. 1996, "Effect of extracellular matrix topology on cell structure, function, and physiological responsiveness: hepatocytes cultured in a sandwich configuration", *FASEB Journal*, vol. 10, pp. 1471-1484.
12. Bhatia, S. N., Balis, U. J., Yarmush, M. L., & Toner, M. 1998, "Probing heterotypic cell interactions: hepatocyte function in microfabricated cocultures", *J.Biomater.Sci.Polym.Ed*, vol. 9, no. , pp. 1137-1160.
13. Bisgaard, H. C. & Lam, H. R. 1989, "*In Vitro* and *in Vivo* studies on the metabolism of 1,3-diaminobenzene: comparison of metabolites formed by the perfused rat liver, primary rat hepatocyte cultures, hepatic rat microsomes and the whole rat", *Toxicology In Vitro*, vol. 3, no. 3, pp. 167-174.
14. Bissell, D. M., Arenson, D. M., Maher, J. J., & Roll, F. J. 1987, "Support of cultured hepatocytes by a laminin-rich gel. Evidence for a functionally significant subendothelial matrix in normal rat liver", *Journal of Clinical Investigation*, vol. 79, pp. 801-812.
15. Bissell, D. M., Hammaker, L. E., & Meyer, U. A. 1973, "Parenchymal cells from adult rat liver in nonproliferating monolayer culture. I. Functional studies", *Journal of Cell Biology*, vol. 59, no. 3, pp. 722-734.
16. Bohnenstengel, F., Eichelbaum, M., Golbs, E., & Kroemer, H. K. 1997, "High-performance liquid chromatographic determination of acrolein as a marker for cyclophosphamide bioactivation in human liver microsomes", *J.Chromatogr.B.Biomed.Sci.Appl.*, vol. 692, pp. 163-168.
17. Bort, R., Ponsoda, X., Jover, R., Gomez-Lechon, M. J., & Castell, J. V. 1999, "Diclofenac toxicity to hepatocytes: a role for drug metabolism in cell toxicity", *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 288, pp. 65-72.
18. Brown, M. J., Wood, M. D., Coldwell, M. C., & Bristow, D. R. 1997, "Measurement of GABAA receptor function in rat cultured cerebellar granule cells by the Cytosensor microphysiometer", *Br.J.Pharmacol.*, vol. 121, pp. 71-76.
19. Busse, B., Smith, M. D., & Gerlach, J. C. 1999, "Treatment of acute liver failure: hybrid liver support. A critical overview", *Langenbecks Arch.Surg.*, vol. 384, no. 6, pp. 588-599.



20. Busse, D., Busch, F. W., Schweizer, E., Bohnenstengel, F., Eichelbaum, M., Fischer, P., Schumacher, K., Aulitzky, W. E., & Kroemer, H. K. 1999, "Fractionated administration of high-dose cyclophosphamide: influence on dose-dependent changes in pharmacokinetics and metabolism", *Cancer Chemother.Pharmacol.*, vol. 43, pp. 263-268.
21. Cao, C. J., Eldefrawi, M. E., Eldefrawi, A. T., Burnett, J. W., Mioduszewski, R. J., Menking, D. E., & Valdes, J. J. 1998, "Toxicity of sea nettle toxin to human hepatocytes and the protective effects of phosphorylating and alkylating agents [In Process Citation]", *Toxicol.*, vol. 36, pp. 269-281.
22. Castell, J. V., Gomez-Lechon, M. J., Ponsoda, X., & Bort, R. 1997, "The use of cultured hepatocytes to investigate the mechanisms of drug hepatotoxicity", *Cell Biology and Toxicology*, vol. 13, pp. 331-338.
23. Chen, S. C., Hewitt, W. R., Watanabe, F. D., Eguchi, S., Kahaku, E., Middleton, Y., Rozga, J., & Demetriou, A. A. 1996, "Clinical experience with a porcine hepatocyte-based liver support system", *International Journal of Artificial Organs*, vol. 19, pp. 664-669.
24. Chenery, R. J., Ayrton, A., Oldham, H. G., Standring, P., Norman, S. J., Seddon, T., & Kirby, R. 1987, "Diazepam metabolism in cultured hepatocytes from rat, rabbit, dog, guinea pig, and man", *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, vol. 15, pp. 312-317.
25. Davila, J. C., Rodriguez, R. J., Melchert, R. B., & Acosta, D., Jr. 1998, "Predictive value of in vitro model systems in toxicology", *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.*, vol. 38, pp. 63-96.
26. Dähnhardt, C. 1997, *Etablierung eines Perfusions-Kultursystems für Hepatozyten aus Schlachthoforganen vom Schwein*, Dissertationsschrift Medizinische Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.
27. DelRaso, N. J. 1993, "In vitro methodologies for enhanced toxicity testing", *Toxicol.Lett.*, vol. 68, pp. 91-99.
28. Desille, M., Corcos, L., L'Helgoualc'h, A., Fremond, B., Campion, J. P., Guillouzo, A., & Clement, B. 1999, "Detoxifying activity in pig livers and hepatocytes intended for xenotherapy", *Transplantation*, vol. 68,no. 10, pp. 1437-1443.
29. Donato, M. T., Castell, J. V., & Gomez-Lechon, M. J. 1999, "Characterization of drug metabolizing activities in pig hepatocytes for use in bioartificial liver devices: comparison with other hepatic cellular models", *Journal of Hepatology*, vol. 31,no. 3, pp. 542-549.

30. Dunn, J. C., Tompkins, R. G., & Yarmush, M. L. 1992, "Hepatocytes in collagen sandwich: evidence for transcriptional and translational regulation", *Journal of Cell Biology*, vol. 116, pp. 1043-1053.
31. Dunn, J. C., Yarmush, M. L., Koebe, H. G., & Tompkins, R. G. 1989, "Hepatocyte function and extracellular matrix geometry: long-term culture in a sandwich configuration [published erratum appears in FASEB J 1989 May; 3(7):1873]", *FASEB Journal*, vol. 3, pp. 174-177.
32. Edwards, A. M., Glistak, M. L., Lucas, C. M., & Wilson, P. A. 1984, "7-Ethoxycoumarin deethylase activity as a convenient measure of liver drug metabolizing enzymes: regulation in cultured rat hepatocytes", *Biochemical Pharmacology*, vol. 33, pp. 1537-1546.
33. El-Mir, M. Y., Serrano, M. A., Macias, R. I., Dominguez, M. F., Monte, M. J., & Marin, J. J. 1998, "In vitro test to determine the effect of cytostatic drugs on co-cultured rat hepatocytes and hepatoma cells", *Int.J.Exp.Pathol.*, vol. 79, pp. 109-115.
34. Fabre, G., Combalbert, J., Berger, Y., & Cano, J. P. 1990, "Human hepatocytes as a key in vitro model to improve preclinical drug development", *Eur.J Drug Metab.Pharmacokinet.*, vol. 15, pp. 165-171.
35. Fantel, A. G., Greenaway, J. C., Juchau, M. R., & Shepard, T. H. 1979, "Teratogenic bioactivation of cyclophosphamide in vitro", *Life Sciences*, vol. 25, pp. 67-72.
36. Flendrig, L. M., La Soe, J. W., Jorning, G. G., Steenbeek, A., Karlsen, O. T., Bovee, W. M., Ladiges, N. C., te Velde, A. A., & Chamuleau, R. A. 1997a, "In vitro evaluation of a novel bioreactor based on an integral oxygenator and a spirally wound nonwoven polyester matrix for hepatocyte culture as small aggregates", *Journal of Hepatology*, vol. 26, pp. 1379-1392.
37. Flendrig, L. M., te Velde, A. A., & Chamuleau, R. A. 1997b, "Semipermeable hollow fiber membranes in hepatocyte bioreactors: a prerequisite for a successful bioartificial liver?", *Artificial Organs*, vol. 21, pp. 1177-1181.
38. Gerlach, J. C. 1996, "Development of a hybrid liver support system: a review", *International Journal of Artificial Organs*, vol. 19, pp. 645-654.
39. Gerlach, J. C. 1997, "Long-term liver cell cultures in bioreactors and possible application for liver support", *Cell Biology and Toxicology*, vol. 13, pp. 349-355.

40. Gerlach, J. C., Brombacher, J., Kloppel, K., Schnoy, N., & Neuhaus, P. 1994, "Comparison of four methods for mass hepatocyte isolation from pig and human livers", *Transplantation*, vol. 57, pp. 1318-1322.
41. Gerlach, J., Kloppel, K., Schauwecker, H. H., Tauber, R., Muller, C., & Bucherl, E. S. 1989, "Use of hepatocytes in adhesion and suspension cultures for liver support bioreactors", *International Journal of Artificial Organs*, vol. 12, pp. 788-792.
42. Gerlach, J., Kloppel, K., Schon, M. R., Brombacher, J., Courtney, J. M., Unger, J., & Neuhaus, P. 1993, "Comparison of pig hepatocyte isolation using intraoperative perfusion without warm ischemia and isolation of cells from abattoir organs after warm ischemia", *Artificial Organs*, vol. 17, pp. 950-953.
43. Gerlach, J., Kloppel, K., Stoll, P., Vienken, J., & Muller, C. 1990b, "Gas supply across membranes in bioreactors for hepatocyte culture", *Artificial Organs*, vol. 14, pp. 328-333.
44. Gerlach, J., Stoll, P., Schnoy, N., & Bucherl, E. S. 1990a, "Membranes as substrates for hepatocyte adhesion in liver support bioreactors", *International Journal of Artificial Organs*, vol. 13, pp. 436-441.
45. Giorgio, T. D., Moscioni, A. D., Rozga, J., & Demetriou, A. A. 1993, "Mass transfer in a hollow fiber device used as a bioartificial liver", *Journal of the American Society of Artificial Internal Organs*, vol. 39, pp. 886-892.
46. Glatt, H., Gemperlein, I., Turchi, G., Heinritz, H., Doehmer, J., & Oesch, F. 1987, "Search for cell culture systems with diverse xenobiotic- metabolizing activities and their use in toxicological studies", *Mol.Toxicol.*, vol. 1, pp. 313-334.
47. Goldberg, A. M. 1995, "Development of alternative methods", *J.Toxicol.Sci.*, vol. 20, pp. 443-449.
48. Gomez-Lechon, M. J., Jover, R., Donato, T., Ponsoda, X., Rodriguez, C., Stenzel, K. G., Klocke, R., Paul, D., Guillen, I., Bort, R., & Castell, J. V. 1998, "Long-term expression of differentiated functions in hepatocytes cultured in three-dimensional collagen matrix", *J.Cell Physiol.*, vol. 177, pp. 553-562.
49. Guillouzo, A. 1995, "Acquisition and use of human in vitro liver preparations", *Cell Biology and Toxicology*, vol. 11, pp. 141-145.
50. Guillouzo, A. 1998, "Liver cell models in in vitro toxicology", *Environ.Health Perspect.*, vol. 106 Suppl 2, pp. 511-532.

51. Guillouzo, A., Morel, F., Fardel, O., & Meunier, B. 1993, "Use of human hepatocyte cultures for drug metabolism studies", *Toxicology*, vol. 82, pp. 209-219.
52. Guillouzo, A., Morel, F., Langouet, S., Maheo, K., & Rissel, M. 1997, "Use of hepatocyte cultures for the study of hepatotoxic compounds", *Journal of Hepatology*, vol. 26 Suppl 2, pp. 73-80.
53. Guzelian, P. S., Li, D., Schuetz, E. G., Thomas, P., Levin, W., Mode, A., & Gustafsson, J. A. 1988, "Sex change in cytochrome P-450 phenotype by growth hormone treatment of adult rat hepatocytes maintained in a culture system on matrigel", *Proceedings of the National Academie of Sciences of the United States of America*, vol. 85, pp. 9783-9787.
54. Horner, S. A., Fry, J. R., Clothier, R. H., & Balls, M. 1985, "A comparison of two cytotoxicity assays for the detection of metabolism- mediated toxicity in vitro: a study with cyclophosphamide", *Xenobiotica*, vol. 15, pp. 681-686.
55. Howard, R. B., Christensen, A. K., Gibbs, F. A., & Pesch, L. A. 1967, "The enzymatic preparation of isolated intact parenchymal cells from rat liver", *Journal of Cell Biology*, vol. 35,no. 3, pp. 675-684.
56. Hughes, R. C. & Stamatoglou, S. C. 1987, "Adhesive interactions and the metabolic activity of hepatocytes", *Journal of Cell Science*, vol. Suppl. 8, pp. 273-291.
57. Hughes, R. D. & Williams, R. 1995, "Evaluation of extracorporeal bioartificial liver devices", *Liver Transpl.Surg.*, vol. 1, pp. 200-206.
58. Hunt, C. M., Guzelian, P. S., Molowa, D. T., & Wright, S. A. 1991, "Regulation of rat hepatic cytochrome P450IIE1 in primary monolayer hepatocyte culture", *Xenobiotica*, vol. 21,no. 12, pp. 1621-1631.
59. Jackson, M. R. 1998, "Priorities in the development of alternative methodologies in the pharmaceutical industry", *Arch.Toxicol.Suppl.*, vol. 20, pp. 61-70.
60. Joly, A., Desjardins, J. F., Fremond, B., Desille, M., Campion, J. P., Malledant, Y., Lebreton, Y., Semana, G., Edwards-Levy, F., Levy, M. C., & Clement, B. 1997, "Survival, proliferation, and functions of porcine hepatocytes encapsulated in coated alginate beads: a step toward a reliable bioartificial liver", *Transplantation*, vol. 63, pp. 795-803.

61. Kane, R. E., Vaswani, S., Li, A., & Kaminski, D., 1994, "What is the best source of hepatocytes for an artificial liver support device?" *Journal of the American Society of Artificial Internal Organs* 40, 12.
62. Kern, A., Bader, A., Pichlmayr, R., & Sewing, K. F. 1997, "Drug metabolism in hepatocyte sandwich cultures of rats and humans", *Biochemical Pharmacology*, vol. 54, pp. 761-772.
63. Kino, Y., Sawa, M., Kasai, S., & Mito, M. 1998, "Multiporous cellulose microcarrier for the development of a hybrid artificial liver using isolated hepatocytes", *Journal of Surgical Research*, vol. 79, pp. 71-76.
64. Knazek, R. A., Gullino, P. M., Kohler, P. O., & Dedrick, R. L. 1972, "Cell culture on artificial capillaries: an approach to tissue growth in vitro", *Science*, vol. 178, no. 56, pp. 65-66.
65. Koebe, H.-G., Pahernik, S. A., Sproede, M., Thasler, W., & Schildberg, F. W. 1995, "Porcine Hepatocytes From Slaughterhouse Organs. An unlimited resource for bioartificial liver devices.", *Journal of the American Society of Artificial Internal Organs*, vol. 41, no. 2, pp. 189-193.
66. Koebe, H. G., Pahernik, S., Eyer, P., & Schildberg, F. W. 1994, "Collagen gel immobilization: a useful cell culture technique for long-term metabolic studies on human hepatocytes", *Xenobiotica*, vol. 24, pp. 95-107.
67. Koebe, H. G. & Schildberg, F. W. 1998, "[The artificial liver--an interim report]", *Wien.Klin.Wochenschr.*, vol. 110, pp. 551-563.
68. Kolb, H. A. & Adam, G. 1976, "Regulation of ion permeabilities of isolated rat liver cells by external calcium concentration and temperature", *J.Membr.Biol.*, vol. 26, no. 2-3, pp. 121-151.
69. Kreamer, B. L., Staecker, J. L., Sawada, N., Sattler, G. L., Hsia, M. T., & Pitot, H. C. 1986, "Use of a low-speed, iso-density percoll centrifugation method to increase the viability of isolated rat hepatocyte preparations", *In Vitro Cellular and Developmental Biology*, vol. 22, pp. 201-211.
70. Kuhn, U. D., Splinter, F. K., Rost, M., & Muller, D. 1998, "Induction of cytochrome P450 1A1 in rat liver slices by 7-ethoxycoumarin and 4-methyl-7-ethoxycoumarin", *Exp.Toxicol.Pathol.*, vol. 50, no. 4-6, pp. 491-496.
71. Kuiper, H. A. 1996, "The role of toxicology in the evaluation of new agrochemicals", *J.EnvIRON.Sci.Health B.*, vol. 31, pp. 353-363.

72. Kuo, R. C., Baxter, G. T., Alajoki, L., Miller, D. L., Libby, J. M., & Owicki, J. C. 1993, "A metabolic view of receptor activation in cultured cells following cryopreservation", *Cryobiology.*, vol. 30, pp. 386-395.
73. Landry, J., Bernier, D., Ouellet, C., Goyette, R., & Marceau, N. 1985, "Spheroidal aggregate culture of rat liver cells: histotypic reorganization, biomatrix deposition, and maintenance of functional activities", *Journal of Cell Biology*, vol. 101, no. 3, pp. 914-923.
74. Lasfargues, E. Y. 1957, "Cultivation and behaviour in vitro of the normal mammary epithelium of the adult mouse.", *Anat Rec.*, vol. 127, pp. 117-125.
75. Lee, J., Morgan, J. R., Tompkins, R. G., & Yarmush, M. L. 1993, "Proline-mediated enhancement of hepatocyte function in a collagen gel sandwich culture configuration", *FASEB Journal*, vol. 7, pp. 586-591.
76. Li, A. P., Barker, G., Beck, D., Colburn, S., Monsell, R., & Pellegrin, C. 1993, "Culturing of primary hepatocytes as entrapped aggregates in a packed bed bioreactor: a potential bioartificial liver", *In Vitro Cellular and Developmental Biology*, vol. 29A, pp. 249-254.
77. Li, A. P., Colburn, S. M., & Beck, D. J. 1992, "A simplified method for the culturing of primary adult rat and human hepatocytes as multicellular spheroids", *In Vitro Cellular and Developmental Biology*, vol. 28A, pp. 673-677.
78. Libby, J. M. 1998, "Postantibiotic effect in Escherichia coli determined with real-time metabolic monitoring", *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 42, pp. 78-82.
79. Lindblad, W. J., Schuetz, E. G., Redford, K. S., & Guzelian, P. S. 1991, "Hepatocellular phenotype in vitro is influenced by biophysical features of the collagenous substratum", *Hepatology*, vol. 13, pp. 282-288.
80. Lotti, M. 1995, "Mechanisms of toxicity and risk assessment", *Toxicol.Lett.*, vol. 77, pp. 9-14.
81. Lueck, J. D. & Miller, L. L. 1970, "The effect of perfusate pH on glutamine metabolism in the isolated perfused rat liver", *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 245, no. 20, pp. 5491-5497.
82. Mandl, I., MacLennan, J. D., & Howes, E. L. 1953, "Isolation and characterisation of proteinase and collagenase from Cl. histolyticum.", *Journ Clin Invest.*, vol. 32, pp. 1323-1329.



83. Marceau, N., Noel, M., & Deschenes, J. 1982, "Growth and functional activities of neonatal and adult rat hepatocytes cultured on fibronectin coated substratum in serum-free medium", *In Vitro*, vol. 18, no. 1, pp. 1-11.
84. Martin, F. L. & McLean, A. E. 1998, "Comparison of paracetamol-induced hepatotoxicity in the rat in vivo with progression of cell injury in vitro in rat liver slices", *Drug Chem. Toxicol.*, vol. 21, pp. 477-494.
85. McConnell, H. M., Owicki, J. C., Parce, J. W., Miller, D. L., Baxter, G. T., Wada, H. G., & Pitchford, S. 1992, "The Cytosensor Microphysiometer: Biological Applications of Silicon Technology", *Science*, vol. 257, pp. 1906-1912.
86. Meredith, M. J. 1988, "Rat hepatocytes prepared without collagenase: prolonged retention of differentiated characteristics in culture", *Cell Biology and Toxicology*, vol. 4, no. 4, pp. 405-425.
87. Meyer, T., Wierse, G., Weinrebe, W., Treuner, J., Niethammer, D., & Bruchelt, G. 1997, "Effects of cyclophosphamide and ifosfamide on neuroblastoma cells before and after activation by microsomes", *Anticancer Res.*, vol. 17, pp. 981-986.
88. Michalopoulos, G. & Pitot, H. C. 1975, "Primary culture of parenchymal liver cells on collagen membranes. Morphological and biochemical observations", *Experimental Cell Research*, vol. 94, pp. 70-78.
89. Miyazaki, M., Suzuki, Y., & Sato, J. 1988, "A method for rapid preparation of single-cell suspensions from rat hepatocyte primary cultures on collagen substratum and the mechanism of cell dissociation", *Acta Medica Okayama*, vol. 42, pp. 351-354.
90. Morel, F., Langouet, S., Maheo, K., & Guillouzo, A. 1997, "The use of primary hepatocyte cultures for the evaluation of chemoprotective agents", *Cell Biology and Toxicology*, vol. 13, pp. 323-329.
91. Naruse, K., Sakai, Y., Nagashima, I., Jiang, G. X., Suzuki, M., & Muto, T. 1996, "Comparisons of porcine hepatocyte spheroids and single hepatocytes in the non-woven fabric bioartificial liver module", *International Journal of Artificial Organs*, vol. 19, pp. 605-609.
92. Newman, L. M., Johnson, E. M., Giacobbe, R. L., & Fu, L. J. 1990, "The in vitro activation of cyclophosphamide in the Hydra Developmental Toxicology Assay", *Fundam. Appl. Toxicol.*, vol. 15, pp. 488-499.

93. Nyberg, S. L., Platt, J. L., Shirabe, K., Payne, W. D., Hu, W. S., & Cerra, F. B. 1992, "Immunoprotection of xenocytes in a hollow fiber bioartificial liver", *Journal of the American Society of Artificial Internal Organs*, vol. 38, p. M463-M467.
94. Oglesby, L. A., Ebron, M. T., Beyer, P. E., Carver, B. D., & Kavlock, R. J. 1986, "Co-culture of rat embryos and hepatocytes: in vitro detection of a proteratogen", *Teratog.Carcinog.Mutagen.* , vol. 6, pp. 129-138.
95. Ohno, Y., Miyajima, A., & Sunouchi, M. 1998, "Alternative methods for mechanistic studies in toxicology. Screening of hepatotoxicity of pesticides using freshly isolated and primary cultured hepatocytes and non-liver-derived cells, SIRC cells", *Toxicol.Lett.*, vol. 102-103, pp. 569-573.
96. Ohshima, N., Yanagi, K., & Miyoshi, H. 1997, "Packed-bed type reactor to attain high density culture of hepatocytes for use as a bioartificial liver", *Artificial Organs*, vol. 21, pp. 1169-1176.
97. Olumide, F., Eliashiv, A., Kralios, N., Norton, L., & Eiseman, B. 1977, "Hepatic support with hepatocyte suspensions in a permeable membrane dialyzer", *Surgery*, vol. 82,no. 5, pp. 599-606.
98. Onderwater, R. C., Commandeur, J. N., Menge, W. M., & Vermeulen, N. P. 1999, "Activation of microsomal glutathione S-transferase and inhibition of cytochrome P450 1A1 activity as a model system for detecting protein alkylation by thiourea-containing compounds in rat liver microsomes", *Chem.Res.Toxicol.*, vol. 12,no. 5, pp. 396-402.
99. Orkin, R. W., Gehron, P., McGoodwin, E. B., Martin, G. R., Valentine, T., & Swarm, R. 1977, "A murine tumor producing a matrix of basement membrane", *J.Exp.Med.*, vol. 145,no. 1, pp. 204-220.
100. Ozolins, T. R., Oglesby, L. A., Wiley, M. J., & Wells, P. G. 1995, "In vitro murine embryotoxicity of cyclophosphamide in embryos co-cultured with maternal hepatocytes: development and application of a murine embryo-hepatocyte co-culture model", *Toxicology*, vol. 102, pp. 259-274.
101. Pahernik, S. A., Thasler, W. E., Mueller-Hoecker, J., Schildberg, F. W., & Koebe, H. G. 1996, "Hypothermic storage of pig hepatocytes: influence of different storage solutions and cell density", *Cryobiology*, vol. 33,no. 5, pp. 552-566.
102. Paine, A. J. 1990, "The maintenance of cytochrome P-450 in rat hepatocyte culture: some applications of liver cell cultures to the study of drug metabolism, toxicity and the induction of the P-450 system", *Chem.Biol.Interact.*, vol. 74, pp. 1-31.



103. Parce, J. W., Owicki, J. O., Kercso, K. M., Sigal, G. B., Wada, H. G., Muir, V. C., Bousse, L. J., Ross, K. L., Sikic, B. i., & McConnel, H. M. 1989, "Detection of Cell-Affecting Agents with a Silicon Biosensor", *Science* no. 246, pp. 243-247.
104. Philip, P. A., Ali-Sadat, S., Doehmer, J., Kocarek, T., Akhtar, A., Lu, H., & Chan, K. K. 1999, "Use of V79 cells with stably transfected cytochrome P450 cDNAs in studying the metabolism and effects of cytotoxic drugs", *Cancer Chemother.Pharmacol.*, vol. 43, pp. 59-67.
105. Phillips, HJ. 1973, "Dye exclusion tests for cell viability," in *Tissue culture methods*, PF. Kruse & UK. Patterson, eds., Academic Press, New York, p. 406 ff.
106. Rabinowitz, J. D., Rigler, P., Carswell-Crumpton, C., Beeson, C., & McConnell, H. M. 1997, "Screening for novel drug effects with a microphysiometer: a potent effect of clofilium unrelated to potassium channel blockade", *Life Sciences*, vol. 61, pp. PL87-94.
107. Rago, R., Mitchen, J., & Wilding, G. 1990, "DNA fluorometric assay in 96-well tissue culture plates using Hoechst 33258 after cell lysis by freezing in distilled water", *Analytical Biochemistry*, vol. 191, pp. 31-34.
108. Reid, L. M., Gaitmaitan, Z., Arias, I., Ponce, P., & Rojkind, M. 1980, "Long-term cultures of normal rat hepatocytes on liver biomatrix", *Annals of the New York Academie of Sciences*, vol. 349, pp. 70-76.
109. Reitz, R. H., Gargas, M. L., Mendrala, A. L., & Schumann, A. M. 1996, "In vivo and in vitro studies of perchloroethylene metabolism for physiologically based pharmacokinetic modeling in rats, mice, and humans", *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 136, pp. 289-306.
110. Riordan, S. M. & Williams, R. 2000, "Acute liver failure: targeted artificial and hepatocyte-based support of liver regeneration and reversal of multiorgan failure", *Journal of Hepatology*, vol. 32,no. 1 Suppl, pp. 63-76.
111. Rojkind, M., Gatmaitan, Z., Mackensen, S., Giambrone, M. A., Ponce, P., & Reid, L. M. 1980, "Connective tissue biomatrix: its isolation and utilization for long-term cultures of normal rat hepatocytes", *Journal of Cell Biology*, vol. 87, pp. 255-263.
112. Ryan, C. M., Carter, E. A., Jenkins, R. L., Sterling, L. M., Yarmush, M. L., Malt, R. A., & Tompkins, R. G. 1993, "Isolation and long-term culture of human hepatocytes", *Surgery*, vol. 113, pp. 48-54.

113. Scholz, S., Braunbeck, T., & Segner, H. 1998, "Viability and differential function of rainbow trout liver cells in primary culture: coculture with two permanent fish cells", *In Vitro Cell Dev.Biol.Anim*, vol. 34,no. 10, pp. 762-771.
114. Schuetz, E. G., Li, D., Omiecinski, C. J., Muller-Eberhard, U., Kleinman, H. K., Elswick, B., & Guzelian, P. S. 1988, "Regulation of gene expression in adult rat hepatocytes cultured on a basement membrane matrix", *Journal of Cellular Physiology*, vol. 134, pp. 309-323.
115. Seglen, P. O. 1972, "Preparation of rat liver cells. I. Effect of Ca<sup>2+</sup> on enzymatic dispersion of isolated, perfused liver", *Experimental Cell Research*, vol. 74,no. 2, pp. 450-454.
116. Seglen, P. O. 1976, "Preparation of isolated rat liver cells", *Methods in Cell Biology*, vol. 13, pp. 29-83.
117. Selden, C., Shariat, A., McCloskey, P., Ryder, T., Roberts, E., & Hodgson, H. 1999, "Three-dimensional in vitro cell culture leads to a marked upregulation of cell function in human hepatocyte cell lines--an important tool for the development of a bioartificial liver machine", *Annals of the New York Academie of Sciences*, vol. 875, pp. 353-363.
118. Shatford, R. A., Nyberg, S. L., Meier, S. J., White, J. G., Payne, W. D., Hu, W. S., & Cerra, F. B. 1992, "Hepatocyte function in a hollow fiber bioreactor: a potential bioartificial liver", *Journal of Surgical Research*, vol. 53, pp. 549-557.
119. Singh, K. P., Gupta, R. K., Shau, H., & Ray, P. K. 1993, "Effect of ASTA-Z 7575 (INN Maphosphamide) on human lymphokine- activated killer cell induction", *Immunopharmacol.Immunotoxicol.*, vol. 15, pp. 525-538.
120. Singh, Y., Cooke, J. B., Hinton, D. E., & Miller, M. G. 1996, "Trout liver slices for metabolism and toxicity studies", *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, vol. 24, pp. 7-14.
121. Takabatake, H., Koide, N., & Tsuji, T. 1991, "Encapsulated multicellular spheroids of rat hepatocytes produce albumin and urea in a spouted bed circulating culture system", *Artificial Organs*, vol. 15, pp. 474-480.
122. Tee, L. B., Seddon, T., Boobis, A. R., & Davies, D. S. 1985, "Drug metabolising activity of freshly isolated human hepatocytes", *Brithish Journal of Clinical Pharmacology*, vol. 19, pp. 279-294.
123. Tong, J. Z., De Lagausie, P., Furlan, V., Cresteil, T., Bernard, O., & Alvarez, F. 1992, "Long-term culture of adult rat hepatocyte spheroids", *Experimental Cell Research*, vol. 200, pp. 326-332.

124. Uchino, J., Tsuburaya, T., Kumagai, F., Hase, T., Hamada, T., Komai, T., Funatsu, A., Hashimura, E., Nakamura, K., & Kon, T. 1988, "A hybrid bioartificial liver composed of multiplated hepatocyte monolayers", *Transactions of the American Society for Artificial Internal Organs*, vol. 34, pp. 972-977.
125. Ulrich, R. G., Bacon, J. A., Cramer, C. T., Peng, G. W., Petrella, D. K., Stryd, R. P., & Sun, E. L. 1995, "Cultured hepatocytes as investigational models for hepatic toxicity: practical applications in drug discovery and development", *Toxicol.Lett.*, vol. 82-83, pp. 107-115.
126. Wada, H. G., Owicki, J. C., Bruner, L. H., Miller, K. R., Raley-Susman, K. M., Panfili, P. R., Humphries, G. M. K., & Parce, J. W. 1992, "Measurement of Cellular Responses to Toxic Agents using a Silicon Microphysiometer", *AATEX*, vol. 1, pp. 154-164.
127. Watanabe, F. D., Mullon, C. J., Hewitt, W. R., Arkadopoulos, N., Kahaku, E., Eguchi, S., Khalili, T., Arnaout, W., Shackleton, C. R., Rozga, J., Solomon, B., & Demetriou, A. A. 1997, "Clinical experience with a bioartificial liver in the treatment of severe liver failure. A phase I clinical trial", *Annals of Surgery*, vol. 225, pp. 484-91; discussion 491-4.
128. Waterfield, C. J., Westmoreland, C., Asker, D. S., Murdock, J. C., George, E., & Timbrell, J. A. 1998, "Ethionine toxicity in vitro: the correlation of data from rat hepatocyte suspensions and monolayers with in vivo observations", *Arch.Toxicol.*, vol. 72, pp. 588-596.
129. Waxman, D. J., Morrissey, J. J., Naik, S., & Jauregui, H. O. 1990, "Phenobarbital induction of cytochromes P-450. High-level long-term responsiveness of primary rat hepatocyte cultures to drug induction, and glucocorticoid dependence of the phenobarbital response", *Biochemichal Journal*, vol. 271,no. 1, pp. 113-119.
130. Wrighton, S. A., Ring, B. J., & VandenBranden, M. 1995, "The use of in vitro metabolism techniques in the planning and interpretation of drug safety studies", *Toxicol.Pathol.*, vol. 23, pp. 199-208.
131. Yamazaki, H., Inoue, K., Mimura, M., Oda, Y., Guengerich, F. P., & Shimada, T. 1996, "7-Ethoxycoumarin O-deethylation catalyzed by cytochromes P450 1A2 and 2E1 in human liver microsomes", *Biochemical Pharmacology*, vol. 51,no. 3, pp. 313-319.
132. Yanagi, K., Ookawa, K., Mizuno, S., & Ohshima, N. 1989, "Performance of a new hybrid artificial liver support system using hepatocytes entrapped within a hydrogel", *Transactions of the American Society for Artificial Internal Organs*, vol. 35, pp. 570-572.

133. Yu, L. J., Drewes, P., Gustafsson, K., Brain, E. G., Hecht, J. E., & Waxman, D. J. 1999, "In Vivo Modulation of Alternative Pathways of P-450-Catalyzed Cyclophosphamide Metabolism: Impact on Pharmacokinetics and Antitumor Activity", *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 288, pp. 928-937.

## 7. Anhang

### 7.1 Veröffentlichte Teilaspekte der Arbeit

#### Originalarbeiten

Koebe, H. G., Deglmann, C. J., Metzger, R., Hoerrlein, S., & Schildberg, F. W. 2000, "In vitro toxicology in hepatocyte bioreactors-extracellular acidification rate (EAR) in a target cell line indicates hepato-activated transformation of substrates", *Toxicology*, vol. 154, no. 1-3, pp. 31-44.

Metzger, R., Deglmann, C. J., Hoerrlein, S., Zapf, S., & Hilfrich, J. 2001, "Towards in-vitro prediction of an in-vivo cytostatic response of human tumor cells with a fast chemosensitivity assay", *Toxicology*, vol. 166, no. 1-2, pp. 97-108.

Koebe, H. G., Muhling, B., Deglmann, C. J., & Schildberg, F. W. 1999, "Cryopreserved porcine hepatocyte cultures", *Chem.Biol.Interact.*, vol. 121, no. 1, pp. 99-115.

#### Abstracts und Kongressbeiträge

Deglmann, C. J., Metzger, R., Hoerrlein, S., Schildberg, F. W., Koebe, H. G., 2001 "A Small Scale Hepatocyte Bioreactor in a new Bioassay for Hepato-Mediated Toxicity Testing of a Target Cell Line", Meeting der European society of Artificial Organs (ESAO Liver Working Group and ELNET (European Liver Network)), Krems, Austria 18-19.5.2001

Deglmann, C. J., Metzger, R., Hoerrlein, S., Schildberg, F. W., Koebe, H. G., 1998 "Extracellular acidification rate of hepatocytes and ZR 751 tumor cells under the influence of a hepato-activated cytotoxic agent", *In Vitro - Animal*, Vol 34, no. 9, p. 739.,

Deglmann, C. J., Metzger, R., Hoerrlein, S., Schildberg, F. W., Koebe, H. G., 1998, „Hepato-Activated Toxicity Testing in Hepatocyte-Bioreactors using Extracellular Acidification Rate of a Target Cell Line“, Hepatocyte User Group Meeting, Bristol, UK, (11.-12. September 1998).

## 7.2 Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosintriphosphat
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxyd
CYCL	Cyclophosphamid
CYP	Cytochrom P
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure (-acid)
EAR	Extrazelluläre Azidifizierungs Rate
ECOD	Ethoxykumarindeethylase
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	Fötale Rinderserum (Fetal Calf Serum)
HEPES	2-[4-[2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethansulfonsäure
HPLC	High-Performance Liquid Chromatographie
KRB	Krebs-Ringer-Puffer
LDH	Laktatdehydrogenase
LED	Light Emiting Diode
MAPH	Maphosphamid
MmHg	Millimeter Quecksilbersäule
Mosm	Milliosmolar
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl) 2,5-Diphenyltetrazoliumbromid
MW	Mittelwert
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
PBS	Phosphat Buffered Saline
pO <sub>2</sub>	O <sub>2</sub> -Partialdruck
Std.Abw.	Standartabweichung
ZR 751 Zellen	Brusttumorzelllinie ECACC Nummer 87012601

### 7.3 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Chirurgischen Klinik und Poliklinik des Klinikums Großhadern der Ludwig-Maximilians-Universität München (Direktor Prof. Dr. med. Dr. h.c. F. W. Schildberg) in der Arbeitsgruppe von Herrn Priv.-Doz. Dr. med. H.-G. Koebe durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. F.W. Schildberg für die freundliche Aufnahme als Doktorand und als wissenschaftlicher Assistent in seine Klinik.

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. H.-G. Koebe für die Überlassung des Themas der vorliegenden Arbeit, die Unterstützung auf meinem bisherigen Weg in der Arbeitsgruppe und meiner medizinischen Laufbahn. Im Laufe der Dissertationsarbeit war es mir möglich, meine Ideen selbstständig zu entwickeln und in neue Richtungen aufzubrechen. Dabei wurden mir die nötigen Freiräume, aber immer auch große Unterstützung und Förderung zuteil, was für die Durchführung dieser Arbeit unabdingbar war. Sein persönliches Engagement und seine extreme Arbeitsenergie in der Arbeitsgruppe und in der Klinik waren nicht nur für mich ein großer Ansporn und Vorbild in der Tätigkeit als Arzt und als Forschender. Insbesondere für die weitere Förderung bei der klinischen Tätigkeit gilt ihm dabei als Arbeitsgruppenleiter und Betreuer mein Dank.

Meinem Kondoktoranden Bernd Mühling, mit dem ich über mehrere Jahre in der Arbeitsgruppe, sowie in der Klinik zusammenarbeiten durfte. Seine persönliche und

fachlich Unterstützung bei vielen gemeinsamen Tag- und Nachtstunden im Labor und später auf der chirurgischen Intensivstation waren mir eine große Hilfe und immer in guter Erinnerung.

Meinen Vorgängern im Labor, Herrn Dr. Carsten Dähnhardt und Herrn Dr. med. Sascha Pahernik für die Einarbeitung in die Labortätigkeiten.

Frau Marianne Kussmaul, der guten Seele in unserem Labor, für die labortechnische und persönliche Unterstützung, die sie uns allen jederzeit zukommen ließ.

Herrn Daniel Fuchs, für die Mithilfe bei der Literaturrecherche.

Frau Ursula Cramer, als Vorgängerin von Frau Marianne Kussmaul, für die Einarbeitung in die Zellkulturtechniken und labortechnische Assistenz.

Herrn Dr. R. Metzger und Frau Hoerrlein der Firma CellControl GmbH, für die Kooperation und zeitweise Überlassung von Microphysiometergeräten.

Den Arbeitern des Münchner Schlachthofs für die freundliche Überlassung von zahlreichen frisch geschlachteten porkinen Lebern.

Herrn Dr. med. Bohnenstengel (Stuttgart) für die Messung von Acrolein.



## 7.4 Curriculum Vitae

NAME: DEGLMANN, CLAUS JOHANNES  
ADRESSE: UNDINESTR.2 , 81927 MÜNCHEN  
TELEFON: 089 - 932209  
E-MAIL: DEGLMAN@GCH.MED.UNI-MUENCHEN.DE  
GEBURTSDATUM: 26. JUNI 1970  
GEBURTSORT: WEIDEN I.D. OPF.

---

### AUSBILDUNG:

seit	01/00	Approbation als Arzt; Chirurgischer Assistenzarzt, Chirurgische Klinik und Poliklinik des Klinikums Großhadern; Ludwig-Maximilians Universität (LMU) München
	07/98 - 12/99	Arzt im Praktikum, Chirurgische Klinik und Poliklinik des Klinikums Großhadern
	08/98	US Medical Licensing Examination (USMLE), Step 2
	05/98	3.Staatsexamen Medizin LMU - München
	04/97 - 10/97	Austauschprogramm der LMU-München mit der Harvard Medical School im Rahmen des Praktischen Jahres
	06/95	US Medical Licensing Examination (USMLE), Step 1
	05/92	Beginn Medizinstudium an der LMU-München
	11/91	Musikwissenschaftliches Studium LMU-München
	07/90	Abitur Internat der Benediktinerabtei, Ettal
	87-88	Austauschprogramm des Deutschen Bundestages High School Findlay, Ohio, USA

### PRAKTISCHES JAHR /FAMULATUREN / PRAKTIKA :

12/96 - 03/97	Anästhesiologie am Klinikum Großhadern, LMU-München
04/97 - 10/97	Innere Medizin und Chirurgie Beth Israel Deaconess Medical Center, Boston, USA
11/96	Gynäkologie und Geburtshilfe am Allgemeinen Krankenhaus (AKH), Wien
03/96	Shriners Burns Institute Massachusetts General Hospital, Boston Harvard Medical School
10/95	Ambulante Knie- und Wirbelsäulenchirurgie, Dr. Toft / Dr. Hoogland, München
08/95	Innere Medizin, am Klinikum Innenstadt, Ziemssenstrasse LMU - München
09/94	Unfall- /Allgemeinchirurgie, am Klinikum Weiden i. d. Opf.

**LEHRTÄTIGKEITEN:**

seit 11/97 Tutor im Rahmen des Harvard-Munich Alliance Programms zur Verbesserung der Lehre an der LMU-München, Kardio-vaskulärer Kurs, Muskulo-skelettaler Kurs

**WEITERBILDUNG:**

02/02 Wiener Handchirurgiekurs, Prof. Böhler  
UKH Wien

02/01 Fachkundenachweis Rettungsdienst

**STIPENDIEN:**

04/97 PJ-Austauschprogramm der LMU-München  
Harvard Medical School, Boston, USA

06/87 Parlamentarisches Patenschaftsprogramm des Deutschen Bundestages mit dem Amerikanischen Kongress

**WISSENSCHAFTLICHE TÄTIGKEIT:**

seit 02/00 Laborleiter Labor PD Dr. med H.G. Koebe, Klinikum Großhadern.  
Kooperationspartner: Boehringer Ingelheim; BASF AG;  
Fraunhofer Institut; Epidauros AG; Mondogen AG; Cell Controll GmbH, Merck KG;

seit 04/95 Arbeitsgruppe PD Dr. med H.G. Koebe:  
Klinische Forschung Chirurgie  
Klinikum Großhadern, LMU - München

München, Juni 2002

Claus J.Deglmann