



# Leberzellkultur in Bioreaktoren für *in vitro* Studien zum Arzneimittelmetabolismus als Alternative zum Tierversuch

Katrin Zeilinger<sup>1</sup>, Stefan Auth<sup>1</sup>, Juliane Unger<sup>2</sup>, Alexander Grebe<sup>1</sup>, Lei Mao<sup>1</sup>, Martin Petrik<sup>1</sup>, Gudrun Holland<sup>3</sup>, Kurt Appel<sup>4</sup>, Andreas Nüssler<sup>1</sup>, Peter Neuhaus<sup>1</sup>, Jörg Gerlach<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Experimentelle Chirurgie, <sup>2</sup>Institut für Pathologie, Abteilung für Elektronenmikroskopie, Chirurgische Klinik, Charité Campus Virchow-Klinikum, Humboldt-Universität, D-Berlin; <sup>3</sup>Klinik für Anästhesiologie, RWTH, D-Aachen; <sup>4</sup>Dr. Gerhard Friedrich Pharmabiodyn, D-Denzlingen

## Zusammenfassung

Eine wesentliche Voraussetzung für den Einsatz von *in vitro* Kulturmodellen zum Arzneimittelmetabolismus als Alternative zum Tierversuch ist der Erhalt eines definierten Differenzierungsgrades der Zellen. Dazu ist eine möglichst hohe Annäherung an die *in vivo* Verhältnisse der Zellen im intakten Organ erforderlich. Für die *in vitro* Leberzellkultur wurde ein Bioreaktormodell entwickelt, das eine Reorganisation von Hepatozyten und Nichtparenchymzellen der Leber in Kokultur zu dreidimensionalen, gewebeähnlichen Strukturen mit Produktion einer eigenen extrazellulären Matrix durch die Zellen ermöglicht. In einer Studie über zwei Wochen wurden die Zellvitalität und die metabolische Aktivität isolierter Rattenhepatozyten unter Bioreaktorkultur untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass nach einer Reorganisationsphase spezifische Funktionen der Zellen, darunter die Harnstoff- und Albuminsynthesekapazität sowie spezifische Cytochrom P450-Aktivitäten, über den Kulturzeitraum erhalten bleiben, wobei maximale Aktivitäten in der ersten Woche erreicht werden. Anwendungen in der pharmazeutischen Industrie ergeben sich beispielsweise für Studien zum Metabolitenmuster, zur Enzyminduktion, zu Arzneimittelinteraktionen, zum first pass effect und zur Langzeittoxizität von Pharmaka.

*Summary: Liver cell culture in bioreactors for in vitro drug studies as an alternative to animal testing*

An important consideration for the utilisation of *in vitro* culture models for studies on drug metabolism as an alternative to animal testing is the maintenance of a defined degree of cell differentiation. Thus, *in vitro* conditions reflecting as near as possible the *in vivo* situation of the cells within the whole organ are required. A bioreactor was developed for the cultivation of liver cells which allows the reorganisation of hepatocytes and non-parenchymal cells of the liver in coculture to form three-dimensional, tissue-like structures including extracellular matrix components produced by the cells. In this study, the vitality and metabolic activity of isolated rat hepatocytes was investigated over a two week culture period in bioreactors. The results show that after a reorganisation phase, the cells preserve specific functions, such as protein and urea synthesis capacity and specific cytochrome P450 activities during the culture period, with maximal values during the first week. Possible applications of the model in pharmaceutical industry are studies on metabolite patterns, enzyme induction, drug-drug-interactions, first pass effects and long-term toxicity of drugs.

**Keywords:** 3R, reduce, bioreactor, *in vitro* culture, liver cells, perfusion

## 1 Einleitung

Neu entwickelte Arzneimittel durchlaufen bis zu ihrer klinischen Erprobung verschiedene gesetzlich vorgeschriebene Testphasen zur Beurteilung ihres toxikologischen und pharmakologischen Potentials. Bisher werden diese Studien, abgesehen von einigen Genotoxizitätstests, an Labortieren durchgeführt, wie es vom Arzneimittelgesetz im Einklang mit europäischen Richtlinien gefordert wird. Da Tierversuchsdaten aufgrund der ausgeprägten Speziesdifferenzen im Arzneimittelumsatz nur mit Einschränkung auf den Menschen übertragen werden können, werden dazu regelmässig

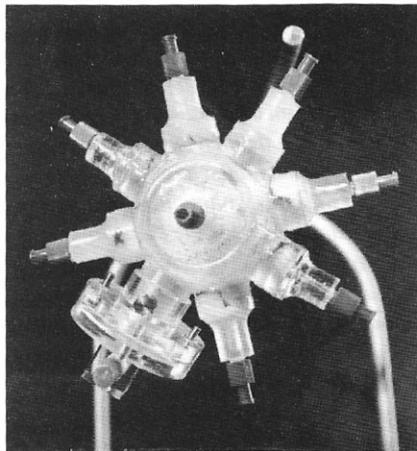
Tiere zweier verschiedener Spezies eingesetzt. Geeignete *in vitro* Methoden könnten dazu beitragen, die Anzahl der Tierversuche in der pharmazeutischen Industrie erheblich zu verringern.

Von besonderem Interesse für die präklinische Arzneimittelprüfung sind *in vitro* Leberzellkulturmodelle. Die stoffwechselaktiven Zellen der Leber, die Hepatozyten, sind für den Metabolismus einer Vielzahl von Fremdstoffen (Xenobiotica) zu pharmakologisch inaktiven, aktiven oder auch toxischen Substanzen verantwortlich und spielen daher eine entscheidende Rolle für die Wirkung und das toxische Potential von Arzneimitteln. Wichtig für den Metabolis-

mus von Xenobiotica sind die Cytochrom P450-abhängigen Monooxygenasen (CYP450) der Leber. Die Pharmakokinetik der meisten Arzneimittel wird durch die Aktivitäten spezifischer CYP450-Enzyme bestimmt. Ein Erhalt der CYP450-Aktivitäten der Zellen ist daher eine entscheidende Voraussetzung für aussagekräftige *in vitro* Studien zum Arzneimittelmetabolismus.

Ein wesentliches Problem bei der Verwendung isolierter Hepatozyten für Metabolismusstudien stellt der Verlust der CYP450-Aktivitäten *in vitro* unter längerer Kulturdauer dar (Guguen et al., 1988; Skett, 1994). In den letzten Jahren wurden daher zahlreiche Untersuchungen zur Verbesse-

rung der Kulturbedingungen für Hepatozyten durchgeführt, mit dem Ziel, eine bessere Differenzierung der Zellen und einen längeren Erhalt ihrer Funktionen *in vitro* zu ermöglichen (Übersichten s. Guillouzo, 1992, 1998). Beispielsweise wurde der Einfluss der Sauerstoffkonzentration auf den Xenobiotica-metabolismus von Hepatozyten dargestellt (Maier et al., 1994). Kollagen als Adhäsionsmatrix wurde durch komplexere Gemische aus Basalmembrankomponenten, wie Matrigel® ersetzt (Schuetz et al., 1988). In der so genannten Sandwich-Kulturtechnik werden Leberzellen zwischen zwei Kollagenschichten eingebettet (Dunn et al.,

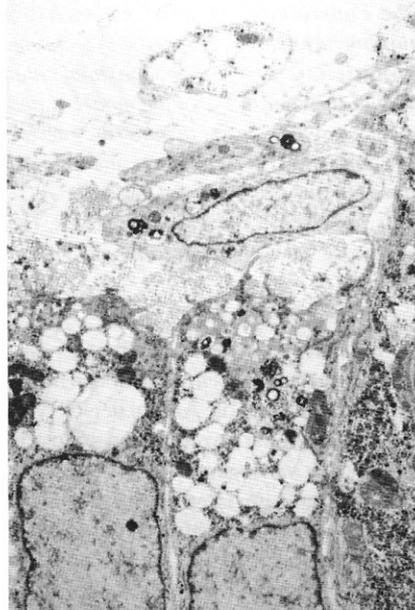


**Abbildung 1: Bioreaktor zur *in vitro* Leberzellkultur. Die Anschlussstutzen (mit roten Verschlüssen versehen) dienen zur Verbindung der Kapillarbündel im Bioreaktorinnenraum mit den entsprechenden Leitungssystemen.**

1989). Auch die Einkapselung von Hepatozyten (Cai et al., 1989) oder die Kultur auf kollagenbeschichteten Microcarriern (Agius et al., 1985) wurde für die Verbesserung der Hepatozytenfunktion *in vitro* vorgeschlagen. Ein weiterer Ansatz wird mit der Etablierung von Kokulturen der Hepatozyten mit Leberepithelzellen (Begue et al., 1984), epithelähnlichen Zelllinien (Donato et al., 1991), Sinusoidalzellen (Bader et al., 1996) oder Kupferzellen (Maier und Milosevic, 1999) verfolgt. Mit der Etablierung von Techniken zur Kultur gentransformierter Zelllinien, z.B. der V79-Zellen (Doehmer, 1993) wurde eine Möglichkeit zum Nachweis definierter CYP450-Aktivitäten *in vitro* geschaffen. Die Immortalisierung primärer Hepatozyten, beispielsweise durch Transfektion mit Simian Virus 40 (SV40) DNA, könnte eine geeignete Alternative zur Kultur primärer Zellen darstellen, birgt aber

derzeit noch das Problem einer unzureichenden Stabilität der spezifischen Zellfunktionen (MacDonald et al., 1994).

Mit dem Ziel, isolierten primären Leberzellen *in vitro* Kulturbedingungen zu bieten, die so weit wie möglich der natürlichen Situation der Zellen im Organ entsprechen, wurde ein Bioreaktor-Perfusionssystem für die dreidimensionale Kultur von Leberzellen entwickelt, zunächst für die klinische Anwendung zur extrakorporalen Leberunterstützung (Gerlach, 1996b). Das Modell beruht auf der von Knazek et al. (1972) eingeführten Kapillarperfusionstechnik in Hohlfaserreaktoren. Im Gegensatz zu statischen Modellen, die durch eine zunehmende Verarmung an Nährstoffen bei gleichzeitiger Metabolitenanreicherung gekennzeichnet sind, gewährleistet die Leberzellkultivierung unter Perfusionsbedingungen einen Stoffaustausch analog zur *in vivo* Situation der Leber mit kontinuierlicher Nährstoffzufuhr und Metabolitenentfernung. Über eine integrierte Kapillarmembran-Oxygenierung wird ein kontinuierlicher, dezentralisierter Austausch von Sauerstoff und Kohlendioxid erreicht (Gerlach et al., 1990). Die technische Ausstattung des Perfusionssystems ermöglicht eine stetige Kontrolle und Regulation wesentlicher System-



**Abbildung 2: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme von Leberzellen nach 14-tägiger Bioreaktorkultur. Unten sind mehrere Hepatozyten in kuboidaler Anordnung zu sehen. Darüber befinden sich Nichtparenchymzellen, umgeben von Bindegewebskomponenten.**

funktionen, wie Druck- und Flussbedingungen, Gasflussraten und Temperaturverhältnisse, so dass eine Anpassung der Kulturbedingungen an die jeweils aktuellen Anforderungen der Zellen vorgenommen werden kann. In vorausgehenden Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass primäre Leberzellen vom Schwein in dem entwickelten System über mehrere Wochen metabolisch aktiv bleiben (Gerlach et al., 1994a, 1994b).

In dieser Studie wurden die Zellvitalität und die metabolische Aktivität isolierter Rattenhepatozyten unter zweiwöchiger Bioreaktorkultur untersucht. In der pharmazeutischen Industrie sind Studien an Rattenzellkulturen von besonderem Interesse, da Ratten die bevorzugten Versuchstiere für Arzneimittelstudien darstellen, so dass bereits zahlreiche *in vivo* Daten aus Tierexperimenten vorliegen, die zum Vergleich herangezogen werden können. Als Maß für eine mögliche Zellschädigung unter Bioreaktorkultur wurde die Freisetzung zytosolischer und mitochondrialer Enzyme, zur Beurteilung des Zellstoffwechsels die Glukoseaufnahme und Laktatbildung sowie die Harnstoff- und die Albuminsekretion ermittelt. Die Cytochrom P450-Aktivität der Zellen wurde anhand des Umsatzes der Testsubstanzen 7-Ethoxyresorufin und 7-Ethoxycumarin bestimmt. Die Substanzen werden durch unterschiedliche CYP450-Isoenzyme (7-Ethoxyresorufin: CYP1A1; 7-Ethoxycumarin: CYP1A2) umgesetzt und vielfach für Studien zur CYP450-Expression in Hepatozyten eingesetzt (Grant et al., 1985; Donato et al., 1990).

## 2 Methoden und Materialien

### 2.1 Bioreaktoraufbau

Ein Modell des Bioreaktors ist in Abbildung 1 gezeigt. Durch den Reaktorinnenraum (Volumen: ca. 15 ml) führen drei miteinander verwobene, jedoch voneinander unabhängige Kapillarsysteme. Zwei der Kapillarbündel bestehen aus hydrophilen, porösen Kunststoffmembranen (PES, Akzo, D-Wuppertal). Die Leberzellen siedeln sich auf und zwischen den Kapillaren an und reorganisieren sich dort zu dreidimensionalen Zellverbänden (s. Abb. 2). Über die Kapillaren erfolgen sowohl die Nährstoffversorgung der Zellen als auch der Abtransport von Stoffwechselprodukten (s. Abb. 3). Ein weiteres Kapillarsystem aus hydrophoben Membranen (Oxygenierungsmembra-

nen, Mitsubishi, Japan) ermöglicht eine dezentralisierte Versorgung der Hepatozyten mit Sauerstoff und Kohlendioxid. Zur Zelleinfüllung dienen 16 Silikonkautschukkapillaren, die in unterschiedlichen Bereichen des Zellkompartiments offen münden. Die für die Bioreaktorperfusion erforderlichen Leitungssysteme werden aus speziellem Schlauchmaterial (SRT 460, Rehau, D-Rehau) angefertigt, das sich durch eine besonders geringe Adsorptionsneigung für Proteine und lipophile Substanzen auszeichnet.

## 2.2 Perfusionssystem

Das Perfusionssystem ist in modularer Bauweise konstruiert. Es besteht aus einer temperierbaren Plexiglasskammer für den Bioreaktor, einer Begasungseinrichtung, Heizung und jeweils separaten Pumpeinheiten für die Mediumrezirkulation und die Frischmediumzufuhr (s. Abb. 4). Um die technischen Voraussetzungen für die Durchführung von Langzeitversuchen unter konstanten und reproduzierbaren Bedingungen zu schaffen, wurden wesentliche Systemfunktionen automatisiert. Zur Vermeidung möglicher Druckschwankungen im Bioreaktor wurde das System mit einer elektronisch gesteuerten, druckkontrollierten Pumpensteuerung versehen (s. Abb. 5). Über digitale Anzeigen können die aktuellen Druck- und Flussverhältnisse kontinuierlich dokumentiert und kontrolliert werden. Eine Ventilatorheizung mit mikroprozessorgesteuerter Reglereinheit gewährleistet eine konstante Temperatur im Bioreaktorgehäuse. Über eine Gasmischbox mit Schwebekörperdurchflussmessern für Druckluft, Sauerstoff und Kohlendioxid kann die Zufuhr von Sauerstoff und Kohlendioxid reguliert werden.

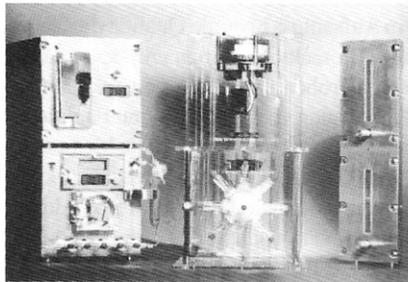
## 2.3 Zellkulturartikel

Lösungen, Medien und Zusätze wurden, wenn nicht anders angegeben, von der Firma Biochrom KG, D-Berlin, bezogen. Sterile Einwegartikel wurden von der Firma Becton Dickinson, D-Heidelberg, bezogen.

## 2.4 Leberzellisolierung

Die Hepatozyten wurden aus Lebern von männlichen Wistar-Ratten (B6V, D-Berlin) mit einem Körpergewicht von etwa 200 g aus artgerechter Aufzucht mit Fütterung *ad libitum* gewonnen. Die Leberentnahme aus Ratten zum Zweck der Zellgewinnung ist bei den zuständigen Behörden angezeigt.

Die Tiere wurden zum Zweck der *in situ* Organperfusion durch intraperitoneale Injektion von 150 mg/kg KG Ketamin (Pharmacia & Upjohn, D-Erlangen) und 10 mg/kg KG Xylazin (BayerVital, D-Leverkusen) narkotisiert. Zur Hepatozytengewinnung wurde eine Fünfschritt-Perfusion der Leber nach einer für die Zellisolierung aus Schweinelebern entwickelten Methode (Gerlach et al., 1996a) durchgeführt. Dabei wurden die Volumina und Einwirkungszeiten der einzelnen Perfusionslösungen entsprechend der geringeren Größe der Rattenleber modifiziert. Zur Auflösung des Zellverbandes im vierten Perfusionsschritt wurde Kollagenase (0,025%) vom Typ IV (Sigma-Aldrich Chemie, D-Deisenhofen) verwendet. Die Vitalität der frisch isolierten Zellen betrug 60-65%, ermittelt anhand des Trypanblau-Ausschluss-Testes. Der Anteil der Hepatozyten wurde in der Zellsuspension lichtmikroskopisch anhand der



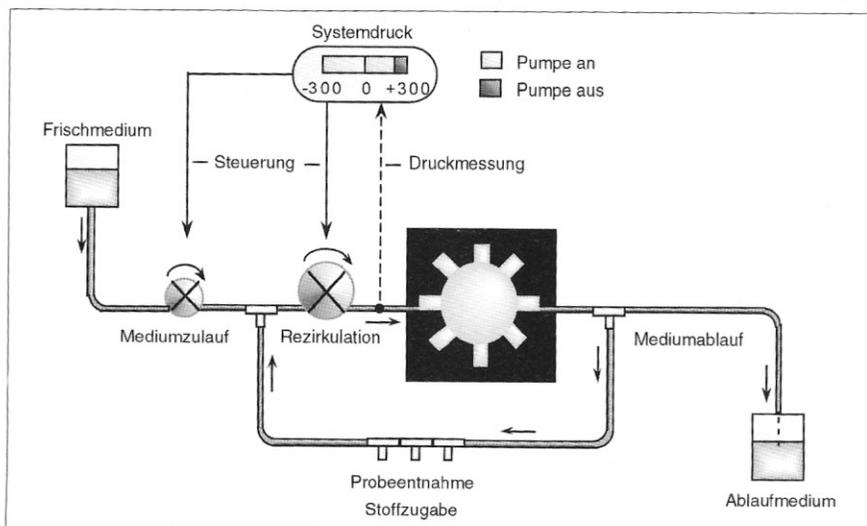
**Abbildung 4: Bioreaktor-Perfusionssystem mit Bioreaktorkammer, Begasungseinrichtung, Heizung und separaten Pumpeinheiten für die Mediumrezirkulation und die Frischmediumzufuhr.**

Größe sowie in Kontroll-Adhäsionskulturen anhand ihrer typischen Morphologie abgeschätzt und betrug etwa 95%. Um einen möglichen Verlust der Nichtparenchymzellen zu vermeiden, wurde auf eine weitere Reinigung, z.B. mittels Dichtegradientenzentrifugation, verzichtet, so dass die verwendete Zellfraktion sowohl Hepatozyten - d.h. Parenchymzellen - als auch Nichtparenchymzellen der Leber enthielt. Zur Kultur wurde jeweils eine Gesamtmenge von  $10^8$  Zellen pro Bioreaktor aus unterschiedlichen Zellpräparationen eingesetzt.

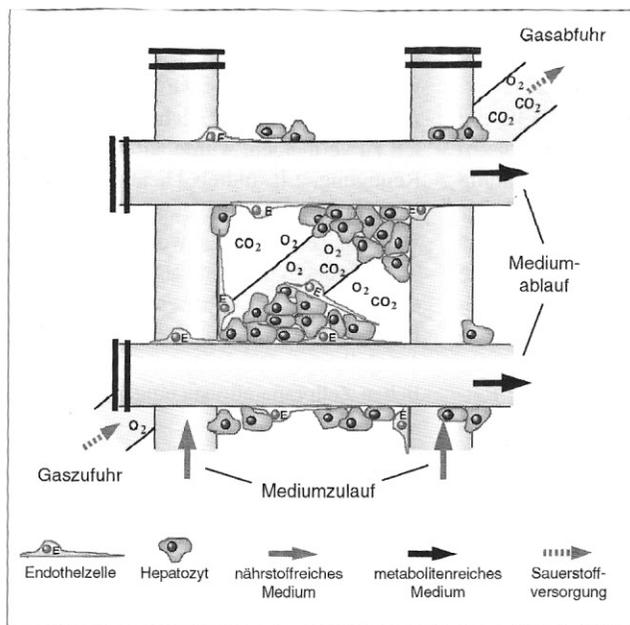
## 2.5 Kulturbedingungen

Als Kulturmedium wurde modifiziertes Williams' Medium E mit Zusatz von 7% fötalem Kälberserum (FCS), 10 mmol/l HEPES, 2 mmol/l L-Glutamin, 16 I.E./l Altinsulin (Hoechst, D-Frankfurt), 3,5 µg/l Glucagon (NovoNordisk, D-Mainz), 80 µg/l Dexamethason (Merck, D-Darmstadt), 5 mg/l Human Apotransferrin (Sigma-Aldrich Chemie), 10 ml/l Biotect-Schutzmedium, 100.000 I.E./l Penicillin, 100 mg/l Streptomycin und 2,5 mg/l Amphotericin B verwendet. Der Zusatz von FCS über den gesamten Kulturzeitraum hatte sich bereits in vorausgehenden Untersuchungen bewährt (Gerlach et al., 1994a, 1994b, 1995).

Während der Kulturphase wurden ein Sauerstoffpartialdruck im Medium von 160-200 mmHg und ein Kohlendioxidpartialdruck von 20-40 mmHg eingestellt. Unter diesen Bedingungen lag der pH-Wert im Perfusat im Bereich von 7,35-7,45, bei einer Systemtemperatur von 38°C. Ein Abfall des pH-



**Abbildung 5: Schematische Darstellung des Bioreaktorkreislaufs. Eine automatische, druckkontrollierte Pumpensteuerung sorgt für konstante Fluss- und Druckverhältnisse im System.**



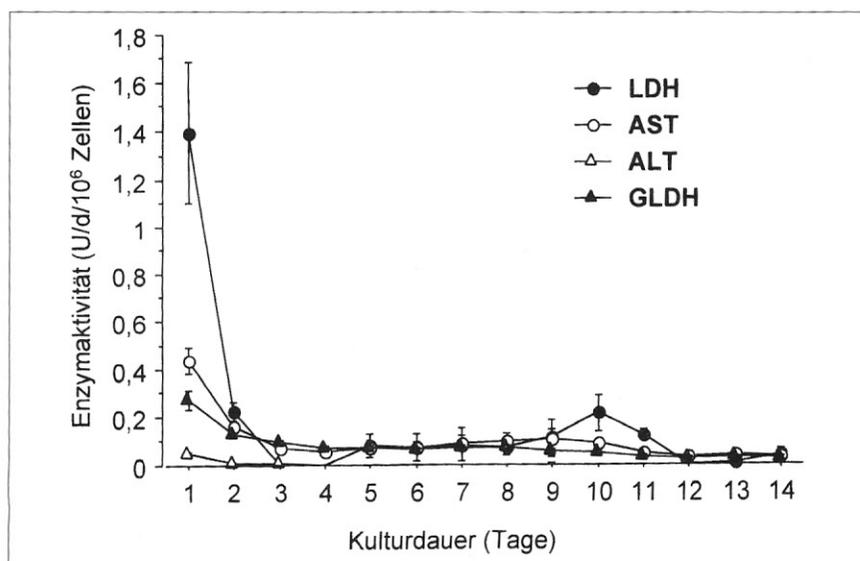
**Abbildung 3:** Schematische Darstellung der Bioreaktorperfusion. Die Mediumzufuhr und -abfuhr kann jeweils über unterschiedliche Kapillarbündel geleitet werden, so dass das Zellkompartiment gleichmäßig perfundiert wird. Über ein separates Kapillarbündel werden die Zellen mit Sauerstoff versorgt.

Wertes auf unter 7,35 wurde durch Erhöhung, ein Anstieg des pH-Wertes auf über 7,45 durch Erniedrigung der Kohlendioxidzufuhr reguliert. Die Perfusionsflussgeschwindigkeit betrug 8 ml/min, bei einem Gesamtsystemvolumen von 120 ml. In den Systemkreislauf wurde, außer während der Umsatztests, kontinuierlich Frischmedium eingespeist und gleichzeitig die entsprechende Menge Medium abgeführt. Die Mediumzufuhr betrug während der ersten 16 h nach Zelleinführung 35 ml/h, um die aus den initial geschädigten Zellen freigesetzten Elektrolyte und Stoffwechselprodukte auszuspülen, und im weiteren Kulturverlauf 5 ml/h.

## 2.6 Beurteilung der Zellqualität unter Bioreaktorkultur

Um Aufschluss über die Qualität der Zellen unter Bioreaktorkultur zu erhalten, wurden täglich Proben aus dem Systemkreislauf zur Bestimmung von Vitalitäts- und Funktionsparametern entnommen. Für die Messungen wurden, wenn nicht anders angegeben, kommerziell erhältliche Testkits (Sigma-Aldrich Chemie) verwendet.

Die Art und der Verlauf möglicher Zellschäden wurden anhand der Freisetzung zytosolischer und mitochondrialer Enzyme durch die Zellen bestimmt. Als Vertreter der zytosolischen Enzymfraktion wurden die



**Abbildung 6:** Freisetzung der Enzyme Laktatdehydrogenase (LDH), Aspartat-Aminotransferase (AST), Alanin-Aminotransferase (ALT) und Glutamat-Laktat-Dehydrogenase (GLDH) während 14-tägiger Bioreaktorkultur.

Laktatdehydrogenase (LDH)- und die Alanin-Aminotransferase (ALT)-Aktivität im Perfusat gemessen. Weiterhin wurde die Aktivität der sowohl zytosolisch als auch mitochondrial vorkommenden Aspartat-Aminotransferase (AST) und der rein mitochondrialen Glutamat-Dehydrogenase (GLDH) bestimmt. Zur Untersuchung der Glukoseumsatzraten wurden die Glukoseaufnahme- und Laktatbildungsrate der Zellen gemessen. Zum Nachweis der Proteinsynthesekapazität der Hepatozyten wurde die Albuminsekretion mit einem für Rattenalbumin spezifischen *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) von Exocell, Philadelphia, PA, USA, ermittelt. Die Harnstoffsyntheserate der Hepatozyten wurde anhand der Harnstoffkonzentration im Perfusat bestimmt.

## 2.7 Bestimmung der CYP450-Aktivität unter Bioreaktorkultur

Die Umsatztests mit den Substanzen 7-Ethoxyresorufin und 7-Ethoxycumarin (Anfangskonzentration: jeweils 10  $\mu\text{mol/l}$ ) wurden jeweils über 2 Stunden im geschlossenen System, d.h. ohne Mediumzu- und abfuhr, durchgeführt. Nach Probenentnahme aus dem Perfusat wurde das System zur Entfernung restlicher Substanzen bzw. Metabolite jeweils mit 250 ml Medium, entsprechend dem doppelten Systemvolumen, im *single pass* Modus unter Blockierung der Rezirkulation gespült. Die Konzentrationen der fluoreszierenden Phase 1-Produkte 7-Hydroxyresorufin bzw. 7-Hydroxycumarin wurden unter Modifizierung der Methode von Burke und Hallman (1978) mit einem Fluoreszenzspektrometer (Fluorocan II, ICN) gemessen. Die Exzitationswellenlänge betrug 544 (7-Hydroxyresorufin) bzw. 355 nm (7-Hydroxycumarin), die Emissionswellenlänge 590 bzw. 460 nm. Um auch den Anteil der im Rahmen der Phase 2-Reaktion konjugierten Derivate zu erfassen, wurden die Konjugate unter Bildung der Phase 1-Produkte enzymatisch gespalten, so dass diese für eine quantitative Messung zugänglich wurden. Dazu wurden jeweils 150  $\mu\text{l}$  der Proben mit 150  $\mu\text{l}$  1M Na-Acetat, pH 5,5 und 20  $\mu\text{l}$  einer Enzymmischung aus  $\beta$ -Glukuronidase und Arylsulfatase (Boehringer Mannheim, D-Mannheim) über 12 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben erneut, wie oben beschrieben, fluoreszenzspektrometrisch bestimmt.

## 2.8 Statische Auswertung und Ergebnisdarstellung

Zur Auswertung der Daten wurde das Programm StatView für Windows, Version 4.57 (Abacus Concepts) eingesetzt. Die Werte wurden jeweils für  $10^6$  Zellen berechnet, ausgehend von einer Gesamtzellzahl von  $10^8$  Zellen. Die Ergebnisse sind im Text als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts angegeben und in den Grafiken entsprechend dargestellt.

## 3 Ergebnisse

Jeweils  $10^8$  Rattenleberzellen aus unterschiedlichen Zellpräparationen wurden über 14 Tage in Bioreaktoren kultiviert ( $n=6$ ). Die Vitalität und funktionelle Aktivität der Zellen wurde anhand der Enzymfreisetzung, Glukoseaufnahme und Laktatbildung, Albuminsekretion, Harnstoffsekretion und spezifischer CYP450-Aktivitäten untersucht.

### 3.1 Enzymfreisetzung

Die Freisetzungsraten der Enzyme LDH, AST, ALT und GLDH durch die Leberzellen unter Bioreaktorkultur sind in Abbildung 6 dargestellt. Alle Enzyme zeigten am ersten Kulturtag einen deutlichen Anstieg in ihrer Freisetzung. Dabei war die LDH-Aktivität mit  $1,39 \pm 0,29$  U/d/ $10^6$  Zellen am höchsten, gefolgt von der AST-Aktivität mit  $0,43 \pm 0,06$  U/d/ $10^6$  Zellen. Die Freisetzung von GLDH und ALT war mit Werten von  $0,27 \pm 0,04$  bzw.  $0,05 \pm 0,01$  U/d/ $10^6$  Zellen deutlich geringer. Bereits am zweiten Kulturtag sanken die Enzymaktivitäten drastisch auf Werte zwischen  $0,01 \pm 0,00$  U/d/ $10^6$  Zellen (ALT) und  $0,22 \pm 0,04$  U/d/ $10^6$  Zellen (LDH). Im weiteren Kulturverlauf lagen die Freisetzungsraten aller Enzyme unter  $0,13$  U/d/ $10^6$  Zellen, mit Ausnahme eines leichten Anstiegs der LDH-Freisetzung an Tag 10.

### 3.2 Glukoseaufnahme und Laktatbildung

Beide Parameter zeigten insgesamt einen ähnlichen Verlauf (Abb. 7). Dabei ging ein steigender Glukoseverbrauch im Kulturverlauf mit einer Zunahme der Laktatproduktion durch die Hepatozyten einher. Während die Laktatfreisetzung allerdings, abgesehen von leichten Schwankungen, stetig von  $0,5 \pm 0,5$   $\mu\text{mol/d}/10^6$  Zellen am ersten Tag auf  $4,2 \pm 0,5$   $\mu\text{mol/d}/10^6$  Zellen am vierzehnten Tag, also auf das etwa Zehnfache an-

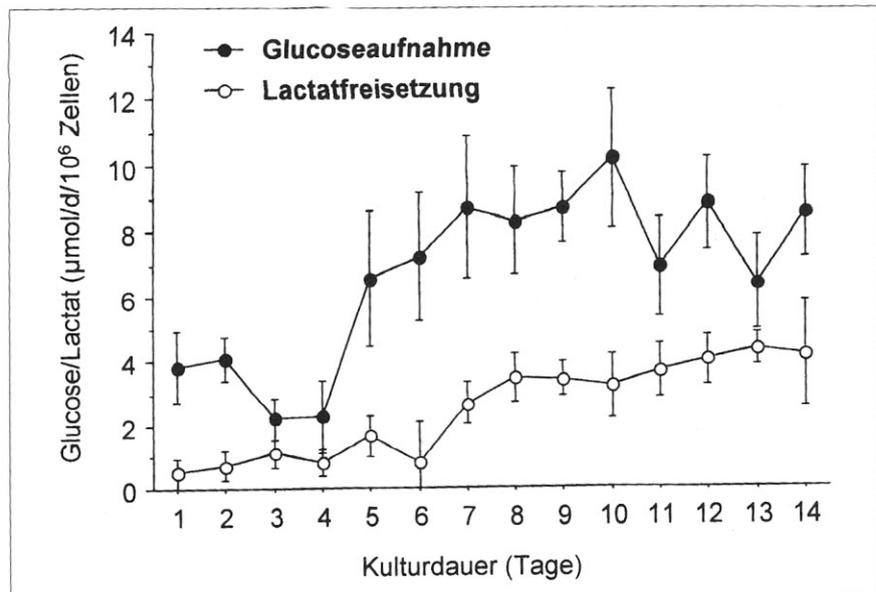


Abbildung 7: Glukoseaufnahme und Laktatfreisetzung unter 14-tägiger Bioreaktorkultur.

stieg, fiel der Glukoseverbrauch am dritten Kulturtag zunächst auf  $2,2 \pm 0,7$   $\mu\text{mol/d}/10^6$  Zellen ab. Erst ab dem fünften Tag wurde ein deutlicher Anstieg der Glukoseaufnahme rate verzeichnet. Dabei wurde am zehnten Kulturtag der höchste Wert mit  $10,2 \pm 2,1$   $\mu\text{mol/d}/10^6$  Zellen erreicht, was knapp dem Fünffachen gegenüber dem Glukoseverbrauch am dritten Kulturtag entsprach. Sowohl die Glukoseaufnahme als auch die Laktatbildung durch die Zellen wiesen erhebliche Schwankungen zwischen den einzelnen Kulturen auf.

### 3.3 Albuminsekretion

Die Albuminsekretionsrate (Abb. 8) stieg innerhalb der ersten Kulturwoche, abgesehen von einem leichten Abfall am zweiten Tag, kontinuierlich an, um am siebten Tag mit  $25,6 \pm 17,0$   $\mu\text{g/d}/10^6$  Zellen ein Maximum zu erreichen. In der zweiten Kulturwoche sank die Albuminsekretion und lag am vierzehnten Tag noch bei  $5,9 \pm 3,0$   $\mu\text{g/d}/10^6$  Zellen. Auffallend waren die erheblichen Unterschiede in der Albuminsekretion zwischen den einzelnen Kulturen.

### 3.4 Harnstoffsekretion

Die Harnstoffsekretion (Abb. 9) stieg zunächst von  $4,0 \pm 0,8$   $\mu\text{mol/d}/10^6$  Zellen am ersten Kulturtag bis auf einen Maximalwert von  $5,0 \pm 1,0$   $\mu\text{mol/d}/10^6$  Zellen am dritten Tag an. Anschließend sanken die Harnstoffsekretionsraten bis zum Ende der ersten Kulturwoche. In der zweiten Kulturwoche blieben die Harnstoffwerte, ab-

gesehen von leichten Schwankungen, stabil mit Werten zwischen  $2,1 \pm 0,3$  und  $3,0 \pm 0,6$   $\mu\text{mol/d}/10^6$  Zellen. Während in der ersten Kulturwoche die Werte der einzelnen Kulturen stark variierten, zeigten sie ab dem neunten Tag nur äußerst geringe Schwankungsbreiten.

### 3.5 Metabolische Aktivitäten

Die Umsatzraten der Testsubstanzen 7-Ethoxyresorufin und 7-Ethoxycumarin wurden am ersten, zweiten, dritten und vierten sowie am elften Kulturtag bestimmt. Dabei wurden sowohl die freien Metaboliten 7-Hydroxyresorufin bzw. 7-Hydroxycumarin als auch die im Rahmen der Phase 2-Reaktion gebildeten Konjugate nachgewiesen.

Die Gesamtumsatzraten zeigten bei beiden Substanzen einen ähnlichen Verlauf, wobei die Umsatzraten von 7-Ethoxycumarin etwa um das Dreifache höher als diejenigen von 7-Ethoxyresorufin waren (Tab. 1). Der 7-Ethoxyresorufinumsatz stieg zunächst von  $0,10 \pm 0,05$  pmol/min/ $10^6$  Zellen am ersten Kulturtag bis auf einen Maximalwert von  $0,56 \pm 0,18$  pmol/min/ $10^6$  Zellen am dritten Tag. Am vierten Kulturtag fielen die Umsatzaktivitäten deutlich ab, blieben aber anschließend bis zum elften Tag stabil bei  $0,33 \pm 0,14$  pmol/min/ $10^6$  Zellen. Auch die Umsatzraten von 7-Ethoxycumarin erreichten am dritten Kulturtag mit  $1,59 \pm 0,53$  pmol/min/ $10^6$  Zellen den höchsten Wert, um anschließend bis zum elften Tag auf  $1,05 \pm 0,42$  pmol/min/

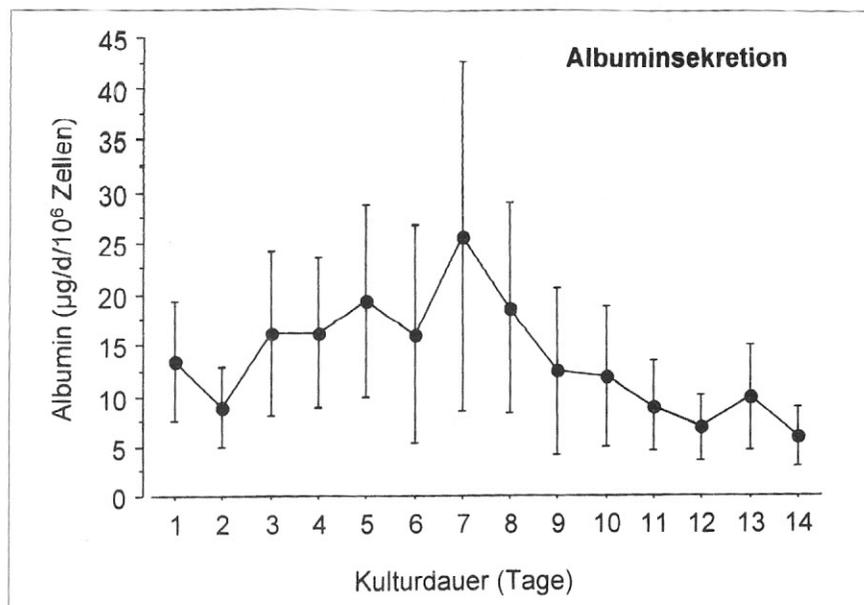


Abbildung 8: Albuminsekretion unter 14-tägiger Bioreaktorkultur.

10<sup>6</sup> Zellen abzufallen. Damit verfügten die Hepatozyten am elften Tag noch über etwa 60% (7-Ethoxyresorufinumsatz) bzw. 66% (7-Ethoxycumarinumsatz) ihrer maximalen Aktivitäten.

Während der Anteil der konjugierten Derivate an der Gesamtmetabolitenkonzentration für 7-Ethoxyresorufin etwa 50% betrug, wurden die 7-Ethoxycumarin-Metaboliten nahezu vollständig konjugiert und konnten erst nach Konjugatspaltung nachgewiesen werden.

#### 4 Diskussion

Die komplexen anatomischen und physiologischen Verhältnisse der Leber stellen

hohe Anforderungen an ein funktionierendes Kultursystem für Leberzellen *in vitro*. Um die Eignung des entwickelten Bioreaktorkultur-Perfusionssystems für pharmakologische Studien an primären Hepatozyten zu testen, wurde die Zellqualität isolierter, primärer Rattenhepatozyten unter zweiwöchiger Bioreaktorkultur untersucht. Dazu wurden anerkannte Kriterien zur Beurteilung der Zellvitalität und der metabolischen Aktivität von Hepatozyten *in vitro* (Übersicht s. Tyson und Green, 1987) herangezogen.

Die Zellintegrität wurde anhand der Freisetzung zytosolischer (LDH, ALT, AST) und mitochondrialer (AST, GLDH) Enzyme durch die Zellen bestimmt. Eine Schädigung

von Hepatozyten führt in der Regel zu einer gestörten Zellmembranpermeabilität und damit zu einer erhöhten Durchlässigkeit für zytosolische Proteine. Beim Eintritt einer Parenchymzellnekrose als Folge einer ausgeprägten Zellschädigung kommt es darüber hinaus auch zur Freisetzung mitochondrialer Enzyme. Der ausgeprägte Anstieg der Enzymaktivitäten, insbesondere der LDH-Aktivität, am ersten Kulturtag weist auf eine initiale Schädigung der Zellen hin, vermutlich verursacht durch den Prozess der Zellisolierung. Bereits am zweiten Kulturtag schienen sich die Zellen jedoch zu erholen, und auch im weiteren Kulturverlauf gaben die Enzymfreisetzungsraten keine signifikanten Hinweise auf eine vermehrte Zellschädigung.

Wesentliche Kriterien für die spezifische Hepatozytenfunktion ist deren Fähigkeit zur Protein- und Harnstoffsynthese. Da in der Leber nicht nur zelleigene Proteine, sondern auch zahlreiche „Export“-Proteine, beispielsweise Gerinnungsfaktoren und Transportproteine, hergestellt werden, zeichnen sich Hepatozyten *in vivo* durch eine hohe Proteinsyntheserate aus. Die Harnstoffbildung im Rahmen des Harnstoffzyklus ist hingegen zur Entfernung toxischen Ammoniaks lebensnotwendig für den Organismus (Ammoniak-„Entgiftung“). Beide Reaktionen sind energieabhängig und erfordern daher ein ausreichendes Angebot an Sauerstoff und Energiesubstraten. Unter Bioreaktorkultur wurde eine maximale Syntheserate von Albumin am siebten Kulturtag und von Harnstoff am dritten Kulturtag erreicht. Nach zwei Kulturwochen konnten noch 46% (Harnstoff) bzw. 23% (Albumin) der maximalen Syntheseraten nachgewiesen werden.

Die Umsatzraten der Testsubstanzen 7-Ethoxyresorufin und 7-Ethoxycumarin zeigen, dass die CYP1A1- bzw. CYP1A2-Aktivitäten der Zellen unter Bioreaktorkultur ebenfalls am dritten Kulturtag ein Maximum erreichten. Jedoch blieben bis zum Ende der Kulturdauer noch etwa zwei Drittel der maximalen Aktivitäten beider Isoenzyme bewahrt. Die Verstoffwechslung von Fremdstoffen in der Leber erfordert ein komplexes Zusammenspiel unterschiedlicher Enzymsysteme. Lipophile Fremdstoffe werden zunächst in der Regel durch spezifische CYP450-Isoenzyme unter Einführung einer funktionellen Gruppe oxigeniert (Phase 1-Reaktion). Die entstandenen Pro-

Tabelle 1: Metabolismus von 7-Ethoxyresorufin und 7-Ethoxycumarin. Der Gesamtumsatz wurde indirekt durch Messung der freien Metabolite nach Konjugatspaltung ermittelt. 10<sup>6</sup> Zellen entsprachen durchschnittlich 1,5 mg Gesamtprotein in der Zellsuspension nach Isolierung. n. d.: Freie Metaboliten konnten nicht nachgewiesen werden, da sie zu 100% konjugiert wurden.

Kulturtag (d 0 = Tag der Zellisolierung)	7-Ethoxyresorufinumsatz (pmol/min/10 <sup>6</sup> Zellen)		7-Ethoxycumarinumsatz (pmol/min/10 <sup>6</sup> Zellen)	
	freie Metaboliten (Phase 1)	Gesamtumsatz (Phase 1 + 2)	freie Metaboliten (Phase 1)	Gesamtumsatz (Phase 1 + 2)
1	0,01 ± 0,01	0,10 ± 0,05	n. d.	0,29 ± 0,12
2	0,13 ± 0,04	0,39 ± 0,15	n. d.	1,33 ± 0,56
3	0,27 ± 0,06	0,56 ± 0,18	n. d.	1,59 ± 0,53
4	0,17 ± 0,05	0,30 ± 0,10	n. d.	1,45 ± 0,65
11	0,15 ± 0,09	0,33 ± 0,14	n. d.	1,05 ± 0,42

dukte werden anschließend durch Konjugation, z.B. mit Glukuronsäure oder Sulfonsäure in eine wasserlösliche Form überführt (Phase 2-Reaktion), so dass sie über die Niere ausgeschieden werden können. Der während der gesamten Kulturdauer stabile Anteil konjugierter Derivate an der Gesamtmetabolitenkonzentration weist darauf hin, dass nicht nur die Phase 1-, sondern auch die Phase 2-Enzymaktivitäten unter Bioreaktorkultur über zwei Wochen erhalten bleiben.

Da die Versuche jeweils mit unterschiedlichen Zellpräparationen durchgeführt wurden, sind die teilweise erheblichen Schwankungen der Werte vermutlich überwiegend auf eine unterschiedliche initiale Schädigung der Zellen durch den Isolierungsprozess zurückzuführen.

Aus den Ergebnissen geht hervor, dass das Bioreaktorkulturmodell, nach einer ein- bis zweitägigen Adaptationsphase, einen Erhalt spezifischer Zellfunktionen primärer Rattenhepatozyten über einen zweiwöchigen Kulturzeitraum ermöglicht, wobei in der ersten Kulturwoche maximale Aktivitäten erreicht werden.

Folgende Faktoren wurden als entscheidend für den Erhalt zellspezifischer Funktionen in Hepatozytenkulturen beschrieben (Guillouzo, 1990, 1992):

- a) der Erhalt spezifischer morphologischer Merkmale der Hepatozyten,
- b) die Schaffung einer geeigneten extrazellulären Matrix als Adhäsionsfläche für die Zellen,
- c) die Aufrechterhaltung interzellulärer Kontakte und parakriner Funktionen,
- d) die Gewährleistung einer adäquaten Nährstoff- und Hormonversorgung, und
- e) die kontinuierliche Entfernung von toxischen Metaboliten.

Unter diesen Gesichtspunkten bietet das entwickelte Kulturmodell günstige Voraussetzungen für den Langzeiterhalt der organspezifischen Differenzierung von Leberzellen *in vitro*. Die Aggregatkultur in Bioreaktoren ermöglicht hohe Zelldichten und unterstützt die Bewahrung der typischen globulären Zellform unter Erhalt der spezifischen Zell-Zell-Verbindungen (Gerlach et al., 1995). Bei Kokultivierung von Parenchymzellen mit Nichtparenchymzellen der Leber wird eine Reorganisation der Zellen zu *in vivo*-ähnlichen, dreidimensionalen Organstrukturen mit Bildung einer eigenen extrazellulären Matrix durch die Zellen erreicht, die über mehrere Wochen er-

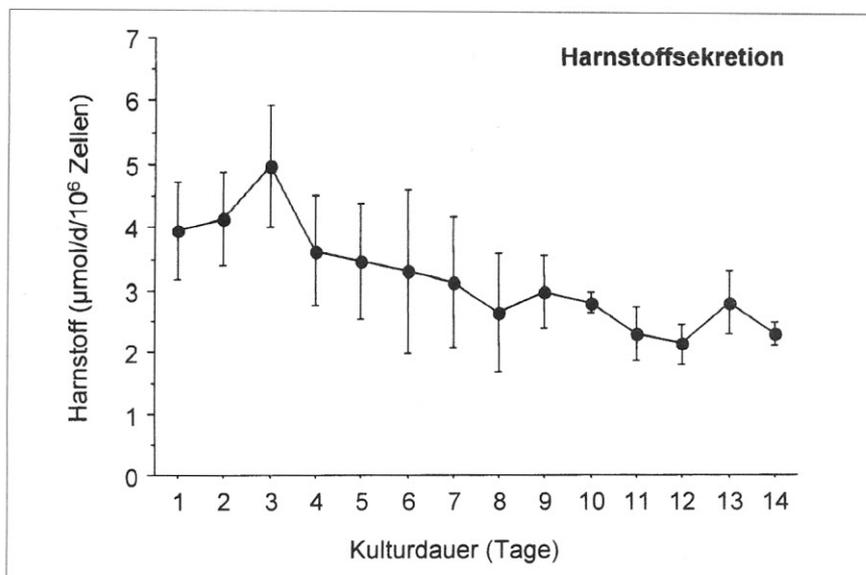


Abbildung 9: Harnstoffsekretion unter 14-tägiger Bioreaktorkultur.

halten bleibt (Abb. 2). Diese Befunde werden durch Untersuchungen von Goulet et al. (1988) bestätigt, die zeigten, dass die Kokultur von Hepatozyten mit mesenchymalen Leberzellen sowohl die gewebsspezifische Funktion der Zellen als auch die Biomatrixproduktion unterstützt. Auch an anderen Modellen der Kokultivierung von Hepatozyten mit Epithelzellen, Sinusoidalzellen oder Kupfferzellen der Leber wurde ein günstiger Einfluss zellulärer Interaktionen auf die Hepatozytenfunktion beschrieben (Begue et al., 1984; Bader et al., 1996; Maier und Milosevic, 1999).

Wesentlich für die Kultur primärer Leberzellen erscheint, dass die Perfusionsbedingungen im Bioreaktor variabel gestaltet werden können, so dass die Zellversorgung mit Energiesubstraten, Aminosäuren, Hormonen und weiteren Mediumbestandteilen auf die Anforderungen der Zellen in unterschiedlichen Kulturphasen abgestimmt werden kann.

Eine weitere Verbesserung der Zellfunktionen unter Bioreaktorkultur könnte durch eine schrittweise Erhöhung der Sauerstoffzufuhr im Laufe der Kultur erzielt werden. Der Rückgang der funktionellen Aktivitäten der Zellen ging mit einem deutlich steigenden Glukoseverbrauch sowie einer erhöhten Laktatproduktion durch die Hepatozyten einher, was auf eine unzureichende Sauerstoffversorgung der Leberzellen in der zweiten Kulturwoche hindeutet. Eine Ursache hierfür könnte ein erhöhter Sauerstoffverbrauch im System durch die Vermehrung von Nichtparenchymzellen unter Kultur

sein. Auf Sauerstoffmangel reagieren die Leberzellen mit einem Anstieg der anaeroben Glykolyse, deren Endprodukt Laktat ist, so dass der Glukoseverbrauch gleichzeitig mit einer erhöhten Laktatfreisetzung ansteigt (so genannter Pasteur-Effekt). Ein gesteigertes Sauerstoffangebot könnte daher einen verlängerten Erhalt der Zellaktivitäten ermöglichen.

Zur Steigerung der absoluten Ausbeute an Zellprodukten und Metaboliten könnte ausserdem eine Minimierung der Substanzadsorption im System beitragen. Vorläufige Untersuchungen zu diesem Aspekt haben eine etwa 50%ige Adsorption lipophiler Stoffe im Kapillarsystem ergeben (bisher unveröffentlichte Daten), so dass möglicherweise die gemessenen Werte nur einen Teil der tatsächlich gebildeten Produkte darstellen. Zur weiteren Optimierung des Systems soll daher der Einsatz von Membranmaterialien mit nicht- oder gering-adsorbierenden Eigenschaften geprüft werden.

Mögliche Anwendungsbereiche für das entwickelte Kulturmodell in der pharmazeutischen Industrie sind vor allem in Langzeitstudien zu sehen, beispielsweise zu Arzneimittel-Wechselwirkungen, zur Enzyminduktion oder zur Langzeittoxizität. Derzeit laufende eigene Untersuchungen zur Langzeitqualität primärer Hepatozyten unter Bioreaktorkultur weisen auf eine Induzierbarkeit von CYP450-Aktivitäten über mehrere Wochen hin. Auch für Anwendungen, die eine kontinuierliche Applikation erfordern, z.B. Studien zu *steady state* Bedingungen und zum *first pass effect* von

Arzneimitteln, kann das System, im Gegensatz zu statischen Modellen, eingesetzt werden. Bei einer eingesetzten Anzahl von  $10^8$  Zellen pro Kultur können etwa 4-5 Bioreaktoren aus einer Zellpräparation befüllt werden, so dass etwa 4 Parallelansätze aus einer Rattenleber möglich sind. Die Verfügbarkeit hoher Probenvolumina erleichtert die Bearbeitung komplexer Fragestellungen, welche die Parallelbestimmung vieler verschiedener Parameter erfordern. Zusätzlich ermöglicht der modulare Aufbau des Systems eine individuelle Anpassung der technischen Ausstattung an unterschiedliche Testanforderungen. Die Verwendung von automatischen Fraktionsammelgeräten ermöglicht beispielsweise eine kontinuierliche Probenentnahme. Weiterhin kann durch direkten Anschluss von Analysegeräten die Möglichkeit zur *on-line* Analyse spezifischer Parameter geschaffen werden.

Für die präklinische Pharmakaprfung wäre eine Mehrstufenstrategie denkbar. Diese könnte im ersten Schritt Kurzzeituntersuchungen zur akuten Toxizität und zur Biotransformation an vielen Substanzen in einfachen Kulturschalenmodellen umfassen. An ausgewählten Substanzen könnten anschließend Studien zur Enzyminduktion, zu Arzneimittelinteraktionen, zum *first pass effect* und zur Langzeittoxizität unter Verwendung komplexerer Modelle, wie dem vorgestellten Bioreaktorkultursystem, durchgeführt werden, als Basis für eine weitere Vorauswahl unter den geprüften Stoffen bereits vor der Durchführung der notwendigen Tierexperimente. Eine solche Vorgehensweise hätte durch den frühen *in vitro* Ausschluss ungeeigneter Substanzen eine erhebliche indirekte Einsparung von Tierversuchen zur Folge.

## Literatur

- Agius, L., Battersby, C. and Alberti, K. G. (1985). Monolayer culture of parenchymal rat hepatocytes on collagen-coated microcarriers. A hepatocyte system for short- and long-term metabolic studies. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 21, 254-259.
- Bader, A., Knop, E., Kern, A., Boker, K., Fruhauf, N., Crome, O., Esselmann, H., Pape, C., Kempka, G. and Sewing, K. F. (1996). 3-D coculture of hepatic sinusoidal cells with primary hepatocytes-design of an organotypical model. *Exp. Cell Res.* 226, 223-233.
- Begue, J. M., Guguen, G. C., Padeloup, N. and Guillouzo, A. (1984). Prolonged maintenance of active cytochrome P-450 in adult rat hepatocytes co-cultured with another liver cell type. *Hepatology* 4, 839-842.
- Burke, M. D. and Hallman, H. (1978). Microfluorimetric analysis of the cytochrome P448 associated, ethoxyresorufin O-deethylase activities of individual isolated rat hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.* 27, 1539-1544.
- Cai, Z. H., Shi, Z. Q., Sherman, M. and Sun, A. M. (1989). Development and evaluation of a system of microencapsulation of primary rat hepatocytes. *Hepatology* 10, 855-860.
- Doehmer, J. (1993). V79 Chinese hamster cells genetically engineered for cytochrome P450 and their use in mutagenicity and metabolism studies. *Toxicology* 82, 105-118.
- Donato, M. T., Castell, J. V. and Gomez, L. M. (1991). Co-cultures of hepatocytes with epithelial-like cell lines: expression of drug-biotransformation activities by hepatocytes. *Cell Biol. Toxicol.* 7, 1-14.
- Donato, M. T., Gomez, L. M. and Castell, J. V. (1990). Drug metabolizing enzymes in rat hepatocytes co-cultured with cell lines. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 26, 1057-1062.
- Dunn, J. C., Yarmush, M. L., Koebe, H. G. and Tompkins, R. G. (1989). Hepatocyte function and extracellular matrix geometry: long-term culture in a sandwich configuration. *FASEB J.* 3, 174-177.
- Gerlach, J., Brombacher, J., Smith, M. and Neuhaus, P. (1996a). High yield hepatocyte isolation from pig livers for investigation of hybrid liver support systems: influence of collagenase concentration and body weight. *J. Surg. Res.* 62, 85-89.
- Gerlach, J., Kloppel, K., Stoll, P., Vienken, J. and Muller, C. (1990). Gas supply across membranes in bioreactors for hepatocyte culture. *Artif. Organs* 14, 328-333.
- Gerlach, J., Unger, J., Hole, O., Encke, J., Muller, C. and Neuhaus, P. (1994a). Bioreaktor zum Langzeiterhalt differenzierter hepatischer Zellfunktionen für *in vitro* Wirkstoffprüfungen alternativ zu Tierversuchen. *ALTEX* 11, 207-215.
- Gerlach, J. C. (1996b). Development of a hybrid liver support system: a review. *Int. J. Artif. Organs* 19, 645-654.
- Gerlach, J. C., Encke, J., Hole, O., Muller, C., Ryan, C. J. and Neuhaus, P. (1994b). Bioreactor for a larger scale hepatocyte *in vitro* perfusion. *Transplantation* 58, 984-988.
- Gerlach, J. C., Schnoy, N., Encke, J., Smith, M. D., Muller, C. and Neuhaus, P. (1995). Improved hepatocyte *in vitro* maintenance in a culture model with woven multicompartiment capillary systems: electron microscopy studies. *Hepatology* 22, 546-552.
- Grant, M. H., Melvin, M. A., Shaw, P., Melvin, W. T. and Burke, M. D. (1985). Studies on the maintenance of cytochromes P-450 and b5, monooxygenases and cytochrome reductases in primary cultures of rat hepatocytes. *FEBS Lett.* 190, 99-103.
- Goulet, F., Normand, C. and Morin, O. (1988). Cellular interactions promote tissue-specific function, biomatrix deposition and junctional communication of primary cultured hepatocytes. *Hepatology* 8, 1010-1018.
- Guguen, G. C., Gripon, P., Vandenberghe, Y., Lamballe, F., Ratanasavanh, D. and Guillouzo, A. (1988). Hepatotoxicity and molecular aspects of hepatocyte function in primary culture. *Xenobiotica* 18, 773-783.
- Guillouzo, A. (1992). Hepatotoxicity. In J. M. Frazier (eds.), *In vitro toxicity testing. Applications to safety evaluation* (45-83). Baltimore, Maryland: Marcel Dekker, Inc.
- Guillouzo, A. (1998). Liver cell models in *in vitro* toxicology. *Environ. Health Perspect.* 106, 511-532.
- Guillouzo, A., Morel, F., Ratanasavanh, D., Chesne, C. and Guguen, G. C. (1990). Long-term culture of functional hepatocytes. *Toxicol. In Vitro* 4, 415-427.
- Knazck, R. A., Gullino, P. M., Kohler, P. O. and Dedrick, R. L. (1972). Cell culture on artificial capillaries: an approach to tissue growth *in vitro*. *Science* 178, 65-66.
- MacDonald, C., Vass, M., Willett, B., Scott, A. and Grant, H. (1994). Expression of liver functions in immortalised rat hepatocyte cell lines. *Hum. Exp. Toxicol.* 13, 439-444.
- Maier, O. P., Saad, B. and Schawalder, H. P. (1994). Effect of periportal- and centrilobular-equivalent oxygen tension on liver specific functions in long-term rat hepatocyte cultures. *Toxicol. In Vitro* 8, 423-435.
- Maier, P. and Milosevic, N. (1999). Kokulturen zwischen primären parenchymalen und nichtparenchymalen Leberzellen der Ratte verbessern die Aussagekraft von organspezifischen *in vitro* Toxizitätstests. *ALTEX* 16, 87-89.
- Schuetz, E. G., Li, D., Omiecinski, C. J., Muller, E. U., Kleinman, H. K., Elswick, B. and Guzelian, P. S. (1988). Regulation of gene expression in adult rat hepatocytes cultured on a basement membrane matrix. *J. Cell Physiol.* 134, 309-323.
- Skett, P. (1994). Problems in using isolated and cultured hepatocytes for xenobiotic metabolism/metabolism-based toxicity testing-solutions? *Toxicol. In Vitro* 8, 491-504.
- Tyson, C. A. and Green, C. E. (1987). Cytotoxicity measures: choices and methods. In E. J. Rauckman and G. M. Padilla (eds.), *The isolated hepatocyte: use in toxicology and xenobiotic biotransformations* (119-158). Orlando, Florida: Academic Press.

## Danksagung

Das Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministers für Bildung, Wissenschaft und Forschung (BMBF) unter dem Förderkennzeichen 0311252, und von der Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zu Tierversuchen (ZEBET) unter dem Geschäftszeichen Z.5.1-1328-136 gefördert.

## Korrespondenzadresse

Dr. Katrin Zeilinger  
Charité Campus Virchow-Klinikum  
AG Experimentelle Chirurgie  
Forschungshaus  
Augustenburger Platz 1  
D-13353 Berlin