



DIE VERWENDUNG VON LEBERZELLKULTUREN
UND VON MENSCHLICHEN LEBERBANKEN
IN DER PHARMAKOLOGISCHEN UND TOXIKOLOGISCHEN FORSCHUNG

Urs A. Meyer
Institut für Pharmakologie
Biozentrum, Basel

Hühnerembryohepatozyten in primärer Monolayerkultur exprimieren differenzierte Funktionen des Arzneimittel- und Fremstoff-metabolismus und werden als Modellsystem zu Regulationsstudien der hepatischen Biotransformation von Arzneimitteln sowie von mutagenen, cancerogenen und teratogenen Substanzen verwendet. Kürzliche Untersuchungen in anderen Forschungsgruppen haben gezeigt, dass auch menschliche Leberzellen für längere Zeit unter Kulturbedingungen in der Zukunft für solche Zwecke verwendet werden können.

Leber von hirntoten Organspendern und Leberbiopsien, die während Bauchoperationen entnommen werden, können zur Voraussage der Abbaureaktionen neuer Arzneimittel zu inaktiven, aktiven oder toxischen Metaboliten verwendet werden. Die betreffenden Enzyme der Leber bleiben in gefrorenem Zustand bei -80°C über mehrere Jahre funktionell unverändert. Durch die Verwendung einer grösseren Zahl von Gewebeproben von verschiedenen Spendern können zusätzlich interindividuelle Unterschiede im Arzneimittelabbau erfasst werden.

Beide diskutierten Verfahren können gewisse Ganztierversuche ersetzen oder reduzieren.

Literatur

Hirsiger, H., Giger, U., Meyer, U.A.

Stimulation of DNA-Synthesis and mitotic activity of chick embryo hepatocytes in primary culture. Effect on Induction of polysubstrate monooxygenase activity.

In vitro 20, 172-182, 1984

Meyer, P.J., Müller, H.K., Dick, B., Meyer, U.A.

Hepatic monooxygenase activities in subjects with a genetic defect in drug oxidation.

Gastroenterology, 85, 682-692, 1983



VIEL INFORMATION AUS WENIG TIEREN

Jürg Elsner
Institut für Toxikologie,
ETH und Universität Zürich
Schwerzenbach

Vergleicht man physikalische mit biologischen Messungen, so erscheint ein grundsätzlicher Unterschied: In der Physik werden präzise definierbare Werte gemessen, wobei der Messfehler den Hauptanteil der Mess-Streuung ausmacht. In der Biologie ist auch bei maximaler Standardisierung der Messanordnung nie ein einheitlicher Messwert zu erwarten, sondern immer eine Wertverteilung, in welcher der Messfehler im allgemeinen vernachlässigbar ist. Die Streuung und Charakterisierung der Verteilungen sind daher ein essentieller Bestandteil der Messungen.

Viele biologische Versuche haben zum Ziel, feine Unterschiede zwischen Messwerten aus speziell behandelten Organismen und jenen aus der Grundgesamtheit erkennen zu können. Die Empfindlichkeit solcher Messungen hängt dabei von der Breite der Messwertverteilungen, dem zu erkennenden Unterschied und von der Anzahl unabhängiger Messungen ab. Zusätzlich sind auch systematische Fehler zu berücksichtigen, welche bei Extrapolationen durch Spezies-Unterschiede entstehen.

Bei Tierversuchen ist die Zahl unabhängiger Messungen die Anzahl Tiere, welche für den Versuch eingesetzt werden. Will man diese Zahl möglichst klein halten, so gilt es, bei gleicher Empfindlichkeit die Messung so zu gestalten, dass die Breite der Messverteilungen klein und der zu erwartende Unterschied gross ist. Hauptsächlich für Versuche, welche routinemässig durchgeführt werden müssen, ist die Entwicklung solcher Techniken wichtig und meist auch möglich.

Führen solche Messungen zu schwerwiegenden Entscheidungen, so können die zu erwartenden Kosten berechnet werden, welche durch allfällige Fehlentscheidungen verursacht werden. Werden zusätzlich ethische Gesichtspunkte berücksichtigt, so kann die optimale Anzahl Tiere ermittelt werden, die für den Versuch notwendig ist.

Literatur:

J.Elsner & G.Zbinden
Statistical problems and possible solutions with small sample sizes in toxicology in
"Current problems in drug toxicology"
G.Zbinden, F.Cohadon, J.Y.Detaille, G.Mazue (eds)
John Libbey, Paris/London
1983, p. 145-154



COMPUTER ASSISTED DRUG DESIGN

Angelo Vedani
Laboratorium für Organische Chemie
ETH Zürich

Computer Assisted Drug Design (CADD), genauer Computer Assisted Molecular Modelling (Camm), versucht mit Computerunterstützung ein kleines Molekül (Pharmakophor) zu finden, welches die elektronischen und stereochemischen Voraussetzungen erfüllt, um in optimaler Weise an die Rezeptorstelle eines Makromoleküls (z.B. Protein) zu binden. Mit Molecular Mechanics Methoden (Kraftfeldrechnungen) lässt sich die innere Energie eines Pharmakophor-Rezeptor-Komplexes als Funktion seiner Konformation berechnen. Durch Simulation molekularer Bewegungen wie Translation, Rotation und Drehung von Molekülfragmenten um Einfachbindungen lässt sich eine Konformation minimaler Energie finden, aus der die Bindungsstärke des kleinen Moleküls an den Rezeptor abgeschätzt werden kann. Dadurch kann CADD/Camm Tierexperimente des "drug screening" Prozesses (der versuchstierintensiven groben Abklärung der pharmakologischen Wirkung einer Serie verwandter Substanzen) ersetzen.

Unbedingte Voraussetzung für CADD/Camm ist die Kenntnis der exakten 3-dimensionalen Struktur der Rezeptorstelle, welche ausschliesslich durch Röntgenbeugungsexperimente an einkristallinen Proben bestimmbar ist. Ein wichtiges Anwendungsgebiet für CADD/Camm sind Wechselwirkungen von Enzymen mit kleinen Molekülen (Substrate, Inhibitoren), weil im letzten Jahrzehnt die Kristallstrukturbestimmungen an Proteinen sprunghaft angestiegen sind. Heute sind bei der Brookhaven Protein Data Bank die vollständigen räumlichen Koordinaten von 235 Proteinen hinterlegt.

Computer Graphics Methoden erlauben es, ein komplexes Molekül in 3-dimensionaler Stereoprojektion auf einem Bildschirm abzubilden und molekulare Bewegungen in "Echtzeit" auszuführen. Dies ist notwendig, um das kleine Molekül in der Rezeptor-Kavität visuell vorzupositionieren. Viele "on-line" Hilfen, wie geometrische und energetische Informationen über die aktuelle Konformation, unterstützen das optische Andocken des Pharmakophors.

Daran anschliessend relaxieren Molecular Mechanics Methoden das System durch Simulation molekularer Bewegungen zu einer Konformation minimaler Energie. Die berechnete innere Energie dieser Minimums-Konformation ist ein Mass für die Bindungsstärke des des Pharmakophors an den Rezeptor. Mit CADD/Camm lassen sich 'unwirksame' Moleküle sicher erkennen und müssen daher weder synthetisiert noch in Tierexperimenten unnötig getestet werden.

Die Methode CADD/Camm wird am Beispiel der Carboanhydrase-Hemmung durch Sulfonamide vorgestellt. Carboanhydrase, ein monomeres Metallo-Enzym (Zn^{2+}), besteht aus 260 Aminosäuren und katalysiert die reversible Hydratation von CO_2 zu HCO_3^- . Aromatische und heterozyklische Sulfonamide sind spezifische Inhibitoren der Carboanhydrase, was auf der 3-dimensionalen Struktur analogie der Sulfonamid-Gruppe und dem natürlichen Substrat HCO_3^- beruht.



ZELLKULTURMETHODEN ZUR ABSCHÄTZUNG DER REIZWIRKUNG VON CHEMIKALIEN AUF HAUT UND SCHLEIMHAUT

Christoph Reinhardt
Institut für Toxikologie,
ETH und Universität Zürich
Schwerzenbach

Bei starken akuten Reizwirkungen von Chemikalien auf Haut und Schleimhaut sind im Tierversuch und nach klinischen Beobachtungen schwere Zellschädigungen festzustellen. Solche zytotoxische Effekte können auch in Zellkulturen ausgelöst werden, was zur Ansicht geführt hat, dass die Routinetests an Versuchstieren (zur Abschätzung einer potentiellen Reizwirkung am Menschen) durch in vitro Alternativen ersetzt werden könnten.

Drei verschiedene Zytotoxizitätstests wurden evaluiert und anhand von 55 Substanzen (anorg. & org. Metallsalze, Lösungsmittel, Detergentien, Reagenzien, Arzneimittel), welche sehr unterschiedliche toxische Wirkungsmechanismen aufweisen. Hamster Fibroblasten (BHK 21-Cl3) und zwei Zellstämme von Human-fibroblasten (Keller, MRC 5) wurden verwendet um die drei Endpunkte "Zellablösung", "Wachstumshemmung" und "Klonbildung" zu untersuchen. Die Beziehung zwischen Daten aus dem ersten mit dem zweiten oder dritten Test war für jede Substanz charakteristisch und deutete auf deren Wirkungsmechanismus hin.

Die Substanzen wurden nach ihrer jeweiligen niedrigsten Wirkkonzentration geordnet. Die Rangordnung der Substanzen war bei allen drei Tests und bei allen drei Zelltypen sehr ähnlich, obwohl die Empfindlichkeit des Zellablösungstests bis drei Grössenordnungen niedriger als diejenige der zwei anderen Tests war.

Beim Vergleich dieser in vitro Resultate mit in vivo Daten aus der Literatur wurde eine bessere Korrelation für Arbeitsplatzbelastungswerte (TLV, $r=0.73$) als für LD 50-Werte (Ratte, oral, $r=0.52$) festgestellt. Korrelationen mit Daten aus Haut- und Schleimhaut-Reiztests nach Draize sind nicht sinnvoll, da diese in vivo Tests unter sehr variablen Testbedingungen durchgeführt werden.

Es ist jedoch möglich und sinnvoll, Substanzen aufgrund von Human-Erfahrungswerten aus der Medizin und der Arbeitsplatzbelastung bezüglich Haut- & Augenreizung in drei grobe Klassen einzuteilen (nicht reizend / schwach-mässig reizend / stark reizend oder korrosiv). Diese Klasseneinteilung ist auch mit den hier vorgestellten in vitro Tests möglich; bei richtiger Schrankensetzung ist die Übereinstimmung in mehr als 80% der Substanzen richtig. Innerhalb einzelner Substanzgruppen wie Organozinn und Alkohole sind weitergehende Korrelationen möglich, welche zu Voraussagen möglicher in vivo Effekte dienen können.



IN VITRO PERFUSION VON MENSCHLICHEM PLAZENTAGEWEBE

Henning Schneider
Arbeitsgruppe für Perinatalphysiologie
Klinik und Poliklinik für Geburtshilfe
Universität Zürich

Trotz der einheitlichen funktionellen Aufgabe der Plazenta, die im Schutze und in der Versorgung des Feten gesehen wird, hat die Entwicklung dieses Organs bei den verschiedenen Säugetierarten zu einer Vielzahl von Varianten geführt, wobei die Unterschiede im makroskopischen Aufbau, dem Strömungsmuster des mütterlichen und fetalen Blutkreislaufes und auch in der für die Permeabilität entscheidenden mikroskopischen Beschaffenheit der Trennschichten zwischen mütterlichem und fetalem Blut zum Ausdruck kommen. Die im Tierversuch gewonnenen Erkenntnisse zur Physiologie des maternofetalen Stoffaustausches sind somit nur von begrenztem Wert, da eine Übertragung auf andere Spezies oder auf den Menschen häufig irreführend ist. Entsprechenden Untersuchungen in vivo sind beim Menschen aus naheliegenden Gründen enge Grenzen gesteckt, und die Verfügbarkeit der Plazenta unmittelbar nach der Geburt hat zu dem Ausbau verschiedener in vitro Versuchsanordnungen unter Verwendung von menschlichem Plazentagewebe geführt.

Die in vitro Perfusion wird verglichen mit anderen Organen beträchtlich kompliziert, da in der Plazenta zwei getrennte Blutkreisläufe, mütterlicher- und fetaler, vorliegen. Die Arbeit unserer Gruppe hat zu der Entwicklung einer Methode zur doppelseitigen Perfusion eines Lobus der intakten Plazenta geführt, die auch von anderen Gruppen übernommen worden ist. Es werden dabei unmittelbar nach der Geburt der Plazenta ein Chorionarterienast mit der dazugehörigen Vene katheterisiert und der Zottengefäßabschnitt des zugehörigen Lobus wird mit Pufferlösung durchspült. Der präparierte Gewebsbereich wird von der restlichen Plazenta getrennt und in einem Haltering fixiert, der dann in einer Perfusionskammer bei 37°C gelagert wird. Zur Erstellung des zweiten Perfusionskreislaufes im mütterlichen Kompartiment der Plazenta werden 4-5 feine Metallkanülen durch die intakte Deziduaplatte in den intervillösen Raum eingeführt. Der Rückstrom erfolgt für die fetale Seite durch die katheterisierte Chorionvene, während das mütterliche Perfusionsmedium durch venöse Öffnungen in der Deziduaplatte abfließt. Mütterliches und fetales Strömungskompartiment werden an getrennte Kreisläufe angeschlossen und Perfusionsdruck, Strömungsraten, sowie Temperatur, pH und Gaspartialdrucke werden überwacht.

Aus dem arteriellen und venösen Schenkel beider Kreisläufe können separat Proben entnommen werden. Neben der Messung des Verbrauches von Sauerstoff und Glukose, sowie der Produktion von Lactat und Pyruvat bieten der Nachweis der Hormonsynthese sowie des aktiven Transports von Aminosäuren einen guten Anhalt für die Stoffwechselaktivität des Gewebes.

Neben der Beschreibung der Methode werden Ergebnisse zur Permeabilität der Plazentamembran für hydrophile Stoffe verschiedener Molekülgrösse unter besonderem Hinweis auf die Unterschiede zu anderen Spezies vorgestellt.



IN VITRO MODELL UND TIERVERSUCH IN DER NEUROPHARMAKOLOGIE INTERDEPENDENZ UND NEUE ENTWICKLUNGEN

Walter Lichtensteiger
Pharmakologisches Institut der Universität Zürich

Angeichts der Komplexität des Nervensystems sind Neuropharmakologen schon seit vielen Jahrzehnten bemüht, bestimmte Vorgänge an vereinfachten Modellen zu studieren. Es sei an den isolierten Meerschweinchendarm erinnert, mit dessen Hilfe immerhin die körpereigenen Opiate entdeckt worden sind. Heute stehen uns verschiedene Alternativmethoden zur Verfügung, die auf wesentlich verfeinerten Methoden beruhen:

- (1) Nervenzellkulturen eignen sich zum Studium verschiedener elementarer Prozesse. Sie stellen aber in mancher Hinsicht ein künstliches System dar.
- (2) Eine unter Nicht-Spezialisten weniger bekannte Alternative ist das etwa 0.5 mm dicke Gewebsscheibenpräparat, an welchem sehr viele nervöse Prozesse in ausgewählten Hirnregionen (z.B. im Hippocampus) untersucht werden können. Dieses Präparat hat den Vorteil, dass innerhalb des Gewebsstückes die Verschaltung der Nervenzellen dem normalen Zustand entspricht. Ein analoges, kombiniertes Präparat aus Zwischenhirn und Hypophyse kann zum Studium der zentralnervösen Kontrolle der Hormonsekretion herangezogen werden.
- (3) Als Fortschritt im Sinne des Tierschutzes ist nicht nur ein Ersatz gewisser Versuche am intakten Tier durch solche an in vitro-Modellen anzusehen, sondern auch die Reduktion der Zahl der benötigten Versuchstiere. Dank neuartiger Methodik kann aus einem einzelnen Versuchstier heute wesentlich mehr Information gewonnen werden. Als Beispiel können hier einzelne moderne autoradiographische Methoden, insbesondere die quantitative Rezeptorautoradiographie, dienen. Bei diesem Verfahren wird die Bindung von Pharmaka an Rezeptorstellen in verschiedenen Hirnregionen an histologischen Gewebsschnitten (10µm) untersucht, welche in vitro mit dem radioaktiv markierten Pharmaka inkubiert werden. Mit Gewebsschnitten aus einem einzigen Gehirn (z.B. einer Ratte) können so zahlreiche Bindungsexperimente mit verschiedenen Substanzen durchgeführt werden.

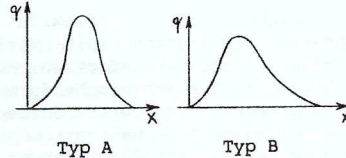
Allen Alternativmethoden in der Neurobiologie ist eines gemeinsam: Die Komplexität des Gehirns bringt es mit sich, dass an Modellen nur Teilprobleme gelöst werden können. Alternativmethoden können deshalb in der Neurobiologie nur dann entwickelt und sinnvoll eingesetzt werden, wenn ihre Ergebnisse immer wieder mit den Verhältnissen am intakten Tier verglichen werden können. Die Interdependenz von Alternativmethoden und Versuch am Tier wird an Hand der genannten Beispiele erörtert werden.



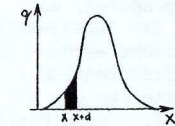
DAS GAUSS'SCHE WAHRSCHEINLICHKEITSNETZ

Theodor Reich
Universitätsklinik für Nuklearmedizin
und Radiotherapie, USZ

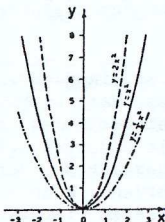
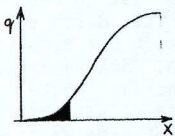
Für quantitativ ansprechbare Eigenschaften gilt die Arbeitshypothese: Die Stichprobe einer homogenen (nicht notwendigerweise reinen) Grundgesamtheit streut nach Gauss. Ist die Eigenschaft Folge eines "toten" Wachstums (Ablagerung, Verkrustung), ist die Verteilung normal (symmetrisch), Typ A; ist sie Folge eines "lebendigen" Wachstums ist die Verteilung logarithmisch normal, Typ B, (d.h. wird die Abszisse in logarithmischem Raster eingeteilt, wird die Verteilung normal).



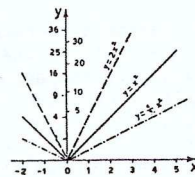
Wird die Häufigkeit auf der Ordinate relativ oder prozentual aufgetragen, bedeutet die Gesamtfläche unter der Kurve = alle Fälle der Stichprobe, also 1 oder 100%. Die Fläche unter der Kurve über einem Abszissenintervall verglichen mit der Gesamtfläche gibt die relative oder prozentuale Häufigkeit der Stichprobenmesswerte innerhalb des betrachteten Intervalls. Diese Darstellung gibt Antwort auf: "Wieviel Fälle relativ oder in Prozenten finde ich im Grössenbereich von x bis $x+d$?"



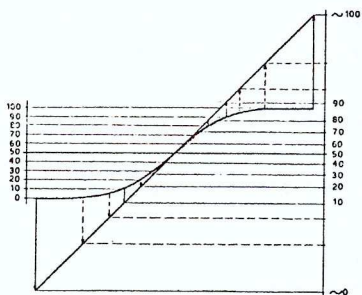
Neue Fragestellung: "Wieviele Fälle relativ oder in Prozent liegen im Grössenbereich kleiner gleich x ? Wir erhalten eine Sigmoidkurve. Praktische Messwerte ergeben im Graphen keine linearen "Gebilde" sondern Punktwolken. Krumm geformte Punktwolken sind schwer ansprechbar. Geradlinig geformte Punktwolken können kontrolliert werden. Also Trick: Wir transformieren auf Grund einer Annahme der funktionalen Abhängigkeit die Ordinate in der Weise, dass bei geradlinig geformter Punktwolke unsere Annahme richtig zu sein scheint:



Nicht transformiert



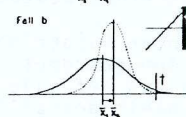
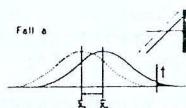
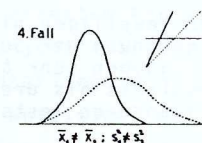
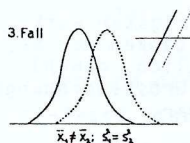
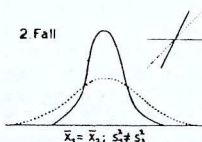
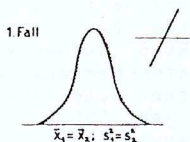
transformiert



Auf entsprechende Art wird die Ordinate bei angenommener Gaussverteilung transformiert. Erhält nach dieser Transformation die Punktwolke eine geradlinige Form, schliesse ich auf das Vorhandensein einer Gaussverteilung. Die Geraden im Gauss'schen Wahrscheinlichkeitsnetz schildern auf Grund ihrer Lage und Neigung das Wesen der Stichproben. Nehmen wir die Hypothese eines Streuens nach Gauss an, müssen zur Darstellung der Geraden nur

die ersten paar Messwerte genommen werden. Deren Anzahl hängt ab von der Güte der Anordnung auf einer Geraden.

Verwenden wir die den Prozentwerten entsprechenden Probitwerte, kann auch bei Tierversuchen jede "Gerade" als lineare Regressionsgerade mit mittlerer Steigung und Standardfehler im Neigungswinkel und in Ordinatenrichtung dargestellt werden. Verschiedene Geraden können dadurch in Lage und Neigung verglichen werden.



Die Bedeutung der Methode wird an medizinischen Beispielen erläutert.

Literatur

Th. Reich
Idee und Praxis der medizinischen Statistik
Huber, Bern (1964)