

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktorin: Prof. Dr. med. Julia Mayerle

**3D-Mikrogewebe menschlicher Hepatozyten
als in vitro-Modell zur Testung
medikamentös-induzierter Hepatotoxizität**

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

vorgelegt von

Daniela Rimböck

aus Deggendorf

2019

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. Alexander Gerbes
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Norbert Grüner
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. med. Andreas Benesic
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung:	28.02.2019

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Medikamentös-induzierte Hepatotoxizität	1
1.1.1	Die Rolle der Leber bei der Biotransformation von Medikamenten.....	1
1.1.2	Pathophysiologie medikamentös-induzierter Hepatotoxizität.....	2
1.1.2.1	Intrinsische Hepatotoxizität	3
1.1.2.2	Idiosynkratische Hepatotoxizität.....	3
	a) Metabolische Idiosynkrasie	4
	b) Immunologische/allergische Idiosynkrasie	6
1.1.3	Klinisches Bild und Diagnostik.....	8
1.1.4	Epidemiologie medikamentös-induzierter Leberschädigungen.....	9
1.2	Zellmodelle als Testsystem medikamentös-induzierter Hepatotoxizität	11
1.2.1	Pluripotente Stammzellen.....	11
1.2.2	Immortale und transfizierte Leberzelllinien	12
1.2.3	Primäre humane Hepatozyten	13
1.2.4	3D InSight™ Human Liver Microtissues	14
2	Material und Methoden	15
2.1	Material	15
2.1.1	Zellen und Kulturmedien.....	15
2.1.2	Chemikalien und Reagenzien.....	16
2.1.3	Zusätzliche Materialien	17
2.1.4	Geräte.....	18
2.1.5	Software	19
2.2	Methoden.....	19
2.2.1	Medikamenten- und Donorenauswahl	19
2.2.2	Arbeit in der Zellkultur.....	23
2.2.3	Promega Assays	27
2.2.3.1	CellTiter-Blue® Cell Viability Assay	28
2.2.3.2	Caspase-Glo® 3/7 Assay.....	29
2.2.3.3	CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay.....	30

2.2.4	Auswertung der Messdaten	33
2.2.4.1	Caspase-Glo® 3/7 Assay und CellTiter-Blue® Cell Viability Assay	33
2.2.4.2	CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay.....	33
2.2.5	Statistik.....	34
3	Ergebnisse.....	34
3.1	Darstellung spezifischer, medikamentöser Schädigungsmuster.....	34
3.1.1	Acetaminophen.....	37
3.1.2	Amiodaron	41
3.1.3	Diclofenac.....	46
3.1.4	Isoniazid	49
3.1.5	Ximelagatran	53
3.2	Darstellung interindividueller Unterschiede.....	57
3.2.1	Acetaminophen, Amiodaron und Diclofenac.....	58
3.2.2	Isoniazid und Ximelagatran	67
4	Diskussion.....	70
4.1	Patientenkollektiv und Medikamente.....	70
4.2	Promega-Assays und die Auswertung der Messdaten	71
4.3	Möglichkeiten und Grenzen präklinischer in vivo- und in vitro-Testsysteme	72
4.3.1	Humane und tierische isolierte, perfundierte Lebern	72
4.3.2	Zellmodelle zur präklinischen Testung medikamentös-induzierter Hepatotoxizität.....	74
4.3.3	3D InSight™ Human Liver Microtissues	74
4.4	Die Schwierigkeit der Darstellung aller essentiellen Pathomechanismen medikamentös-induzierter Hepatotoxizität in einem Testsystem	76
4.4.1	Darstellung von bekannten Mechanismen vor allem intrinsischer Hepatotoxizität.....	76
4.4.2	Probleme der Darstellung idiosynkratischer Hepatotoxizitätspotentiale	77
4.5	Anforderungen an zukünftige Testsysteme und Diagnostikinstrumente – ein Hypothesen-Shift hin zu mehr Individualität?	79
5	Zusammenfassung	84

A	Abkürzungsverzeichnis	88
B	Abbildungsverzeichnis	90
C	Tabellenverzeichnis	92
D	Literaturverzeichnis	94
E	Danksagung.....	105
F	Eidesstattliche Versicherung	106

1 Einleitung

1.1 Medikamentös-induzierte Hepatotoxizität

„Drug-induced liver disease: A penalty for progress“ postulierten Popper et al. bereits 1965 (Popper, Rubin, Cardiol, Schaffner, & Paronetto, 1965). Sie machen somit als eine der Ersten auf die umfangreiche Problematik medikamentös-induzierter Leberschädigungen aufmerksam. Heute, gut 50 Jahre später, stehen wir trotz grundlegender Fortschritte auf diesem Gebiet größtenteils noch immer vor denselben Fragen, die damals schon die Forscher um Popper beschäftigten. Die Komplexität dieses Themengebietes wird vielmehr noch mit jeder neuen Erkenntnis ersichtlicher. Aber was genau versteht man unter medikamentös-induzierter Hepatotoxizität, warum ist sie so bedeutend, schwierig zu verstehen und wieso letztlich so unzureichend vorhersagbar? Der folgende Teil soll einen groben Überblick über diese Thematik geben.

1.1.1 Die Rolle der Leber bei der Biotransformation von Medikamenten

Die Leber ist eines der am häufigsten von medikamentös-induzierter Toxizität betroffenen Organe. Sie ist als Knotenpunkt an den meisten Stoffwechselprozessen beteiligt, und so auch an dem Um- und Abbauprozess der Mehrzahl aller Xenobiotika. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass fast ausschließlich Medikamente mit überwiegend hepatischer Metabolisierung auch hepatotoxisches Potential besitzen und vice versa (E. Bjornsson, 2010; Lammert, Bjornsson, Niklasson, & Chalasani, 2010). Für diese Aufgabe besitzt die Leber ein vielfältiges Enzymrepertoire, das neben der zur Produktion und Sekretion von Proteinen für Stoffwechselprozesse (z. B. Phase-I-, -II-, -III-Enzyme der Biotransformation oder der Galleproduktion) auch für die Gerinnung (z. B. Gerinnungsfaktoren) oder das Immunsystem (z. B. Akut-Phase-Proteine) von großer Bedeutung ist.

Den vorherrschenden Zelltyp der Leber stellen mit knapp 80% die für die Aufrechterhaltung der hepatischen Stoffwechselaktivität zuständigen Hepatozyten dar (Kmiec, 2001). In ihnen sitzen unter anderem die Cytochrom P450-Monooxygenasen und die als Energielieferanten dienenden Mitochondrien. Weitere relevante nicht-parenchymatöse Zellen sind die Kupffer'schen-Zellen, welche als Makrophagen Bakterien und andere Substanzen phagozitieren und via immunologischer Prozesse proinflammatorische Kaskaden initiieren können (Kmiec, 2001). Die Ito-Zellen

speichern Vitamin A und Lipide und spielen eine zentrale Rolle in strukturellen Umbauprozessen hin zur Fibrose oder Zirrhose der Leber (Kmiec, 2001).

Eine der Hauptaufgaben der Leber ist die Elimination von endogenen und exogenen Stoffen, die vom Körper nicht mehr verwertet werden können. Ziel ist es, sie als hydrophile und biologisch inaktive Konjugate via Galle oder Urin auszuscheiden. Allerdings können durch diesen Prozess auch Konjugate entstehen, die erst in diesem Zustand schädigenden Einfluss auf das Individuum ausüben. Dieser Umwandlungsprozess ist auch für medikamentös-induzierte Leberschädigungen entscheidend und wird als Biotransformation bezeichnet. In Phase I der Biotransformation werden die organischen Stoffe durch den Abbau oder die Modifikation von funktionellen Gruppen zu hydrophilen Substanzen oxidiert, hydrolysiert oder reduziert. Unter anderem dienen hierbei die bereits erwähnten Cytochrom P450-Enzyme als Katalysator. Die so entstandenen Substrate werden in Phase II mit endogenen, wasserlöslichen Molekülen wie Glutathion, Glucuronsäure oder Sulfonylgruppen konjugiert. Die Stoffe sind so besser wasserlöslich und werden zur Ausscheidung in die Gallekanälchen respektive ins Blut sezerniert. Der Transport in die Niere oder Galle wird als Exkretionsphase bezeichnet und von den zahlreichen oft ATP-abhängigen aktiven Transportern an der apikalen und basolateralen Membran der Hepatozyten bewerkstelligt (Rassow et al, 2008, S. 756 ff.).

1.1.2 Pathophysiologie medikamentös-induzierter Hepatotoxizität

Wie kommt es nun aber zu medikamentös-induzierten Leberschädigungen? Im Mittelpunkt stehen komplexe Mechanismen, die bis zu diesem Zeitpunkt zu einem Großteil noch unbekannt sind (Yuan & Kaplowitz, 2013). Dies ist ein entscheidender Faktor dafür, dass bis heute keine ausreichend geeigneten Zellmodelle entwickelt werden konnten, die die Komplexität der Thematik ausreichend widerspiegeln und die präklinische Vorhersage medikamentös-induzierter Hepatotoxizität ermöglichen könnten.

Eine Einteilung medikamentös-induzierter Hepatotoxizität ist daher nicht ganz einfach und wird seit jeher kontrovers diskutiert. Allgemein anerkannt ist die Unterscheidung zwischen einer intrinsischen Hepatotoxizität, vom Medikament selbst ausgehend, und einer idiosynkratischen Form, welche von diversen umwelt- und patientenabhängigen Faktoren beeinflusst wird (S. J. Lee, Lee, & Park, 2016). Diese Idiosynkrasie kann grob nochmals in eine allergische und nicht-allergische Genese unterteilt werden

(Zimmerman, 1978, 2000). Die Schäden beruhen allerdings allgemein auf einem „Multi-step model“ (Hussaini & Farrington, 2007), welches verschiedene Faktoren der jeweiligen Unterkategorien in sich vereint und im Grunde meist nicht klar einer davon zugeordnet werden kann.

1.1.2.1 Intrinsische Hepatotoxizität

Die intrinsische Toxizität wird von dem Medikament selbst und/oder seinen Metaboliten dosisabhängig, meist bereits nach kurzer Latenz und somit in gewisser Weise auch präklinisch bereits relativ gut vorhersehbar verursacht. Bestes Beispiel hierfür ist Acetaminophen (E. Bjornsson, 2010; Greene, Dargan, Leman, & Jones, 2006; H. Jaeschke, 2015). Acetaminophen ist für mehr als ein Drittel aller Fälle akuten Leberversagens in der westlichen Welt verantwortlich (Bower, Johns, Margolis, Williams, & Bell, 2007; Ostapowicz et al., 2002). Diese intrinsischen Mechanismen der Hepatotoxizität sind heute bereits gut verstanden und können mittels geeigneter Tier- und Zellmodelle präklinisch verlässlich getestet werden (James, Mayeux, & Hinson, 2003).

1.1.2.2 Idiosynkratische Hepatotoxizität

Die Schwierigkeit liegt vielmehr in der idiosynkratischen medikamentös-induzierten Hepatotoxizität. Sie ist auch für die Mehrzahl der Fälle hochgradiger Leberschädigungen verantwortlich. Bereits bei im Regelfall von den meisten Patienten tolerierten, therapeutischen Medikamentendosen kommt es bei einigen Individuen zu hepatotoxischen Reaktionen. Die idiosynkratische Hepatotoxizität ist weitgehend dosisunabhängig. Wobei jedoch Dosen <10mg pro Tag in den seltensten Fällen zu toxischen Erscheinungen führten. Diese traten in mehr als 3/4 der Fälle bei einer täglichen Dosis von >50mg auf (Lammert et al., 2008; Utrecht, 2007). Diese hohe Dosis war zusätzlich meist mit einer kürzeren Latenz bis zum Auftreten von Symptomen verbunden (Vuppalanchi et al., 2014). Zugleich führte in einer Vielzahl der Fälle eine Dosisreduktion <50mg pro Tag zu einem Sistieren zuvor aufgetretener hepatotoxischer Symptome (Chalasani & Bjornsson, 2010). 81% der über einen Zeitraum von 10 Jahren beobachteten lebertransplantierten Patienten in den Vereinigten Staaten von Amerika, deren Schäden nicht auf Acetaminophen zurückzuführen waren, erhielten tägliche Medikamentendosen $\geq 50\text{mg}$ des

entsprechenden Medikamentes (Reuben, Koch, & Lee, 2010). Allerdings darf man nicht vergessen, dass die gewünschten Effekte eines Medikamentes meist auch erst bei Dosen >50mg pro Tag erzielt werden können (Stephens, Andrade, & Lucena, 2014).

Die strikte Trennung in intrinsische und idiosynkratische medikamentös-induzierte Hepatotoxizität ist somit nicht ausschließlich richtig. Viel mehr beeinflussen sich beide Ätiologien gegenseitig. Für diese These spricht zum einen die eben erwähnte Höhe der täglich verabreichten Medikamentendosis, die durchaus eine Rolle als Sensitizer bei Fällen idiosynkratischer Toxizität zu spielen scheint (Kaplowitz, 2013; Senior, 2008). Zum anderen weist auch das Auftreten von rund 10% Acetaminophen-induzierten Leberschädigungen unter therapeutischen Dosen darauf hin (Gulmez et al., 2013; Larson et al., 2005). Hier scheinen neben dieser vermeintlich intrinsischen Hepatotoxizität auch patientenbezogene, idiosynkratische Faktoren mit einer Rolle zu spielen (Gulmez et al., 2013; Larson et al., 2005). Man geht also davon aus, dass die Patienten selbst gewisse „Anlagen“ mitbringen, eine bestimmte interindividuelle und teils genetisch determinierte Suszeptibilität aufweisen, die in der Kombination mit Einflüssen aus dem Umfeld der Patienten, der täglichen Dosis und dem Medikament selbst zu den hepatotoxischen Effekten führen. Es liegt dem Ganzen also eine komplex multifaktorielle Genese zugrunde (Hussaini & Farrington, 2007; Hartmut Jaeschke et al., 2002; Kaplowitz, 2005).

1978 versuchte Hy Zimmerman erstmals eine Einteilung in zwei ätiologisch unterschiedliche, allerdings verknüpfte Formen dieser Idiosynkrasie zu treffen: eine metabolische und eine immunologische respektive allergische Genese (Zimmerman, 1978).

a) Metabolische Idiosynkrasie

Die metabolische Form geht auf die unterschiedlichen Stoffwechselwege der einzelnen Medikamente und Störungen in deren Biotransformation zurück. Auch das molekulare Gewicht oder andere biochemische Eigenschaften wie die Lipophilie des Medikamentes sind hier von Bedeutung (M. Chen, Borlak, & Tong, 2013; Hughes et al., 2008). Es besteht ein Ungleichgewicht zwischen Aktivierung und Detoxifikation oder Akkumulation des Medikamentes und/oder dessen Metaboliten respektive zwischen schädigenden und regenerierenden Mechanismen des Körpers. Vor allem in Phase-I-Reaktionen der Biotransformation entstehen oft Reaktive Metabolite (z. B.

freie Radikale), die unter „normalen“ Bedingungen durch die Konjugation mit beispielsweise Glutathion unschädlich gemacht werden. Kommt es jedoch zu einem Überschuss an Reaktiven Metaboliten, können diese kovalent an Proteine, die DNA oder andere Zellkomponenten binden. Sie stören diese so in deren Funktion und lösen folglich Oxidativen Stress und Zelltod aus.

Die Mitochondrien spielen hier eine besonders große Rolle. Als Energielieferanten der Zelle ist ein Schaden der Mitochondrien meist mit Apoptose oder Nekrose der Zelle verbunden (Pessayre et al., 2012).

Auch die Dysfunktion zytoprotektiver Kaskaden und Faktoren ist hierbei zu berücksichtigen. Ein Defekt der für die Konjugation von entstandenen Reaktiven Metaboliten essentiellen Faktoren (z. B. mitochondriale Superoxidismutase oder Glutathionperoxidase) ist mit der Akkumulation der Reaktiven Metabolite und deren toxischen Folgen verbunden (Lucena et al., 2010). Diese Enzymdefekte können durch die Medikamente oder deren Reaktive Metabolite selbst auf direktem Wege entstehen, begründen sich aber der Idiosynkrasie entsprechend oft auch auf genetischen Polymorphismen (Lucena et al., 2010). Allerdings spielen diese zytoprotektiven Mechanismen auch eine Rolle für die Toleranzentwicklung nach und während einer Medikamenteneinnahme. Die Mechanismen hinter dieser Adaptation sind noch nicht vollständig geklärt. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen liegt in der protektiven Hochregulierung der involvierten zytoprotektiven Kaskaden, nachdem der anfängliche Schaden durch die Reaktiven Metabolite die Schwelle zum endgültigen Zelltod nicht überschritten hat (H. Jaeschke, 2011; Rudiger, Graf, & Clavien, 2003; Schauer et al., 2003). Die Zellen werden somit in gewisser Weise resistent gegenüber den schädigenden Einflüssen. Eine besondere Rolle wird hier beispielsweise dem Keap1-Nrf2-ARE-Pathway zugeschrieben (Kensler, Wakabayashi, & Biswal, 2007).

Aus all dem wird ersichtlich, dass für das Auftreten einer medikamentös-induzierten Hepatotoxizität vor allem auch individuelle Eigenschaften des Patienten wie genetische Polymorphismen von beteiligten Enzymen der Biotransformation entscheidend sind. Unter anderem der in der Phase-I beteiligten Cytochrom P450-Enzyme. Die verschiedenen Polymorphismen resultieren beispielsweise in interindividuell unterschiedlichen Phänotypen mit teils konträren katalytischen Eigenschaften des entsprechenden Enzyms. Ein so entstandener „Intermediate Metabolizer“ weist eine normale Enzymfunktion auf (Kobori et al., 2008). Der „Extensive Metabolizer“ verfügt über eine gesteigerte Enzymfunktion, welche

wiederum beim „Poor Metabolizer“ herabgesetzt ist (Kobori et al., 2008). Je nachdem ob das entsprechende Medikament nun schneller oder langsamer verstoffwechselt wird, kommt es entweder zu einer toxischen Akkumulation oder aber zum Therapieversagen des Medikamentes (Eichelbaum, Kroemer, & Mikus, 1992).

Zusätzlich können Phase-I-Metaboliten kovalent an ihre eigenen CYP-Enzyme binden und diese dadurch inhibieren oder induzieren. Selbiges gilt für die Wechselwirkung von Medikamenten oder Toxinen untereinander. Ein begleitender Alkoholkonsum zu einer Therapie mit Acetaminophen führt beispielsweise zur Steigerung von Enzymaktivitäten und potenziert so die toxischen Schäden an der Leber (W. M. Lee, 2003; Walsky & Boldt, 2008; Zimmerman, 1986).

Andere Polymorphismen resultieren in einer gestörten Exkretion von Gallosalzen und folglich der Akkumulation des Medikamentes, sowie zusätzlichen cholestatischen Leberschädigungen (Ho et al., 2010).

b) Immunologische/allergische Idiosynkrasie

Die Reaktiven Metabolite respektive die Addukte aus kovalent gebundenen Metaboliten können aber auch selbst auf der Zelloberfläche von Molekülen des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) präsentiert werden und so eine Immunreaktion auslösen (Faulkner, Meng, Park, & Naisbitt, 2014). Für die Mehrzahl der über den immunologischen Weg zu einem Schaden führenden Medikamente konnten signifikante Mengen dieser Reaktiven Metabolite nachgewiesen werden (Faulkner et al., 2014; Lavergne, Park, & Naisbitt, 2008). Ein Anzeichen dafür, dass eine strikte Trennung des metabolischen und immunologischen/allergischen Weges der Idiosynkrasie wohl ebenfalls nicht möglich ist.

Die Mehrzahl der Fälle idiosynkratischer medikamentös-induzierter Hepatotoxizität geht allerdings auf eben diese immunologische Form zurück (Yuan & Kaplowitz, 2013). Diese idiosynkratische Hypersensibilität dem Medikament gegenüber wird in 23-37% dieser immunologisch bedingten Fälle durch typische Erscheinungen einer Hypersensibilitätsreaktion charakterisiert. Zu nennen sind hier Effekte wie Fieber, Exanthem, kurze Latenz zwischen Medikamenteneinnahme und Symptombeginn, Zeichen granulomatöser Entzündung und eosinophile Granulozyten in Biopsaten, sowie eine Eosinophilie im peripheren Blut. Der Rest weist nicht die typischen Charakteristiken auf und ist teils mit längerer Latenz und einer medikamentenspezifischen Antikörperbildung oder einer Autoantikörperbildung

verbunden (Z. X. Liu & Kaplowitz, 2002). Diesen immunologischen Mechanismen liegen allgemein drei Hypothesen zugrunde. Laut Hapten-Hypothese kommt es zur kovalenten Bindung von Reaktiven Metaboliten respektive des Medikamentes selbst an bestimmte Proteine. Diese entstandenen Haptene führen als körperfremdes Antigen zu einer Immunreaktion. Antikörper gegen den Reaktiven Metaboliten/das Medikament können in vielen Fällen nachgewiesen werden (z. B. Trifluoracetylchlorid-Antikörper nach Gabe des Inhalationsnarkotikums Halothan (Vergani et al., 1980)). Diese zur Reaktion führenden „Neo-Antigene“ werden als Haptene bezeichnet. Allerdings führen nicht alle Haptene zu einer solchen Immunreaktion (Ju, 2005; Z. X. Liu & Kaplowitz, 2002).

Die Danger-Hypothese besagt, dass Reaktive Metabolite als freie Radikale oder Haptene durch die Induktion von Oxidativem Stress zu Zellschäden führen können. Dies führt zur Freisetzung von „Danger Signalen“. Diese können HMGB1-Proteine, Heat-shock-Proteine oder S100-Proteine sein, die wie körperfremde Pathogene an T-Zell-Rezeptoren binden und so eine Immunreaktion initiieren (J. Li & Uetrecht, 2010; Z. X. Liu & Kaplowitz, 2002). Als solches „Danger Signal“ könnte auch ein Zellschaden anderer Ätiologie, z. B. eine andere bestehende Hepatopathie wie Virusinfektionen oder mitochondriale Dysfunktionen, als Kostimulator für die kovalent gebundenen Medikamente fungieren (Levy, 1997; Zhang, Liu, Chen, Zhu, & Uetrecht, 2011). Nur zusammen mit eben diesem zusätzlichen „Danger Signal“ kommt es dann zur Immunreaktion. Dies kann als ein Erklärungsversuch herangezogen werden, warum nicht alle unter die zuvor erwähnte Hapten-Hypothese fallenden Medikamente zu einer immunologisch bedingten Toxizität führen. Ihnen fehlt vermutlich dieses „Danger Signal“.

Bei der „Pharmacological-interaction with immune receptors“-Hypothese (p.-i.-Hypothese) fungiert das Medikament selbst aufgrund seiner strukturellen Beschaffenheit als „Neo-Antigen“. Es bindet reversibel an MHC-Moleküle auf Antigen-präsentierenden Zellen oder den T-Zell-Rezeptoren der T-Zellen und führt so zu einer verzögerten Immunreaktion. Es können medikamentenspezifische T-Zellpopulationen detektiert werden (Pichler, 2002; Pichler et al., 2015). Von Bedeutung sind hier vermutlich genetische Polymorphismen bestimmter HLA-Gene, welche für die MHC-Moleküle kodieren. So wurden die Varianten HLA-DRB1*0701 und HLA-DQA1*02 als Risikofaktoren für eine medikamentös-induzierte Hepatotoxizität bei der Behandlung mit Ximelagatran gefunden (Yip, Alfirevic, & Pirmohamed, 2015). Zudem können die

HLA-gebundenen Medikamente die T-Zellen teilweise selbst direkt stimulieren und im Sinne eines „allo-HLA“ fungieren (Pichler et al., 2015).

Generell können sich diese immunologischen Prozesse wiederum von Patient zu Patient anders oder auch ganz ohne Auftreten der zuvor erwähnten, spezifischen Charakteristiken äußern, was keinesfalls gegen das Vorliegen einer immunologischen Genese spricht (Yuan & Kaplowitz, 2013). Manche Patienten reagieren nach erneuter Medikamenten-Exposition (sogenannte Rechallenge) mit einem fulminanten Verlauf, manche zeigen wiederum keinerlei Symptome mehr (sogenannte Adaptation) (Maddrey & Boitnott, 1973). Auch können Symptome erst mit einer Latenz von >1 Jahr auftreten. Dies wurde vor allem bei Medikamenten beobachtet, die mit einer Autoantikörperproduktion beim Patienten einhergingen.

Auch das angeborene Immunsystem kann durch bestimmte Medikamente aktiviert werden. Kupffer'sche Zellen oder Natürliche Killer-Zellen als Teil des adaptiven Immunsystems präsentieren in diesem Fall den MHC-Molekülen Teile der Medikamente/Metabolite und führen so zur Immunreaktion oder Apoptose (Zhang et al., 2011). Sie setzen eine proinflammatorische Signalkaskade in Gang, die zu zusätzlichem Zellschaden und letztlich Zelltod führen kann (H. Jaeschke, Farhood, Bautista, Spolarics, & Spitzer, 1993).

All diese eben beschriebenen Mechanismen können auf ihre ganz unterschiedliche Art und Weise, teils sich gegenseitig beeinflussend, medikamentös-induzierter Hepatotoxizität zugrunde liegen. Und sie stellen vermutlich nur die für uns bisher sichtbare Spitze des Eisbergs dar.

1.1.3 Klinisches Bild und Diagnostik

Diese pathophysiologische Vielfalt führt dazu, dass sich die Beeinträchtigung durch das Medikament klinisch und histologisch vielfältig äußern kann. Es gibt keine bestimmten Labortests oder histologische Korrelate, die die Diagnose mit sowohl hoher Spezifität als auch Sensitivität sichern können. Vielmehr differieren die Zeichen und Symptome je nach Art und Schwere der Schädigung, welche wiederum interindividuell und von Medikament zu Medikament variieren. Die Diagnosestellung an sich gestaltet sich sehr schwierig und stellt im Regelfall nur eine Ausschlussdiagnose dar, weshalb vermutlich nur ein Bruchteil der tatsächlich auf eine Medikamententoxizität zurückzuführenden Leberschäden auch als solche identifiziert wird respektive eine eigentlich nicht auf ein Medikament zurückzuführende

Schädigung als solche diagnostiziert, und die Zahl medikamentös-induzierter Hepatotoxizität somit überschätzt wird (Aithal et al., 2011; Watkins, 2015).

1.1.4 Epidemiologie medikamentös-induzierter Leberschädigungen

Warum wir uns überhaupt mit medikamentös-induzierten Leberschäden beschäftigen wird klar, wenn man bedenkt, dass neben der schwierigen Diagnostik und vielfältigen Klinik, medikamentös-induzierte Hepatotoxizität die Hauptursache für akutes Leberversagen in der westlichen Welt darstellt (Larrey & Pageaux, 2005; W. M. Lee, 2012; Ostapowicz et al., 2002; Reuben et al., 2010). Sie ist bei 5% der Patienten ursächlich, die wegen Ikterus in eine Klinik eingewiesen werden (Vuppalanchi, Liangpunsakul, & Chalasani, 2007). Adäquat therapiertes akutes Leberversagen an sich geht mit einer Letalität von annähernd immer noch 30% einher (Ostapowicz et al., 2002). Essentiell ist auch hier wieder vor allem die idiosynkratische Form medikamentös-induzierter Hepatotoxizität, welche bei Fällen akuten Leberversagens in etwa 12% ausmacht (Hussaini & Farrington, 2007) und für die es keine spezifische Therapie gibt. Genau diese Idiosynkrasie ist es, die uns vor ungelöste Aufgaben stellt. Sie geht zudem mit einem signifikant höheren Risiko eines akuten Leberversagens einher als Schäden anderer Ätiologie (Larrey & Pageaux, 2005; Ostapowicz et al., 2002). Die Mortalitätsrate liegt bei bis zu 75% (Larrey & Pageaux, 2005; W. M. Lee, 2003). Wohl nicht zuletzt deswegen ist die Hauptursache für Organtransplantationen nach akutem Leberversagen seit Jahren eine medikamentös-induzierte Toxizität (Au, Navarro, & Rossi, 2011).

Auch für die Pharmaindustrie spielen toxische Leberschädigungen eine bedeutende Rolle. 5-10% aller „Adverse Drug Reactions“ sind hepatischer Natur. In präklinischen Studien führen bis zu 50% aller getesteten Wirkstoffe bei supratherapeutischen Dosen zu hepatischen Effekten wie Hepatomegalie oder erhöhten Serumtransaminasen (Amacher, 1998). Vorboten späterer Komplikationen und einer signifikanten Hepatotoxizität des Medikamentes? Nicht unbedingt. Es konnte gezeigt werden, dass dies gleichermaßen von Medikamenten mit hohem als auch niedrigem intrinsischen Toxizitätspotenzial verursacht werden kann. Die meisten Statine führen beispielsweise in einer Vielzahl der Fälle zu Leberenzymwerterhöhungen über das 3-fache der Norm hinaus (Tolman, 2000). Die Inzidenz eines akuten Leberversagens wird hierbei allerdings nur mit 1:1.000.000 beschrieben. Eine Inzidenz, die in etwa der eines idiopathischen akuten Leberversagens entspricht (Tolman, 2000).

Hepatotoxische Nebenwirkungen sind dennoch die häufigste Ursache für den Abbruch des Entwicklungs- und Zulassungsprozesses eines Medikamentes, sowie deren Indikationseinschränkung nach Markteinführung. Ein Drittel der Medikamentenrücknahmen geht auf nicht tolerierbare Lebertoxizität zurück, was nicht zuletzt auch wirtschaftlich mit erheblichen finanziellen Defiziten verbunden ist (Halegoua-De Marzio & Navarro, 2008; Meadows, 2001; Stevens & Baker, 2009; Watkins, 2011).

Mit einer Inzidenz von 14-19:100.000 ist medikamentös-induzierte Hepatotoxizität ein relativ selten auftretendes Phänomen (E. S. Bjornsson, Bergmann, Bjornsson, Kvaran, & Olafsson, 2013; Sgro et al., 2002) Die genaue Inzidenz medikamentös-induzierter Hepatotoxizität ist jedoch schwer festzulegen. Aufgrund der fehlenden verlässlichen Screeningmethoden und der vielfältigen Klinik gestaltet sich die Diagnosestellung schwierig und die Zahl der eigentlich medikamentös-induzierten, aber nicht als solche diagnostizierten, Leberschäden ist wohl weit höher anzusetzen, bei bis zu 30-33:100.000 (Shin et al., 2013). Björnsson et al. beispielsweise fanden bei einer retrospektiven Untersuchung von Patienten mit neudiagnostizierten Autoimmunhepatitiden heraus, dass 9% der Fälle mit großer Wahrscheinlichkeit doch auf eine medikamentöse Therapie zurückzuführen waren (E. Bjornsson et al., 2010). Die Inzidenz idiosynkratischer Hepatotoxizität liegt sogar nur bei etwa 1:10.000 bis 1:100.000 (Au et al., 2011). Diese geringe Inzidenz ist ein Hauptgrund dafür, dass auch in Phase-III-Studien die Wirkstoffe mit Potenzial für einen schwerwiegenden toxischen Leberschaden präklinisch nicht signifikant erkannt werden. Deshalb werden schwere Fälle - verbunden mit akutem Leberversagen oder Tod - meist auch erst längere Zeit nach Markteinführung eines Medikamentes auffällig (Hussaini & Farrington, 2007; Kaplowitz, 2005; Uetrecht, 2008). Schon ein einzelner dieser Fälle ist aber im Falle einer Marktrücknahme wegen Hepatotoxizität mit weitreichenden Konsequenzen für die große Mehrzahl der bis dahin erfolgreich behandelten Patienten verbunden. Diesen Patienten wird mit der Marktrücknahme der Zugang zu einer potentiell kurativen Behandlung verwehrt, weil eine vergleichsweise kleine Personenanzahl toxisch auf das Medikament reagiert hat. Warum aber diese interindividuellen Unterschiede? Die Antwort liegt wohl in den komplexen zuvor beschriebenen Pathomechanismen, die zu den Effekten idiosynkratischer Hepatotoxizität führen. Nicht zuletzt diese große Spanne zwischen Schaden und Nutzen eines Medikamentes macht die Notwendigkeit der Erforschung der genauen Pathophysiologie

idiosynkratischer medikamentös-induzierter Hepatotoxizität und vor allem die Entwicklung verlässlicher präklinischer Testsysteme und klinischer Diagnostikinstrumente deutlich.

1.2 Zellmodelle als Testsystem medikamentös-induzierter Hepatotoxizität

Heute stehen uns präklinisch verschiedene Zellmodelle zur Untersuchung von Medikamenteneffekten zur Verfügung, welche bis heute bereits viele wegweisende Erkenntnisse bezüglich deren Metabolismus, biologischen Angriffspunkten und somit potentiell toxischen Effekten lieferten. Allerdings gibt es bis heute kein Modell, das das gesamte Spektrum medikamentös-induzierter Hepatotoxizität der in vivo-Situation entsprechend widerspiegelt und somit die präklinische Detektion entsprechender Medikamente ermöglichen würde. Schwierigkeiten stellen hier vor allem die individuellen Suszeptibilitätsfaktoren und die komplexen Interaktionen der einzelnen Bestandteile der Leber dar (S. J. Lee et al., 2016; Licata, 2016). Eingesetzt werden derzeit verschiedene Zellmodelle in 2D und neuerdings 3D (Stammzellen, immortale Leberzelllinien und primäre humane Hepatozyten).

1.2.1 Pluripotente Stammzellen

Humane somatische Zellen können zu pluripotenten Stammzellen „umprogrammiert“ werden (Yu et al., 2007). Diese induzierten, sich selbst erneuernden, pluripotenten Zellen können sich auf bestimmte Stimuli hin zu adulten Hepatozyten-ähnlichen Zellen ausdifferenzieren (Anson, Kolaja, & Kamp, 2011). Sie stehen weitgehend in unbegrenztem Umfang zur Verfügung, was eine Vielzahl an Tests erlaubt. Allerdings fehlt es diesen Hepatozyten-ähnlichen Zellen an der ausreichenden Ausprägung an essentiellen Enzym- und Transporter-Aktivitäten der Biotransformation, so dass diese momentan noch keine große Rolle für präklinische Testsysteme spielen (Guguen-Guillouzo, Corlu, & Guillouzo, 2010). Allerdings werden die Protokolle zur Ausdifferenzierung dieser Stammzellen derzeit optimiert und könnten schon bald eine vielversprechende Option vor allem im Bereich individualisierter Medizin und so auch der idiosynkratischen Hepatotoxizität darstellen (Anson et al., 2011; Kia et al., 2013; Park et al., 2008). Die ethische Problematik dahinter wird allerdings weiterhin kontrovers diskutiert.

1.2.2 Immortale und transfizierte Leberzelllinien

Im Gegensatz zu Primärzellen besitzen immortale Leberzelllinien aufgrund von Mutationen in deren das Wachstum beeinflussenden Regulationswegen und -faktoren die Eigenschaft, sich in geeignetem Milieu konstant und unbegrenzt zu vervielfältigen. Sie stehen deswegen permanent zur Verfügung und bieten die Möglichkeit auch Langzeitversuche flexibler und mit hoher Reproduktivität durchzuführen (Donato, Jover, & Gomez-Lechon, 2013). Die Validität der Versuche und Ergebnisse steigt, da die Kulturbedingungen nicht zuletzt durch die vereinfachte Handhabung leichter zu standardisieren sind. Der Nachteil dieser Zellen ist, dass entscheidende metabolische Regulationswege nur unzureichend die Situation der Leber in vivo darstellen (LeCluyse, Witek, Andersen, & Powers, 2012). Allerdings stellen sie aufgrund der angeführten Vorteile eine geeignete Alternative für primäre Hepatozyten, vor allem in der initialen Phase der Toxizitätstestung, dar und dienen auch für diese Arbeit als Vorreiter für die Versuche mit den 3D InSight™ Human Liver Microtissues.

Die am besten charakterisierte und am häufigsten verwendete Zelllinie HepG2 stammt von einem gut differenzierten, humanen Hepatokarzinom ab. Es handelt sich um adhärenz, epitheliale Zellen. Sie exprimieren typische hepatische Plasmaproteine wie Albumin oder Transferrin, bilden unter geeigneten Kulturbedingungen Gallensystem-ähnliche Strukturen aus und metabolisieren einen Großteil an Xenobiotika (LeCluyse et al., 2012). Im Vergleich zu primären Hepatozyten weisen sie allerdings eine geringere Expression von fast allen wichtigen Phase-I- und Phase-II-Enzymen sowie Transportern der Biotransformation auf, was eine geringere Sensitivität gegenüber der Toxizität von bestimmten Präparaten bedingt (Westerink & Schoonen, 2007; Wilkening, Stahl, & Bader, 2003).

Für andere von humanen Hepatokarzinomen abstammende Zelllinien (Hep3B, HCC-T, HCC-M, Huh-7) gilt mit gewissen interzellulären Variabilitäten in den verschiedenen Enzymaktivitäten dasselbe, wobei für Huh-7 die größte Übereinstimmung mit primären Hepatozyten festgestellt wurde (Lin et al., 2012).

Auch tierische Hepatom-Zelllinien wurden getestet (z. B. H4IIE). Allerdings ist die Expression von für Toxizitätstestungen entscheidenden Genen und Enzymen geringer oder fehlt ihnen im Vergleich zu den entsprechenden tierischen Primärzellen ganz (Fujimura, Murakami, Miwa, Aruga, & Toriumi, 2012). Da Tiermodelle aber nur bedingt auf den Menschen übertragen werden können und entsprechende humane Zellen zur Verfügung stehen, spielen diese nur eine untergeordnete Rolle.

Fa2N-4-Zellen stammen von primären humanen Hepatozyten ab, die mittels Transfektion immortalisiert wurden. Sie behalten weitgehend die Morphologie primärer Hepatozyten bei und auch einige Phase-I-Enzyme (z. B. CYP1A2, CYP2C9, CYP3A4) sind entsprechend induzierbar. Andere dieser Enzyme (z. B. CYP2B6) und einige hepatische Transporter weisen dagegen im Vergleich zu primären Hepatozyten eine geringere Induzierbarkeit und Expression auf (Hariparsad, Carr, Evers, & Chu, 2008; Kenny et al., 2008; Mills, Rose, Sadagopan, Sahi, & de Morais, 2004).

HepaRG-Zellen stammen ebenfalls von einem humanen hepatozellulären Karzinom ab. Allerdings bilden diese Zellen nach etwa vier Wochen unter entsprechenden Kulturbedingungen einen konfluenten Monolayer mit zwei verschiedenen Zelltypen aus. Ein Zelltyp weist morphologische Charakteristiken Cholangiozyten-ähnlicher Zellen auf. Der andere gleicht in der Morphologie, der Expression von Enzymen und Transportern der Biotransformation, sowie verschiedenen anderen Funktionen, primären Hepatozyten (Guillouzo et al., 2007). Die Zellen können so bis zu vier Wochen kultiviert werden, wodurch erstmals auch Langzeiteffekte untersucht werden konnten (Antherieu et al., 2010; Josse et al., 2008). Unter allen derzeit verfügbaren Zelllinien weisen die HepaRG-Zellen am meisten Übereinstimmungen mit der in vivo-Situation auf (Kanebratt & Andersson, 2008a, 2008b).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die durch diese meist tumorösen Zellen gewonnenen Ergebnisse erste Tendenzen aufzeigen können, aber immer unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Genexpressionslevel und Enzymaktivitäten zu interpretieren sind und sie so nur bedingt als prädiktive, präklinische Testsysteme geeignet sind.

1.2.3 Primäre humane Hepatozyten

Der Goldstandard für in vitro-Hepatotoxizitätstestungen sind derzeit via Organperfusion der Leber gewonnene primäre humane Hepatozyten. Unter optimalen Kulturbedingungen exprimieren diese Zellen alle für die Biotransformation wichtigen Enzyme und Transporter in ihrer ursprünglichen Ausprägung (Hewitt et al., 2007). Allerdings proliferieren die Zellen nicht, so dass sie für jedes Experiment neu isoliert und präpariert werden müssen (Hewitt et al., 2007; Lecluyse & Alexandre, 2010). Es besteht die Möglichkeit, die Zellen mittels Kryokonservierung längere Zeit ohne größere Einbußen in deren metabolischen Funktionen aufzubewahren (Gomez-Lechon, Lahoz, Jimenez, Vicente Castell, & Donato, 2006; Hewitt et al., 2007; A. P. Li,

2010). Dies ermöglicht neben flexibleren Versuchen zudem wiederholte Experimente am selben Donor.

Es gibt verschiedene Ansätze zur Zellkultur primärer Hepatozyten. Suspensionskulturen beispielsweise fehlt es an Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakten, so dass die Zellen nur einige Stunden vital bleiben (Hewitt et al., 2007).

Auf extrazellulären Matrixproteinen kultiviert, können die Zellen alternativ einen Monolayer ausbilden, der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte exprimiert. Diese können aber nur über 3-5 Tage aufrechterhalten werden (Hewitt et al., 2007). Beide Systeme stellen somit Möglichkeiten zur Untersuchung akuter Toxizitätseffekte dar.

Als Sandwich-Kultur, eingebettet in Kollagen respektive Monolayer bedeckt von extrazellulärer Matrix, können die Zellen zusätzliche Strukturen ausbilden, die mit Gallekanälchen vergleichbar sind. Zellen konnten für Langzeitversuche bis zu 7 Wochen kultiviert werden (Dunn, Tompkins, & Yarmush, 1991; Dunn, Yarmush, Koebe, & Tompkins, 1989; Suzuki, Ichikawa, Sakoda, & Sakai, 1993).

Vielversprechend sind ebenfalls Ko-Kulturen von primären Hepatozyten mit nicht-parenchymatösen Zellen. Die unterschiedlichen Zelltypen stabilisieren sich gegenseitig, was eine Kultivierbarkeit von bis zu 70 Tagen ermöglicht (Godoy et al., 2013). Es können die Interaktionen der einzelnen hepatischen Zelltypen und der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte, sowie die Ausbildung von Strukturen dem biliären System vergleichbar beobachtet werden, so dass diese Form der Zellkultur der Leber in vivo am nächsten kommt - vor allem als 3D-System (Godoy et al., 2013).

1.2.4 3D InSight™ Human Liver Microtissues

Die Erkenntnisse der letzten Jahre haben gezeigt, dass valide auf die in vivo-Situation übertragbare präklinische Testergebnisse erst erzielt werden können, wenn durch das verwendete Zellmodell die komplexen Interaktionen der einzelnen hepatischen Zelltypen, Zell-Zell- und Zell-Matrix-Komponenten, sowie die Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff in einer der Leber nahekommenden physiologischen 3D-Formation wiedergespiegelt werden (Godoy et al., 2013). Das im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Zellmodell der Firma InSphero® versucht all dies zu berücksichtigen (Messner, Agarkova, Moritz, & Kelm, 2013).

Es konnte gezeigt werden, dass in diesem Zellmodell alle Zelltypen die für sie charakteristische Form und Funktion einnehmen und diese bis zu 5 Wochen aufrechterhalten (Messner et al., 2013). Die für den Metabolismus von Medikamenten

wichtigen Enzyme und Transporter werden in geeigneter Ausprägung exprimiert, es werden dem Gallensystem entsprechende Strukturen ausgebildet und die gemessenen Genexpressionslevel kommen den in vivo gemessenen Gegebenheiten sehr nahe (Messner et al., 2013). Aufgrund der längeren Kultivierbarkeit können Langzeitversuche durchgeführt und so auch chronische Effekte untersucht werden. Das Vorhandensein und die Induzierbarkeit von wichtigen inflammatorischen und immunologischen Komponenten ermöglicht zusätzlich zur Darstellung dosisabhängiger und metabolischer Effekte intrinsischer Hepatotoxizität die Betrachtung idiosynkratischer Mechanismen medikamentös-induzierter Hepatotoxizität. Die verschiedenen untersuchten Donoren werden hinsichtlich möglicher Suszeptibilitätsfaktoren wie Alter, ethnischer Zugehörigkeit, Geschlecht oder Cytochrom P450-Enzymausprägungen charakterisiert, so dass die Versuchsergebnisse mit Berücksichtigung dieser Daten interpretiert werden können. Ziel dieser Arbeit war es, das zugrunde liegende Zellsystem der 3D InSight™ Human Liver Microtissues hinsichtlich der Abbildung interindividueller und medikamentenspezifischer Charakteristika und Unterschiede zu untersuchen, und somit aufzuarbeiten, ob dieses Testsystem ein geeignetes in vitro-Modell zur präklinischen Testung der komplexen Mechanismen medikamentös-induzierter Hepatotoxizität darstellt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zellen und Kulturmedien

Das verwendete Zellsystem wurde von der Firma InSphero® hergestellt. Via „Hanging-drop“-Methode („Gravity^{PLUS} system“) formen hierbei kryokonservierte primäre humane Hepatozyten eines bestimmten Donors zusammen mit universalen, nicht-parenchymatösen Kupffer- und endothelialen Zellen in 3 Tagen einen 3D InSight™ Human Liver Microtissue (siehe Abb. 1). Die so entstandenen Sphäroide werden anschließend auf spezielle nicht-adhäsive 96-Well-Platten mit trichterförmigem Boden übertragen. Der Durchmesser dieses Microtissues ist über die initiale Zellzahl steuerbar und beträgt durchschnittlich 100µm, so dass auch im Zellkern die optimale Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff gewährleistet wird (Messner et al., 2013).

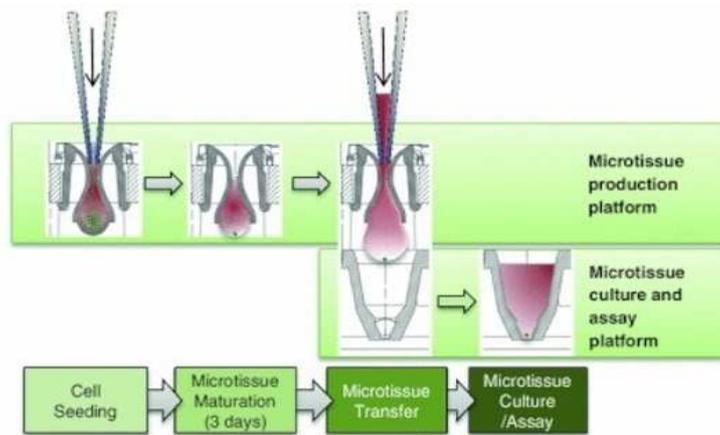


Abbildung 1 Produktionsschritte des 3D InSight™ Human Liver Microtissues (Messner et al., 2013)

3D InSight™ Human Liver Maintenance Medium	InSphero® Biomimetic Microtissue Technology AG, Schlieren/Schweiz
3D InSight™ Human Liver Microtissues von 6 verschiedenen Donoren	InSphero® Biomimetic Microtissue Technology AG, Schlieren/Schweiz

2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

3-Methylcholanthrene	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim/Deutschland
3-Morpholino-propansulfonsäure (MOPS)	Omnilab-Laborzentrum GmbH & Co. KG, Bremen/Deutschland
Sigma® Acetaminophen	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim/Deutschland
Amiodarone hydrochloride	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim/Deutschland
Diclofenac Sodium	Calbiochem-Novabiochem Corporation, San Diego/U.S.A.
Dulbecco's Phosphate buffered Saline w/o Ca ²⁺ /Mg ²⁺	PAN Biotech GmbH, Aidenbach/Deutschland
Isoniazid	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim/Deutschland

Tween®20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim/Deutschland
Ximelagatran	Santa Cruz Biotechnology, Incorporation, Dallas/U.S.A.
CellTiter-Blue® Cell Viability Assay - Reagenz	Promega, Mannheim/Deutschland
Caspase-Glo® 3/7 Assay: Substratmix, Assay-Puffer	Promega, Mannheim/Deutschland
CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Substratmix, Assay-Puffer und Stop Solution)	Promega, Mannheim/Deutschland

2.1.3 Zusätzliche Materialien

BD Falcon™ 15ml High-clarity Polypropylene Conical Tube (17mm x 120mm style) steril	BD medical, Heidelberg/Deutschland
BD Falcon™ 50ml Polypropylene Conical Tube (30mm x 115mm style) steril	BD medical, Heidelberg/Deutschland
BD Microlance™ 3 steril (20G x 1 ¹ / ₂ – Nr. 1)	BD medical, Heidelberg/Deutschland
BRANDplates® -pure Grade™- 96 Well standard, transparent, F-Boden	Brand GmbH + Co. KG, Wertheim/Deutschland
Combitips advanced® (0,5ml, 2,5ml)	Eppendorf, Hamburg/Deutschland
Einmalspritzen BD Discardit™ II steril (5ml, 10ml)	BD medical, Heidelberg/Deutschland
epT.I.P.S standard Pipettenspitzen (0,5-20µl, 2-200µl, 50-1000 µl)	Eppendorf, Hamburg/Deutschland
ReagentReservoirs/Tip-Tub autoklavierbar, mit Deckel	Eppendorf, Hamburg/Deutschland
Reagiergefäß 1,5ml EASY CAP	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht/Deutschland

Sarstedt steril Tube 13ml 101mm x 16,5mm, PP	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht/Deutschland
Sterilfilter Minisart High-Flow (Porengröße 0,20µm)	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen/Deutschland
Stripette® costar®-Pipetten (5ml, 10ml, 25ml)	Corning Incorporated, Corning/U.S.A.

2.1.4 Geräte

Brutschrank HERA cell 240	Heraeus Holding GmbH, Hanau/Deutschland
Brutschrank Heraeus Typ B 5028; DIN 58945	Heraeus Holding GmbH, Hanau/Deutschland
Eppendorf Easypet®	Eppendorf, Hamburg/Deutschland
Eppendorf Multipette® M4	Eppendorf, Hamburg/Deutschland
Eppendorf Research® plus 1-Kanal-Pipette (0,5-1000µl) 12-Kanal-Pipette (10-100 µl)	Eppendorf, Hamburg/Deutschland
GloMax®-Multi + Detection System mit der Instinct™ Software TM 340	Promega, Mannheim/Deutschland
Jouan BR4i Multifunktionszentrifuge	DJB labcare Limited, Buckinghamshire/England
Lichtmikroskop Axiovert 135TV	Carl Zeiss AG,
Kamera: AxioCam MRm Lichtquelle: XBO 75W/HBO 100W	Oberkochen/Deutschland
Lichtmikroskop Olympus CK2	Olympus Optical GmbH, Hamburg/Deutschland
Sterilwerkbank Herasafe HS12	Heraeus Holding GmbH, Hanau/Deutschland
Vortex Genie 2™	Bender & Hobein AG, Zürich/Schweiz
Waage Mettler Toledo New Classic MF	Mettler Toledo GmbH, Gießen/Deutschland
Wasserbad: W22-2	Medingen GmbH, Arnsdorf/Deutschland

2.1.5 Software

Instinct™ Software TM 340	Promega, Mannheim/Deutschland
---------------------------	-------------------------------

2.2 Methoden

2.2.1 Medikamenten- und Donorenauswahl

Um die Sphäroide auf ihre Aussagekraft hinsichtlich der pathophysiologisch unterschiedlichen Mechanismen medikamentös-induzierter Hepatotoxizität zu untersuchen wurden 5 entsprechende Medikamente ausgewählt.

Acetaminophen ist der bekannteste Vertreter dosisabhängiger, intrinsischer Hepatotoxizität, der unter anderem über seinen reaktiven Metaboliten N-Acetyl-p-benzo-chinonimin akute Leberschäden verursacht (H. Jaeschke, 2015; James et al., 2003).

Ximelagatran ist ein orales Antikoagulans und wurde wegen seiner hepatotoxischen Nebenwirkungen 2006 vom Markt genommen (<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/ScienceResearch/ResearchAreas/ucm073046.pdf>).

Ximelagatran wirkt sich über den aktiven Metaboliten Melagatran im Sinne der Hapten-Hypothese idiosynkratischer Hepatotoxizität auf die Leber aus (Testa et al., 2007). Varianten der HLA-Allele konnten als Risikofaktoren identifiziert werden und sprechen für einen immunologischen, idiosynkratischen Leberschaden durch Ximelagatran (Yip et al., 2015).

Diclofenac ist ein nicht-steroidales, antiinflammatorisches Medikament, welches zur Behandlung rheumatischer Erkrankungen, sowie bei leichten bis moderaten Schmerzzuständen eingesetzt wird. Es können sowohl dosisabhängige, akute als auch dosisunabhängige, chronische Leberschäden beobachtet werden. Daraus resultieren unterschiedlich lange Latenzen bis zu den Leberschädigungen, von wenigen Wochen bis hin zu über einem Jahr nach Therapiebeginn. Der Schaden an sich wird morphologisch als überwiegend hepatozellulär charakterisiert. Es wird vermutet, dass der Schädigung vor allem ein allergischer, immunologischer Prozess zugrunde liegt. Varianten in verschiedenen Cytochrom P450-Enzymaktivitäten werden als Risikofaktoren angegeben (Boelsterli, 2003).

Isoniazid ist ein Antituberkulotikum, welches vor allem akute hepatotoxische Effekte hervorruft und bei 10-20% der Patienten zu transienten Erhöhungen der Serumtransaminasen führt. Der zugrunde liegende Schädigungsmechanismus ist vermutlich die Akkumulation eines in der Biotransformation entstandenen Metaboliten. Da es über das CYP2E1-System abgebaut wird werden Varianten dieses Enzyms als Risikofaktoren angegeben, ebenso wie Slow-Acetylierer. Kennzeichen einer Hypersensibilitätsreaktion bei den betroffenen Patienten lassen zudem auf eine gewisse immunologische Komponente schließen. Es konnten Anti-Isoniazid-Antikörper und anti-CYP-Autoantikörper bei entsprechend geschädigten Individuen festgestellt werden. HLA-DRB1*03 gilt ebenfalls als Risikofaktor (Hassan, Guo, Yousef, Luyong, & Zhenzhou, 2015; K. Liu et al., 2014; Metushi, Sanders, Lee, & Utrecht, 2014; Perwitasari, Atthobari, & Wilffert, 2015).

Amiodaron ist ein Antiarrhythmikum, welches in 15-50% aller Patienten abnormale Leberfunktionen verursacht. Dieser Effekt beruht vermutlich nicht primär auf den bei der Biotransformation entstandenen Substraten, sondern auf deren kumulativen Toxizität nach gewisser Latenz, die vor allem auch mitochondriale Funktionen wie den Fettabbau beeinflusst und so zu einer Steatose respektive Steatohepatitis führen kann (Harris et al., 1983; Rabinowich & Shibolet, 2015; Raschi et al., 2015; Wu et al., 2016). Die Konzentrationen der Medikamente wurden in jeweils 4 aufsteigenden – subtherapeutischen, therapeutischen und supratherapeutischen/toxischen – Konzentrationen verwendet (siehe Tabelle 1). Diese wurden zum einen vom aktuellen wissenschaftlichen Kenntnisstand abgeleitet (Brennan, Brien, & Armstrong, 1991; Chideya et al., 2009; Lissy, Scallion, Stiff, & Moore, 2010; Schutzer et al., 2004), zum anderen nach der Empfehlung zur Festlegung der in vitro-Screening-Dosis als höchstens das 100-fache der beim Patienten gemessenen Plasmaspitzenwerte ($100 \times C_{\max}$) respektive $100\mu\text{M}$ bei unbekannter C_{\max} festgelegt (Xu et al., 2008). Es wurde zudem berücksichtigt, dass die Konzentrationen der Medikamente in der Leber tatsächlich wohl sehr viel höher sind als im Blut gemessen wird, so dass Werte von 1, 10, 50 und $100 \times C_{\max}$ verwendet wurden (Bierton, Gilbert, Kostakis, & Langlois, 2013; McIntyre, 2014).

Medikament	APAP	Diclofenac	Isoniazid	Ximelagatran	Amiodaron
Konzentration 1	0,1 mM	5,0 µM	10 µM	1,0 µM	5 µM
Konzentration 2	0,5 mM	10 µM	50 µM	5,0 µM	10 µM
Konzentration 3	1,0 mM	50 µM	100 µM	10 µM	50 µM
Konzentration 4	5,0 mM	100 µM	200 µM	50 µM	100 µM

Tabelle 1 Konzentrationen der verwendeten Medikamente

Es wurden 6 in ihren Cytochrom P450-Enzymausprägungen und Suszeptibilitätsfaktoren möglichst verschiedene Donoren untersucht (siehe Tabelle 2-4).

	QQE	IZT	EPB
Geschlecht	weiblich	weiblich	männlich
Alter	42	44	31
Ethnie	kaukasisch	kaukasisch	kaukasisch
Diagnosen	Arterielle Hypertonie Adipositas Grad II OSAS Anämie Depression Fibromyalgie Z.n. Hautkrebs	Arterielle Hypertonie Diabetes mellitus Typ 2 COPD V.a. Nierenzellkarzinom	Allergisches Asthma
Medikamente	Polymedikation	unbekannt	keine
Todesursache	Hypoxie (kardiovaskulär)	Apoplex	Hypoxie (Heroinintoxikation)
Nikotin	nein	nein	17 Jahre
Alkohol	gelegentlich am Wochenende	nein	2-3 Bier/Tag (10 Jahre)
Drogen	keine	unbekannt	Marihuana Oxycodon Heroin (10 Jahre)

Tabelle 2 Allgemeine Anamnese der 3 Donoren des ersten Langzeitversuchs

	FOS	IGM	SSR
Geschlecht	männlich	weiblich	männliche
Alter	34	54	22
Ethnie	arabisch	spanisch	kaukasisch
Diagnosen	keine	Arterielle Hypertonie Diabetes mellitus Typ 2 Z.n. Myokardinfarkt und Stentimplantation Ischämische Kardiomyopathie	Arterielle Hypertonie Z.n. Karzinoid-Tumor der Appendix Z.n. Nieren- Transplantation 2x (Dialyse-pflichtig)
Medikamente	keine	Aminosalicylsäure, Enalapril, Plavix, Metoprolol, Metformin	keine
Todesursache	Hypoxie (Erhängen)	Hypoxie (kardiovaskulär)	Apoplex
Nikotin	nein	nein	gelegentlich Zigarre
Alkohol	8-10 Bier/Tag (13 Jahre)	nein	nein
Drogen	keine	keine	Marihuana täglich (4-5 Jahre)

Tabelle 3 Allgemeine Anamnese der 3 Donoren des zweiten Langzeitversuchs

	QQE	IZT	EPB	FOS	IGM	SSR
ECOD	51	68	97	24	137	115
UGT	448	456	340	480	516	494
ST	70	58	29	31	37	28
CYP1A2	10	12	43	14	8	32
CYP2A6	115	24	38	BQL	134	165
CYP2B6	25	-	-	6	227	22
CYP2C8	270	-	-	225	278	193
CYP2C9	85	35	38	38	66	55
CYP2C19	3	1	17	3	5	21
CYP2D6	1	0,4	30	24	40	2
CYP3A4	37	51	58	32	63	29
CYP2E1: (6-Hydroxy- Chlorzoxazon)	13	48	70	7	13	39
CYP2E1: (6 β -Hydroxy- Testosteron)	69	-	-	50	182	113

Tabelle 4 Enzymaktivitäten der 6 Donoren

Zudem wurden mittels geeigneter Substanzen jeweils Negativ- (keine toxischen Effekte; Inkubation mit DMSO) und Positiv-Kontrollen (sicher toxische Effekte,

Inkubation mit Tween20[®]) erzeugt. Durch Messungen an Tag 4, Tag 14, Tag 21 und Tag 28 konnten sowohl Akut- als auch Langzeiteffekte untersucht werden.

2.2.2 Arbeit in der Zellkultur

Nach der Lieferung der 3D InSight™ Human Liver Microtissues wurden diese nach dem von InSphero[®] vorgegebenen Protokoll für die Arbeit in der Zellkultur vorbereitet. Dazu wurde als erstes die Temperatur in der Transportbox auf dem mitgelieferten Thermometer abgelesen. Mit Werten von 25,5°C beim ersten und 25,8°C beim zweiten Langzeitversuch lag diese im Zielbereich (Raumtemperatur). Da dem Thermometer kein Warnzeichen zu entnehmen war konnte davon ausgegangen werden, dass dieser Zielbereich während des Transports weder über- noch unterschritten wurde. Als nächstes wurden die 96-Well-Platten bei Raumtemperatur zwei Minuten lang mit der Jouan BR4i Multifunktionszentrifuge zentrifugiert (1300 rpm, Bremse: 5). Dies sollte am Rand der Microtiterplatten haftende Microtissues lösen. Anschließend wurde die Schutzfolie auf den Platten unter der Sterilwerkbank entfernt. Es wurden 80µl Medium aus jedem Well abpipettiert und die gleiche Menge im Wasserbad auf 37°C vorgewärmtes 3D InSight™ Human Liver Maintenance Medium zugegeben. Der mit einem Schwamm versehene Deckel jeder 96-Well-Microtiterplatte wurde zu zwei Seiten mit jeweils 4ml sterilem H₂O befeuchtet. Die verschlossenen Microtiterplatten wurden vor der ersten Behandlung mit den Reagenzien 24 Stunden im Inkubator (37°C, 5% CO₂) kultiviert. Am ersten Tag des Langzeitversuches wurden die Zellen nach dem Schema in Abbildung 2 inkubiert. Die Inkubationslösungen wurden vor dem Gebrauch im Wasserbad auf 37°C erwärmt.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	con	APAP 0,2mM	APAP 2mM	Diclo 10µM	Diclo 100µM	INH 20µM	INH 200µM	con	Xime 2µM	Xime 20µM	Amio 10µM	Amio 100µM
B	con	APAP 0,2mM	APAP 2mM	Diclo 10µM	Diclo 100µM	INH 20µM	INH 200µM	con	Xime 2µM	Xime 20µM	Amio 10µM	Amio 100µM
C	con	APAP 0,2mM	APAP 2mM	Diclo 10µM	Diclo 100µM	INH 20µM	INH 200µM	con	Xime 2µM	Xime 20µM	Amio 10µM	Amio 100µM
D	con	APAP 0,2mM	APAP 2mM	Diclo 10µM	Diclo 100µM	INH 20µM	INH 200µM	con	Xime 2µM	Xime 20µM	Amio 10µM	Amio 100µM
E	Tween20®	APAP 1mM	APAP 10mM	Diclo 20µM	Diclo 200µM	INH 100µM	INH 400µM	con	Xime 10µM	Xime 100µM	Amio 20µM	Amio 200µM
F	Tween20®	APAP 1mM	APAP 10mM	Diclo 20µM	Diclo 200µM	INH 100µM	INH 400µM	con	Xime 10µM	Xime 100µM	Amio 20µM	Amio 200µM
G	Tween20®	APAP 1mM	APAP 10mM	Diclo 20µM	Diclo 200µM	INH 100µM	INH 400µM	con	Xime 10µM	Xime 100µM	Amio 20µM	Amio 200µM
H	Tween20®	APAP 1mM	APAP 10mM	Diclo 20µM	Diclo 200µM	INH 100µM	INH 400µM	con	Xime 10µM	Xime 100µM	Amio 20µM	Amio 200µM

Abbildung 2 Schematische Darstellung einer 96-Well-Platte beim erstmaligen Medienwechsel mit den Inkubationslösungen

Die Konzentrationen der Chemikalien wurden hier doppelt so hoch wie eigentlich gewünscht angesetzt. Grund dafür ist ein Verdünnungseffekt von 1:2, da nur die Hälfte des im Well befindlichen Mediums (50µl) abpipettiert und durch Inkubationslösung ersetzt wurde. Diese Vorgehensweise beugt einem versehentlichen Aspirieren des Microtissues vor. Die Lösungen wurden unter der Sterilwerkbank mittels Verdünnungsreihen im 3D InSight™ Human Liver Maintenance Medium jede Woche neu hergestellt, um die Wahrscheinlichkeit einer Verunreinigung zu minimieren. Als Kontrolle wurde steriles DMSO Hybri-Max® in 3D InSight™ Human Liver Maintenance Medium gelöst, so dass eine 0,1%-ige Lösung entstand. Tween20® wurde durch kräftiges auf- und abpipettieren im 3D InSight™ Human Liver Maintenance Medium gelöst und nach der Sterilfiltration als 1%-ige Lösung verwendet. 45,36mg Acetaminophen wurden abgewogen und im Wasserbad bei 37°C in 10ml 3D InSight™ Human Liver Maintenance Medium gelöst, um eine 30mM-Stock Solution herzustellen. Nach der Sterilfiltration wurden die gewünschten Verdünnungen durch die Zugabe von 3D InSight™ Human Liver Maintenance Medium hergestellt. Für Amiodaron, Diclofenac, Isoniazid und Ximelagatran lagen bereits Stock Solutions vor (siehe Tabelle 5, A). Diese wurden zur gewünschten Konzentration (siehe Tabelle 5, B) mit 3D InSight™ Human Liver Maintenance Medium verdünnt und sterilfiltriert verwendet.

A

Diclofenac	500 mM
Isoniazid	100 mM
Amiodaron	50 mM
Ximelagatran	10 mM

B

Acetaminophen	0,1 ; 0,5 ; 1,0 ; 5,0 [mM]
Amiodaron	5,0 ; 10 ; 50 ; 100 [µM]
Diclofenac	5,0 ; 10 ; 50 ; 100 [µM]
Isoniazid	10,0 ; 50,0 ; 100 ; 200 [µM]
Ximelagatran	1,0 ; 5,0 ; 10 ; 50 [µM]

Tabelle 5 Konzentrationen der verwendeten Stock Solutions (A) und die im Versuch verwendeten Medikamentenkonzentrationen (B)

Zweimal pro Woche, im Abstand von jeweils drei beziehungsweise vier Tagen, wurde bei jeder Microtiterplatte die im Wasserbad auf 37°C erwärmte Inkubationslösung nach dem Schema in Abbildung 3 gewechselt.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	con	APAP 0,1mM	APAP 1mM	Diclo 5µM	Diclo 50µM	INH 10µM	INH 100µM	con	Xime 1µM	Xime 10µM	Amio 5µM	Amio 50µM
B	con	APAP 0,1mM	APAP 1mM	Diclo 5µM	Diclo 50µM	INH 10µM	INH 100µM	con	Xime 1µM	Xime 10µM	Amio 5µM	Amio 50µM
C	con	APAP 0,1mM	APAP 1mM	Diclo 5µM	Diclo 50µM	INH 10µM	INH 100µM	con	Xime 1µM	Xime 10µM	Amio 5µM	Amio 50µM
D	con	APAP 0,1mM	APAP 1mM	Diclo 5µM	Diclo 50µM	INH 10µM	INH 100µM	con	Xime 1µM	Xime 10µM	Amio 5µM	Amio 50µM
E	Tween20®	APAP 0,5mM	APAP 5mM	Diclo 10µM	Diclo 100µM	INH 50µM	INH 200µM	con	Xime 5µM	Xime 50µM	Amio 10µM	Amio 100µM
F	Tween20®	APAP 0,5mM	APAP 5mM	Diclo 10µM	Diclo 100µM	INH 50µM	INH 200µM	con	Xime 5µM	Xime 50µM	Amio 10µM	Amio 100µM
G	Tween20®	APAP 0,5mM	APAP 5mM	Diclo 10µM	Diclo 100µM	INH 50µM	INH 200µM	con	Xime 5µM	Xime 50µM	Amio 10µM	Amio 100µM
H	Tween20®	APAP 0,5mM	APAP 5mM	Diclo 10µM	Diclo 100µM	INH 50µM	INH 200µM	con	Xime 5µM	Xime 50µM	Amio 10µM	Amio 100µM

Abbildung 3 Schematische Darstellung einer 96-Well-Platte an den ersten 10 Tagen des jeweiligen Versuchs

Hierzu wurden unter der Sterilwerkbank 50µl der Flüssigkeit aus jedem Well langsam ($v < 30\mu\text{l/s}$) abpipettiert um den Microtissue nicht zu schädigen und 50µl der jeweiligen Lösung hinzugegeben ($v = 30\text{-}50\mu\text{l/s}$). Um den Microtissue nicht zu aspirieren wurde die Pipettenspitze wie in Abbildung 4 angesetzt.

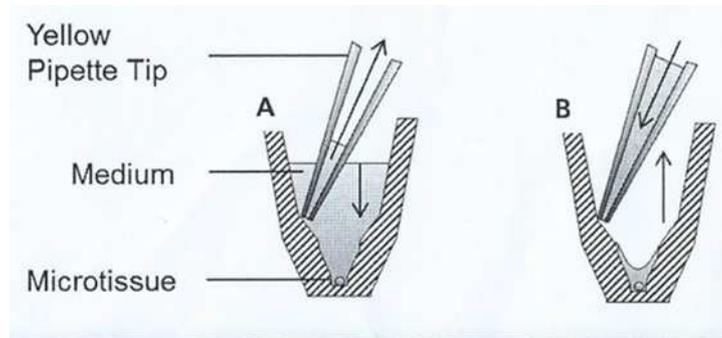


Abbildung 4 Ansetzen der Pipettenspitze beim Aspirieren (A) und Zugeben (B) der jeweiligen Flüssigkeit laut Herstellerangaben

Zwischen den Medienwechseln wurden die Microtiterplatten im Inkubator (37°C , 5% CO_2) kultiviert. Ab Tag 11 des Versuchs wurden die Microtiterplatten nach dem Schema in Abbildung 4 behandelt. Einziger Unterschied hierbei waren die vier Wells (A8, B8, C8, D8), die zuvor mit Kontrollösung und jetzt mit Tween20® behandelt wurden (siehe Abb. 5).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	con	APAP 0,1mM	APAP 1mM	Diclo 5µM	Diclo 50µM	INH 10µM	INH 100µM	Tween20®	Xime 1µM	Xime 10µM	Amio 5µM	Amio 50µM
B	con	APAP 0,1mM	APAP 1mM	Diclo 5µM	Diclo 50µM	INH 10µM	INH 100µM	Tween20®	Xime 1µM	Xime 10µM	Amio 5µM	Amio 50µM
C	con	APAP 0,1mM	APAP 1mM	Diclo 5µM	Diclo 50µM	INH 10µM	INH 100µM	Tween20®	Xime 1µM	Xime 10µM	Amio 5µM	Amio 50µM
D	con	APAP 0,1mM	APAP 1mM	Diclo 5µM	Diclo 50µM	INH 10µM	INH 100µM	Tween20®	Xime 1µM	Xime 10µM	Amio 5µM	Amio 50µM
E	Tween20®	APAP 0,5mM	APAP 5mM	Diclo 10µM	Diclo 100µM	INH 50µM	INH 200µM	con	Xime 5µM	Xime 50µM	Amio 10µM	Amio 100µM
F	Tween20®	APAP 0,5mM	APAP 5mM	Diclo 10µM	Diclo 100µM	INH 50µM	INH 200µM	con	Xime 5µM	Xime 50µM	Amio 10µM	Amio 100µM
G	Tween20®	APAP 0,5mM	APAP 5mM	Diclo 10µM	Diclo 100µM	INH 50µM	INH 200µM	con	Xime 5µM	Xime 50µM	Amio 10µM	Amio 100µM
H	Tween20®	APAP 0,5mM	APAP 5mM	Diclo 10µM	Diclo 100µM	INH 50µM	INH 200µM	con	Xime 5µM	Xime 50µM	Amio 10µM	Amio 100µM

Abbildung 5 Schematische Darstellung einer 96-Well-Platte ab dem 11. Tag des jeweiligen Versuchs

Des Weiteren wurden die beim Medienwechsel abpipettierten Flüssigkeiten (50µl), die Überstände, je nach Bedarf auf 96-Well Brandplatten übertragen. An Tag 4, 14 und 21 der Langzeitversuche wurde bei der Hälfte dieser mit den Überständen befüllten Brandplatten LDH gemessen (siehe 2.2.2.3). Die andere Hälfte der Überstände wurde für eventuelle Messungen zu einem späteren Zeitpunkt bei -30°C eingefroren. Parallel wurden die Microtissues unter dem Lichtmikroskop betrachtet, um auch morphologische Veränderungen feststellen zu können und eventuelle Belegungsfehler (das heißt kein oder mehrere Microtissues in einem Well) aufzudecken. Dies wurde bei der Auswertung der entsprechenden Messwerte berücksichtigt. An Tag 14, also nach der Hälfte des Langzeitversuchs, wurden die Absorptionskissen in den Deckeln der Microtiterplatten unter der Sterilwerkbank erneut von jeweils zwei Seiten mit 4ml destilliertem H₂O befeuchtet. Dies war nötig um dem Austrocknen der Platten vorzubeugen. An Tag 28 wurden die Abschlussmessungen durchgeführt. Bei der Hälfte der Platten wurde LDH im Überstand und in den lysierten Zellen (siehe 2.2.3.3) bestimmt. Bei der anderen Hälfte der Platten wurden Messungen zur Zellviabilität und Apoptose der Zellen durchgeführt (siehe 2.2.3.1/2.2.3.2). Für diese Messungen mussten die Microtissues von den Microtiterplatten auf 96-Well-Brandplatten mit flachem Boden übertragen werden, da nur diese mit dem Messgerät kompatibel waren. Hierzu wurden die Microtissues mit einer 1ml-Pipettenspitze aspiriert und übertragen (siehe Abb. 6). Dazu wurde die Pipette auf 50µl eingestellt.

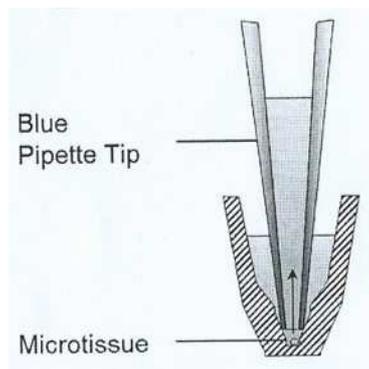


Abbildung 6 Aspiration des Microtissues mit der 1ml-Pipettenspitze laut Herstellerangaben

2.2.3 Promega Assays

Alle Messwerte wurden mit Hilfe von Assays der Firma Promega gewonnen. Die Apoptoserate der Zellen konnte über die Caspase-Aktivitäten mit dem Caspase-Glo[®]

3/7 Assay bestimmt werden. Aussagen über die Zytotoxizität der zugegebenen Medikamente und die Zellviabilität wurden über die intra- und extrazellulär vorhandenen LDH-Aktivitäten getroffen, die via CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay bestimmt wurden. All diese kalorimetrischen, Lumineszenz- und Fluoreszenzmessungen fanden mit dem GloMax®-Multi + Detection System mit der Instinct™ Software TM 340 statt.

2.2.3.1 CellTiter-Blue® Cell Viability Assay

Der CellTiter-Blue® Cell Viability Assay wurde verwendet, um die Viabilität der Zellen nach 4 Wochen Behandlung mit den ausgewählten Medikamenten und Reagenzien darstellen zu können. In einer chemischen Reaktion wird der in der zugegebenen Lösung enthaltene blaue Farbstoff Resazurin zu Resorufin reduziert. Als Reduktionsmittel dient hier das in den stoffwechselaktiven Zellen vorhandene NADH. Es kann als Parameter der Viabilität einer Zelle gesehen werden, da nur gesunde Zellen NADH bilden können und diese Fähigkeit nach einer Schädigung verlieren.

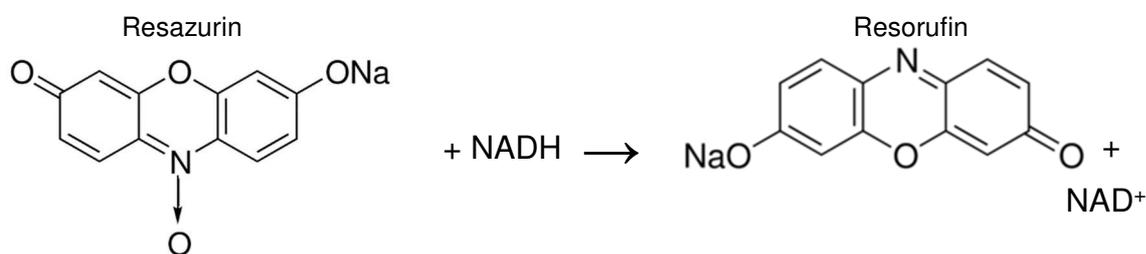


Abbildung 7 Reaktion des CellTiter-Blue® Cell Viability Assays

Je mehr lebensfähige Zellen noch vorhanden waren, umso mehr Resazurin wurde zu Resorufin umgesetzt. Im Umkehrschluss kann daraus geschlossen werden, dass bei wenig Umsatz nur noch wenige Zellen lebensfähig gewesen sind. Die Bildung des rosafarbenen Resorufins konnte über eine Messung der Fluoreszenz mit dem GloMax®-Multi + Detection System quantifiziert werden. Um die Microtissues verwenden zu können mussten diese erst wie unter 2.2.1 beschrieben von den Microtiterplatten auf Brandplatten mit flachem Boden übertragen werden, da nur diese mit dem verwendeten Gerät kompatibel waren. Dem vom Hersteller empfohlenen Protokoll folgend wurde als erstes die CellTiter-Blue®-Lösung im Verhältnis von 1:4 mit PBS hergestellt und gut durchgemischt. In jedes Well wurden 10µl dieser Lösung

gegeben und durch einmaliges auf- und abpipettieren vermischt. Dabei war darauf zu achten, dass für jedes Well eine separate Pipettenspitze verwendet wurde. Für eine Stunde wurden die Platten bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Fluoreszenzmessung fand anschließend im GloMax[®]-Multi + Detection System unter der Verwendung des grün-Filters statt, da Resorufin sein Absorptionsmaximum bei 573nm hat. Um so genaue Messwerte wie möglich zu erhalten, wurde darauf geachtet, dass keine Luftblasen in den Wells vorhanden waren. Die Reaktion wurde auch in Wells ohne Zellen, nur mit dem verwendeten Medium und der CellTiter-Blue[®]-Lösung, durchgeführt. Die so erhaltenen Rohwerte des Mediums, nachfolgend als „Blanks“ bezeichnet, wurden bei den Berechnungen im Anschluss als Basisaktivität von den Messwerten abgezogen um die Reinwerte für die Zellen zu erhalten.

2.2.3.2 Caspase-Glo[®] 3/7 Assay

Der Caspase-Glo[®] 3/7 Assay wurde zur Bestimmung von Caspase-Aktivitäten verwendet. Es konnten so Rückschlüsse auf die Apoptoserate in den Zellen nach vier Wochen Inkubation mit den oben genannten Medikamenten gezogen werden.

Der Assay beruht auf nacheinander ablaufenden Reaktionen, durch welche die Aktivitäten der Caspase-3 und -7 mittels Lumineszenz über das Tetrapeptid DEVD gemessen werden. Diese beiden Caspasen spielen eine Schlüsselrolle in der Signalkaskade der zellulären Apoptose. In der ersten dieser beiden Reaktionen wird das in der Caspase-Glo[®] 3/7-Lösung enthaltene Z-DEVD-Aminoluciferin als Substrat der Caspase-3 und -7 gespalten. Aminoluciferin entsteht. Je mehr Caspase-3- und -7-Aktivität vorhanden ist, umso mehr Aminoluciferin wird gebildet. Laut Promega kann von einer direkten Proportionalität zwischen den Caspaseaktivitäten, also der sich in Apoptose befindenden Zellen, und der Stärke des Lumineszenzsignals ausgegangen werden.

Anschließend wird das entstandene Aminoluciferin durch die ebenfalls in der Caspase-Glo[®] 3/7-Lösung enthaltene UltraGlo[™] Luciferase umgesetzt. Ein Lumineszenz-Signal entsteht, welches laut Herstellerangaben über mehrere Stunden stabil bleibt und mittels GloMax[®]-Multi + Detection System mit der Instinct[™] Software TM 340 quantifiziert werden kann (siehe Abb. 8).

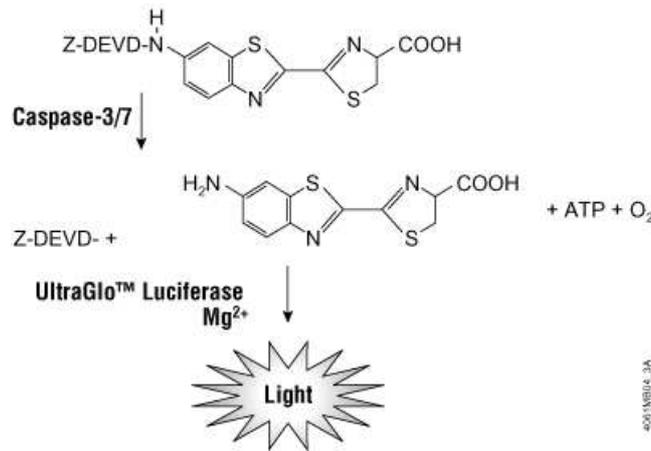


Abbildung 8 Reaktionswege des Caspase-Glo® 3/7-Assays
 (<https://www.promega.de/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/101/caspase-glo-3-7-assay-protocol.pdf>, S. 3)

Die Durchführung dieses Assays fand direkt im Anschluss an die Versuche mit dem CellTiter-Blue® Cell Viability Assay statt. Da sich die Reagenzien beider Assays laut Promega aber nicht gegenseitig beeinflussen, konnten die Überstände in den Brandplatten direkt und ohne Reinigung für den Caspase-Glo® 3/7 Assay verwendet werden.

Dem Protokoll von Promega folgend wurde als erstes die Caspase-Glo® 3/7-Lösung hergestellt. Dazu wurden 10ml des mitgelieferten Puffers zu dem vorportionierten Pulver in einem Reagenzfläschchen gegeben. Nach gutem durchmischen mit Hilfe eines Vortexers wurden 60µl dieser Reagenz in jedes Well pipettiert. Im GloMax®-Multi + Detection System wurden die Platten anschließend 30 Sekunden lang orbital und auf niedrigster Geschwindigkeitsstufe geschüttelt um eine homogene Lösung zu erhalten. Nach einer Stunde Inkubation bei Raumtemperatur und Dunkelheit wurden die Lumineszenz-Signale mit dem GloMax®-Multi + Detection System bei 490nm gemessen. Um die Messwerte nicht zu verfälschen wurde darauf geachtet, dass sich in den Wells keine Luftblasen befanden.

2.2.3.3 CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay

Mit dem CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay wurde die Aktivität der LDH zum einen im Überstand (extrazellulär) und zum anderen in den lysierten Microtissues (intrazellulär) quantifiziert. LDH wird hier als Indikator der Zytotoxizität der zugegebenen Reagenzien gesehen, da dieses sehr stabile Enzym erst bei erheblichem Zellschaden nach extrazellulär freigesetzt wird. Ist ein Microtissue

geschädigt, wird somit vermutlich im Überstand mehr LDH-Aktivität vorhanden sein als in seinem Lysat. Umgekehrt wird bei einem intakten Microtissue weniger LDH im Überstand als im Lysat erwartet und erlaubt somit Rückschlüsse auf die Zellviabilität. Der Assay basiert auf zwei enzymatischen Reaktionen. Zum einen wird Lactat mit Hilfe des Cofaktors NAD^+ über die LDH zu Pyruvat und NADH oxidiert (siehe Abb. 9). Das in dem Substratmix enthaltene Tetrazoliumsalz (INT) reagiert mit dem entstandenen NADH über eine Diaphorase zu rot-leuchtendem Formazan und NAD^+ (siehe Abb. 9). Eben dieses Formazan (siehe Abb. 9) kann bei der anschließenden kolorimetrischen Messung bei 490nm quantifiziert werden und steht in direkter Proportionalität zu der enthaltenen Aktivität der LDH.

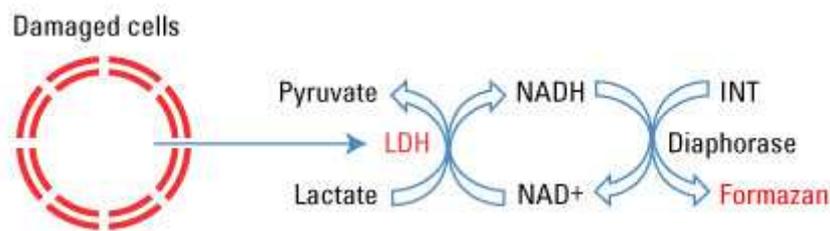


Abbildung 9 Chemische Reaktionen des CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assays
<http://www.thermofisher.com/order/catalog/product/88953>

Hergestellt wurde die CytoTox 96®-Lösung durch Vermischen von 12ml Assay-Puffer zu einem Fläschchen mit vorportioniertem Substratmix.

Zur Bestimmung der LDH-Aktivität im Überstand wurden 50µl Überstand aus jedem Well der Microtiterplatte abpipettiert und auf eine Brandplatte übertragen. Zusätzlich wurden mehrere Wells einer weiteren Brandplatte mit 50µl des 3D InSight™ Human Liver Maintenance Mediums ohne Zellen befüllt, um Rohwerte für das entsprechende Medium zu erhalten. In jedes Well wurden anschließend 50µl der CytoTox 96®-Lösung pipettiert. Nach 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur und Dunkelheit wurden in jedes Well 25µl der mitgelieferten „Stop Solution“ pipettiert um die Reaktion zu stoppen.



Abbildung 10 Brandplatte mit Überständen des Donors IGM vor der Messung mit dem GloMax®-Multi + Detection System an Tag 4 des Langzeitversuchs; rot (entspricht viel LDH) links unten Positiv-Kontrolle (Tween20®) und rechts Amiodaron 50µM und 100µM

Anschließend wurde im GloMax®-Multi + Detection System gemessen. Dabei wurde wieder darauf geachtet, dass keine Luftblasen in den Wells waren um die Messwerte nicht zu verfälschen.

Um die verbleibenden LDH-Aktivitäten in den Sphäroiden messen zu können mussten diese erst lysiert werden. Dazu wurde als erstes das noch vorhandene Medium vollständig aus der Microtiterplatte abpipettiert. Dabei musste darauf geachtet werden, dass der Microtissue nicht mit entfernt wurde. Anschließend wurden in jedes Well 50µl Lysepuffer (bestehend aus: 20mM MOPS + 0,1% Triton) pipettiert und die Platten 30 Minuten lang auf Eis inkubiert. Die Wells wurden hierzu durch auf- und abpipettieren gut durchmischt bis alle Zellen lysiert waren. Der Fortschritt der Lyse wurde im Lichtmikroskop mehrmals optisch kontrolliert. Für jedes Well wurde eine separate Pipettenspitze benutzt, um keine Zellen von einem in ein anderes Well zu verschleppen. Anschließend wurden 50µl dieser Zellsuspension auf eine Brandplatte übertragen. Zusätzlich wurden in jedes Well 50µl der CytoTox 96®-Lösung pipettiert. Bei Raumtemperatur und Dunkelheit wurden die Platten 30 Minuten inkubiert und dann im GloMax®-Multi + Detection System gemessen. Zusätzlich wurden hier auch Blank-Werte des Lysepuffers bestimmt, um diese bei der Auswertung berücksichtigen zu können. Dazu wurden zu 50µl des Lysepuffers 50µl der CytoTox 96®-Lösung gegeben und der Versuch wie oben beschrieben durchgeführt.

2.2.4 Auswertung der Messdaten

2.2.4.1 Caspase-Glo® 3/7 Assay und CellTiter-Blue® Cell Viability Assay

Als erstes wurde bei allen Messreihen der Mittelwert aus den vorhandenen Blanks berechnet. Dieser wurde von jedem der 96 Messwerte pro Platte abgezogen um die Rohwerte für die Zellen zu erhalten. Diese wurden dann auf die Kontrolle normiert, welche dem Wert 1 gleichgesetzt wurde. Pro Donor wurden aus den Quadruplets jeder Konzentration und jedes Medikamentes ebenfalls die Mittelwerte bestimmt und diese dann als Vielfaches der Kontrolle angegeben.

Um einen Wert für die Caspase-Aktivität pro noch vitaler Zelle angeben zu können, wurden die Caspase-Messwerte durch die entsprechenden LDH-Aktivitäten der Lysate geteilt. Da bei niedriger absoluter Caspase-Aktivität in einem Well bei sehr wenigen Zellen eine verhältnismäßig hohe Aktivität pro einzelner vitaler Zelle übersehen werden würde. Dementsprechend eine absolut gemessene hohe Caspase-Aktivität eines Wells bei sehr vielen Zellen auch nur eine relativ gesehen geringe Aktivität pro einzelner Zelle bedeuten würde. Die daraus resultierenden Werte wurden wieder auf den Mittelwert der Kontrolle normiert. Abschließend wurden die Mittelwerte der jeweiligen Quadruplets für jeden Donor und jedes Medikament bestimmt und diese als Vielfaches der Kontrolle angegeben und ausgewertet.

2.2.4.2 CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay

Von allen Messreihen pro Versuchstag wurde als erstes der Mittelwert der Blanks berechnet. Dieser wurde von den 96 Messwerten pro Platte abgezogen und auf die Kontrolle normiert, welche dem Wert 1 gleichgesetzt wurde. Anschließend wurden die Mittelwerte der Quadruplets jeder Konzentration für jedes Medikament berechnet und als Prozentsatz der Kontrolle angegeben. Für die LDH-Werte in den Überständen entstanden somit pro Donor LDH-Aktivitäten in den Überständen an Tag 4, Tag 14, Tag 21 und Tag 28. Mit den LDH-Aktivitäten der Lysate an Tag 28 wurde genauso verfahren. Mit den erhaltenen Mittelwerten der LDH-Aktivitäten der Lysate und Überstände wurde anschließend der „LDH-Release“ für jedes Medikament, die Positiv- und die Negativ-Kontrolle an den unterschiedlichen Messzeitpunkten nach folgender Formel berechnet:

Tag 0	0
Tag 4	LDH im Überstand an Tag 4/Gesamt-LDH
Tag 14	LDH im Überstand an Tag 14/Gesamt-LDH
Tag 21	LDH im Überstand an Tag 21/Gesamt-LDH
Tag 28	LDH im Überstand an Tag 28/Gesamt-LDH

Das Gesamt-LDH wurde hier wie folgt durch Adduktion der Werte der 4 Messtage berechnet:

Gesamt-LDH = LDH im Überstand an Tag 4 + LDH im Überstand an Tag 14 + LDH im Überstand an Tag 21 + LDH im Überstand an Tag 28 + LDH im Lysat an Tag 28.

2.2.5 Statistik

Bei der Auswertung der Messdaten wurde bei der Betrachtung individueller Unterschiede der Standardfehler des Mittelwertes angegeben (Standardabweichung/ $\sqrt{6}$), da hier mit einer starken Streuung der einzelnen Messwerte zu rechnen war (siehe 3.1.1-3.1.5). Bei der Auswertung und Betrachtung der Streuung von Einzeldaten, also aller anderen angegebenen Daten, wurde die Standardabweichung berechnet und angegeben.

Um die Messdaten auf signifikante Unterschiede gegenüber der Kontrolle zu untersuchen wurde ein einseitiger t-Test auf die je Medikamentenkonzentration gemessenen LDH-Release-Werte und die LDH-Aktivitäten der Lysate angewendet. Es sollte untersucht werden, ob die LDH-Release-Werte in den Überständen über die Zeit signifikant angestiegen waren respektive die LDH-Aktivitäten der Lysate an Tag 28 signifikant abgenommen hatten ($p < 0,05$).

3 Ergebnisse

3.1 Darstellung spezifischer, medikamentöser Schädigungsmuster

Der berechnete LDH-Release wurde für Rückschlüsse bezüglich der direkten Schädigung der Zellen durch das Medikament im Sinne einer akuten, nicht-immunologischen/humoral vermittelten Schädigung (Nekrose) herangezogen.

Auch die Toxizität der verschiedenen Medikamente auf die einzelnen Donoren sollte berechnet werden. Als Positiv-Kontrolle wurden hierzu Zellen mit Tween20® behandelt. Bei 4 der 6 Donoren wurden die Zellen dadurch lysiert und der erwartete

LDH-Release von bereits anfangs durchschnittlich >85% erreicht (siehe Tabelle 9). Allerdings funktionierte dies bei 2 Donoren nicht. Bei EPB betrug der maximale LDH-Release an Tag 4 nur 42% und bei QQE an Tag 14 nur 48%. Dass dieser Wert nicht dem maximalen LDH-Release und somit der maximal möglichen Schädigung der Sphäroide dieser 2 Donoren entsprach zeigte sich bei der Betrachtung der LDH-Release-Werte nach Inkubation mit 100µM Amiodaron (siehe 3.1.2). Der Versuch hatte hier nicht wie erwartet funktioniert. Das System konnte nicht zur Beurteilung von Toxizitäten herangezogen werden. Im Folgenden wurden deswegen nur die LDH-Release-Werte berücksichtigt.

Das Zellsystem war über die jeweils 28 Tage stabil. Der Mittelwert des LDH-Release der Kontrollen, ohne Donor QQE, betrug über die 28 Tage 5% (+/- 3%). Die LDH-Release-Messungen ergaben bei QQE einen Mittelwert von 13% (+/- 2%), weshalb er bei den folgenden Berechnungen herausgenommen wurde (siehe Tabelle 6).

	Tag 4	Tag 14	Tag 21	Tag 28
EPB	6%	9%	3%	5%
IZT	3%	4%	3%	3%
IGM	3%	8%	7%	15%
FOS	6%	4%	5%	1%
SSR	5%	9%	2%	1%
QQE	13%	15%	11%	9%

Tabelle 6 LDH-Release der Kontrollen des jeweiligen Donors

Intraindividuell an den 4 Messtagen hielten sich die Werte ebenfalls sehr konstant mit einer maximalen Standardabweichung von 5% bei Donor IGM (siehe Tabelle 7).

	Mittelwert über die Zeit	+/-
EPB	6%	2%
IZT	3%	1%
IGM	8%	5%
FOS	4%	2%
SSR	4%	3%
QQE	12%	2%

Tabelle 7 Mittelwert der LDH-Release-Daten der Kontrollen des jeweiligen Donors

An Tag 28 des Versuchs wurde zudem die LDH-Aktivität in den noch vorhandenen Zellen bestimmt. So wurden Rückschlüsse auf die Viabilität der noch vorhandenen Sphäroide gezogen. Aus den Lysaten der Kontrollen konnten noch durchschnittlich 80% (+/- 7%) LDH freigesetzt werden. Ein weiteres Zeichen für die Stabilität der Sphäroide in diesem Testsystem über die 28 Tage. Lediglich Donor IGM mit einer LDH-Aktivität von 67% und der bereits zu Beginn angeschlagene QQE mit 52% schienen weniger stabil zu sein (siehe Tabelle 8).

		Mittelwert	+/-
EPB	78%	75%	12%
IZT	88%		
FOS	84%		
SSR	83%		
QQE	52%		
IGM	67%		

Tabelle 8 LDH-Aktivität der Lysate der Kontrollen an Tag 28

Die Versuche konnten folglich mit diesem System sehr valide reproduziert und somit auch untereinander verglichen werden.

Der durchschnittliche LDH-Release der Donoren, bei denen die Lyse mit Tween20[®] funktioniert hatte, lag an Tag 4 bei 85% (+/- 5%) (siehe Tabelle 9).

	Tag 4	Mittelwert	+/-
IZT	78%	85%	5%
IGM	91%		
FOS	89%		
SSR	82%		

Tabelle 9 LDH-Release-Werte an Tag 4 nach Inkubation mit Tween20[®]

Mit einer stabilen basalen Aktivität der Kontrolle von nur 5% und einer maximal möglichen LDH-Freisetzung von annähernd 100% bot das System eine gute Voraussetzung zur Darstellung signifikanter, interindividueller und intermedikamentöser Unterschiede, respektive der Fragestellung dieser Arbeit.

Allerdings lagen insgesamt in etwa 9% der erhobenen Daten abzüglich der jeweiligen Blanks „below the limit of quantification (blq)“. Diese Messdaten konnten vermutlich

nicht mehr erhoben werden, da die Sphäroide sich im Laufe der jeweils 28 Tage bereits aufgelöst hatten oder funktionslos waren.

Für jedes Medikament konnte ein bestimmtes Schädigungsmuster erstellt werden. Dies war vor allem abhängig von der Medikamentenkonzentration und der Inkubationszeit.

Als dritter Parameter wurden die Caspase-Aktivitäten der noch vorhandenen Zellen an Tag 28 bestimmt. Diese wurden ins Verhältnis zu den LDH-Daten der entsprechenden Lysate gesetzt. Um die Daten besser einordnen und vergleichen zu können, wurden die Aktivitäten als Vielfaches der jeweiligen als Kontrolle dienenden Messdaten angegeben. Zwischen den 6 Donoren haben die Caspase-Aktivitäten der einzelnen Medikamentenkonzentrationen teilweise stark geschwankt, zeigten aber doch, vor allem bei Acetaminophen, signifikante Trends auf.

Mit dem Lichtmikroskop konnte man im Verlauf der 28 Tage die Schädigung der Sphäroide optisch korrelierend zu den Messdaten darstellen (siehe Abb. 11). Auch hier war ein Schema erkennbar. War der Sphäroid beschädigt, lockerte sich der Zellverband als erstes vom Rand her auf. Anschließend wurden immer mehr Einzelzellen sichtbar, bis schließlich kein oder nur noch ein entrundeter Sphäroid erkennbar war.

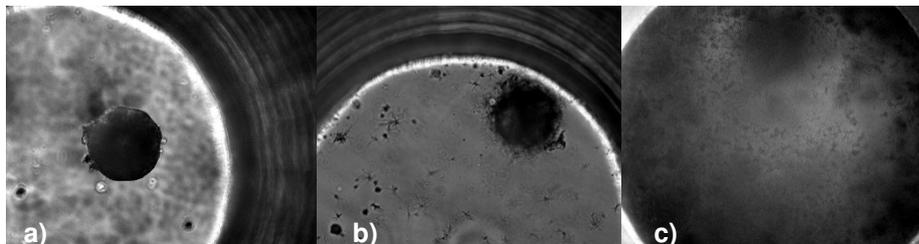


Abbildung 11 IGM a) Kontrolle Tag 10 b) Tween20® nach 4h Inkubation
c) Tween20® nach 10 Tagen Inkubation

3.1.1 Acetaminophen

Acetaminophen führt aufgrund einer intrinsischen Toxizität zu einem dosisabhängigen Leberschaden (H. Jaeschke, 2015). Dies spiegelt sich auch in den erhobenen Daten wider. Die Höhe der eingesetzten Medikamentenkonzentration und die Menge an freigesetztem LDH zeigte bei allen Donoren eine positive Korrelation.

Es ließ sich folgendes Schädigungsmuster erkennen:

	Tag 4	Tag 14	Tag 21	Tag 28
Kontrolle	5%	8%	5%	7%
Tween20®	73%	22%		
0,1mM	5%	6%	6%	6%
0,5mM	11%	19%	13%	6%
1mM	14%	19%	18%	5%
5mM	25%	35%	9%	4%

Tabelle 10 Acetaminophen – LDH-Release-Mittelwerte aller 6 Donoren in Prozent

Zum einen erkennt man hier die Dosisabhängigkeit der Schädigung. Diese tritt bei ausreichend hoher Dosis mit einer geringen Latenz gleich zu Beginn an Tag 4 bis Tag 14 ein. Dieses Zeitintervall wurde bei ansteigender Dosis kleiner. Das Maximum wurde bei allen Donoren an Tag 14 erreicht (siehe Tabelle 10). 5mM waren hierbei mit einem LDH-Release von bereits 25% (+/- 4%) an Tag 4 und 35% (+/- 7%) an Tag 14 für die meisten Zellen toxisch (siehe Tabelle 10). Hierzu passen auch die sehr niedrigen LDH-Release-Werte der folgenden Messtage. Nach Absterben der Sphäroide konnte keine LDH mehr freigesetzt und gemessen werden.

Bei der Auswertung ergaben sich bei den akuten Toxizitätseffekten an Tag 4 bei den Medikamentenkonzentrationen 0,5mM ($p=0,04$), 1mM ($p=0,01$) und 5mM ($p=0,001$) signifikante Unterschiede zu den jeweiligen Kontrollen. Bei 5mM kam es zusätzlich an Tag 14 zu einem signifikanten Unterschied ($p=0,002$).

Zum anderen konnte bei geringeren Dosen ein kumulativer, erst über die Zeit auftretender Effekt beobachtet werden. Beispielsweise hielten sich die LDH-Release-Werte bei einer therapeutischen Dosis von 0,1mM vor allem an den ersten Messtagen noch nahe an denen der Kontrolle. Lediglich ein Anstieg auf maximal 6% (+/- 2%) an Tag 28 deutete auf einen, wenn auch geringen, kumulativen Schaden hin (siehe Tabelle 10). Dieser wäre möglicherweise bei der Fortführung des Versuchs stetig angestiegen.

Die LDH-Aktivität der noch vorhandenen und lysierten Zellen an Tag 28 passte zu dem Muster der berechneten LDH-Release-Daten der Überstände an den Messtagen zuvor und ergab bei den Konzentrationen 1mM und 5mM signifikante Ergebnisse (siehe Abb. 12).

Je höher die Konzentration von Acetaminophen war, umso weniger LDH war in den Sphäroiden an Tag 28 noch vorhanden. Lag bei einer Konzentration von 0,1mM die LDH-Aktivität noch bei 81% (+/- 5%), waren es bei 5mM nur noch durchschnittlich 29%

(+/- 10%) (siehe Tabelle 11). Die erhobenen Daten bei 1mM ($p=0,03$) und 5mM ($p=0,001$) waren signifikant.

	Mittelwert	+/-
Kontrolle	80%	3%
0,1mM	81%	5%
0,5mM	55%	11%
1mM	47%	11%
5mM	29%	10%

Tabelle 11 LDH-Aktivität der Lysate an Tag 28 nach Inkubation mit Acetaminophen

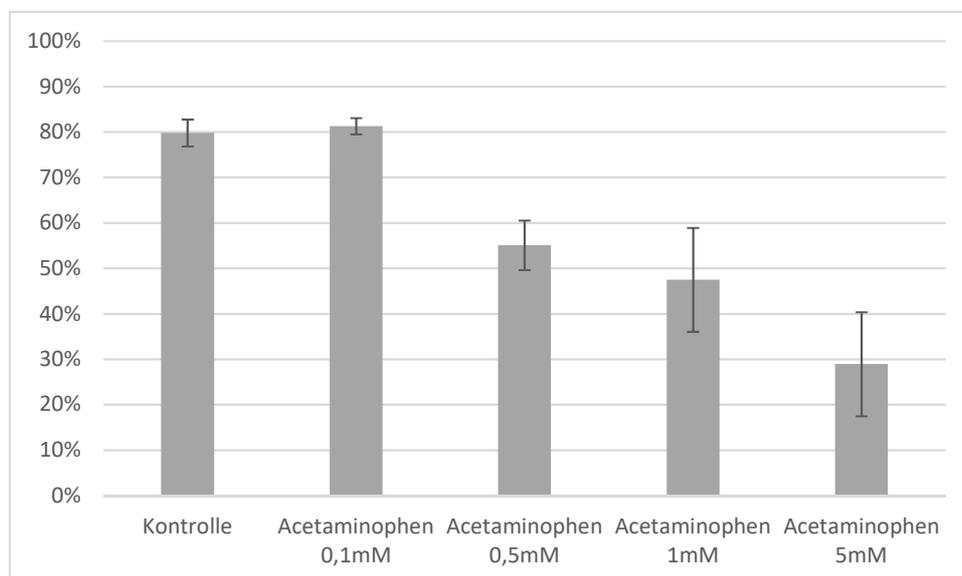


Abbildung 12 Acetaminophen - LDH-Aktivität der Lysate an Tag 28

Auch die Höhe der Caspase-Aktivitäten korrelierte positiv mit der verwendeten Medikamentenkonzentration (siehe Abb. 13). Ab einer Konzentration von 1mM konnte eine 13-fach (+/- 6) erhöhte Caspase-Aktivität gemessen werden (siehe Tabelle 12). Bei 5mM war die Aktivität sogar im Schnitt um das 65-fache (+/- 41) höher als die Kontrolle (siehe Tabelle 12), allerdings mit erheblichen interindividuellen Unterschieden.

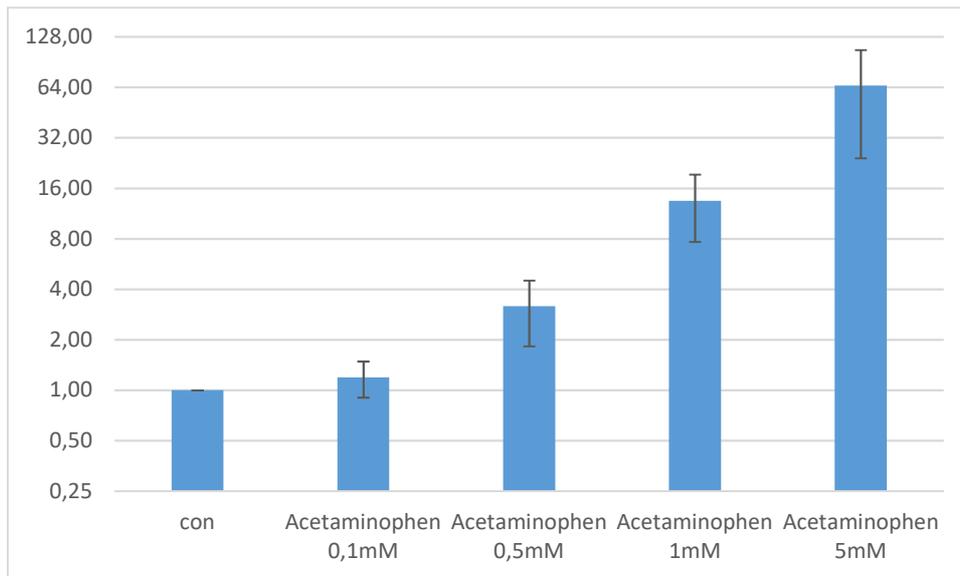


Abbildung 13 Acetaminophen - Durchschnittliche Caspase-Aktivität an Tag 28

	Mittelwert	+/-
Kontrolle	1	
0,1mM	1	0,3
0,5mM	3	1
1mM	13	6
5mM	65	41

Tabelle 12 Caspase-Aktivitäten an Tag 28 nach Inkubation mit Acetaminophen als x-faches der Kontrolle

Auch rein optisch mit dem Lichtmikroskop konnte man eine dosisabhängige, progrediente Schädigung der Sphäroide beobachten. Hier korrelierte der optische Schaden ebenfalls positiv mit der Inkubationszeit (siehe Abb. 14-16), vor allem bei den niedrigeren Konzentrationen 0,1mM und 0,5mM.

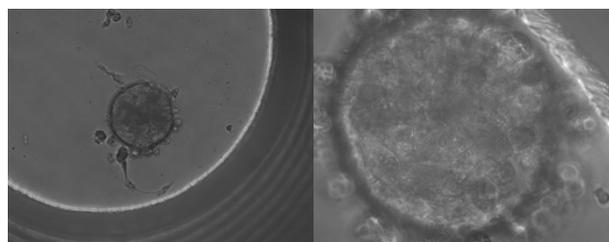


Abbildung 14 IGM unbehandelt

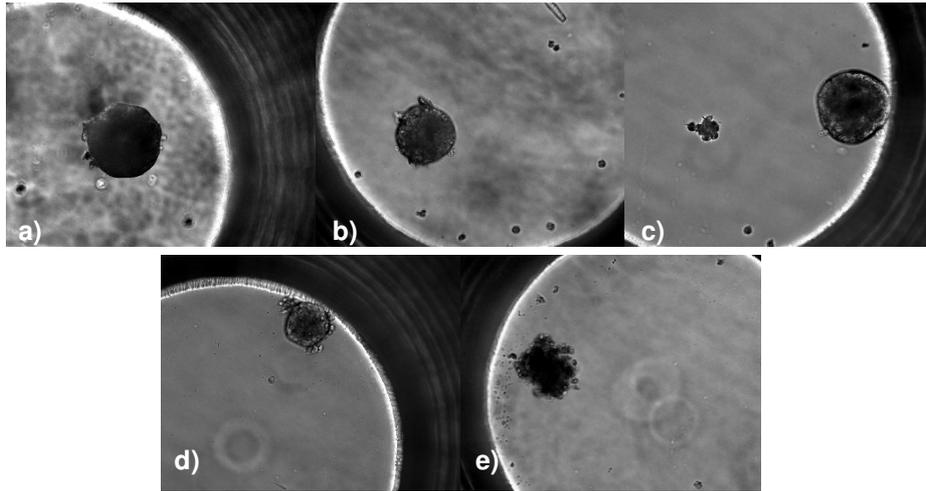


Abbildung 15 IGM Tag 10 a) Kontrolle b) APAP 0,1mM c) APAP 0,5mM d) APAP 1mM
e) APAP 5mM

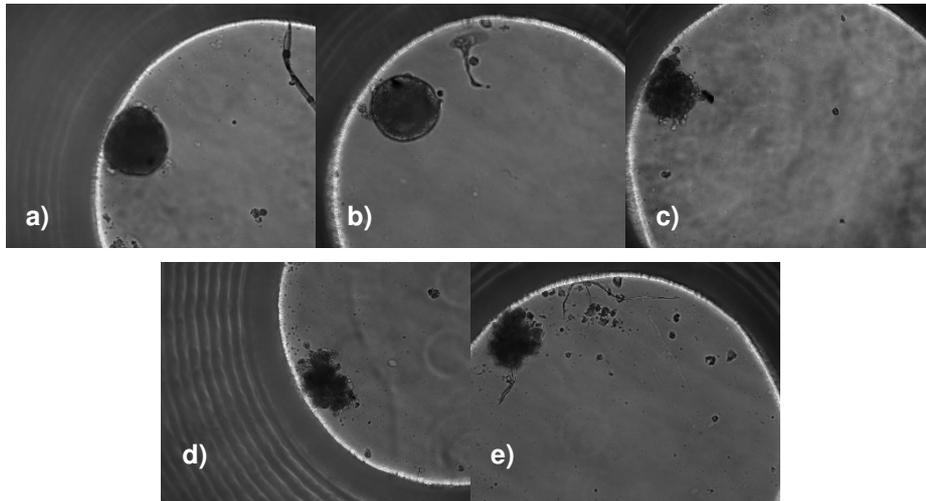


Abbildung 16 IGM Tag 21 a) Kontrolle b) APAP 0,1mM c) APAP 0,5mM d) APAP 1mM
e) APAP 5mM

3.1.2 Amiodaron

Amiodaron wirkt auf die Hepatozyten meist im Sinne einer kumulativen, erst im Verlauf auftretenden chronischen Toxizität (Harris et al., 1983). Allerdings kann es bei suprathérapeutischen Dosierungen zu einer Abnahme der Latenz und somit auch zu akut auftretenden Schädigungen kommen (Harris et al., 1983). In den durchgeführten LDH-Bestimmungen spiegeln sich diese Dosis- und Zeiteffekte wider. Es entstand bei der Auswertung der Daten folgendes Schädigungsmuster:

	Tag 4	Tag 14	Tag 21	Tag 28
Kontrolle	5%	8%	5%	7%
Tween20®	73%	22%		
5µM	4%	5%	6%	5%
10µM	6%	10%	10%	9%
50µM	54%	16%	4%	6%
100µM	84%	8%	1%	1%

Tabelle 13 Amiodaron – LDH-Release-Mittelwerte aller 6 Donoren in Prozent

Bei einer Konzentration von 5µM und 10µM bewegten sich die LDH-Release-Werte mit durchschnittlich 5% (+/- 0,4%) und 9% (+/- 1%) im Bereich der Basalaktivität der Kontrolle (siehe Tabelle 13). Lediglich zum Ende des Versuchs hin kam es zu einem leichten Anstieg der Parameter (siehe Tabelle 13).

Alle 6 Donoren verzeichneten bei einer Konzentration von 100µM sofort an Tag 4 einen fulminanten und hoch signifikanten ($p=4,34 \cdot 10^{-11}$) Anstieg der LDH-Release-Werte auf durchschnittlich 84% (+/- 2%) (siehe Tabelle 13). Selbst bei den Donoren QQE und EPB, bei denen die Lyse mit Tween20® nicht funktioniert hatte, wurden Werte von 80% und 80% gemessen. Entsprechend konnten an Tag 28 bei 4 von 6 Donoren keine verwertbaren Daten mehr erhoben werden, da vermutlich keine vitalen Zellen mehr vorhanden waren. Auch die Ergebnisse an Tag 21 waren nach Inkubation mit 100µM signifikant ($p=0,008$), ebenso wie die erhobenen Daten nach Inkubation mit 50µM an Tag 4 ($p=0,01$).

Die LDH-Aktivitäten der Lysate passten ebenfalls in das bisherige Bild (siehe Abb. 17). Bei den Konzentrationen 5µM und 10µM konnten noch LDH-Aktivitäten von 80% (+/- 2%) und 66% (+/- 7%) gemessen werden (siehe Tabelle 14). Die LDH-Aktivität der mit 50µM inkubierten Zellen lag noch bei 25% (+/- 9%) (siehe Tabelle 14). Bei einer Konzentration von 100µM wurde dann nur noch ein durchschnittlicher Wert von 7% (+/- 2%) gemessen (siehe Tabelle 14). Dies entsprach annähernd der Basalaktivität der Kontrolle respektive nur noch wenigen vitalen Zellen und den LDH-Release-Daten „below the limit of quantification“. Die Ergebnisse nach Inkubation mit 50µM ($p=0,0007$) und 100µM ($p=1,6 \cdot 10^{-7}$) waren hoch signifikant.

	Mittelwerte	+/-
Kontrolle	80%	3%
5 μ M	80%	2%
10 μ M	66%	7%
50 μ M	25%	9%
100 μ M	7%	2%

Tabelle 14 LDH-Aktivität der Lysate an Tag 28 nach Inkubation mit Amiodaron

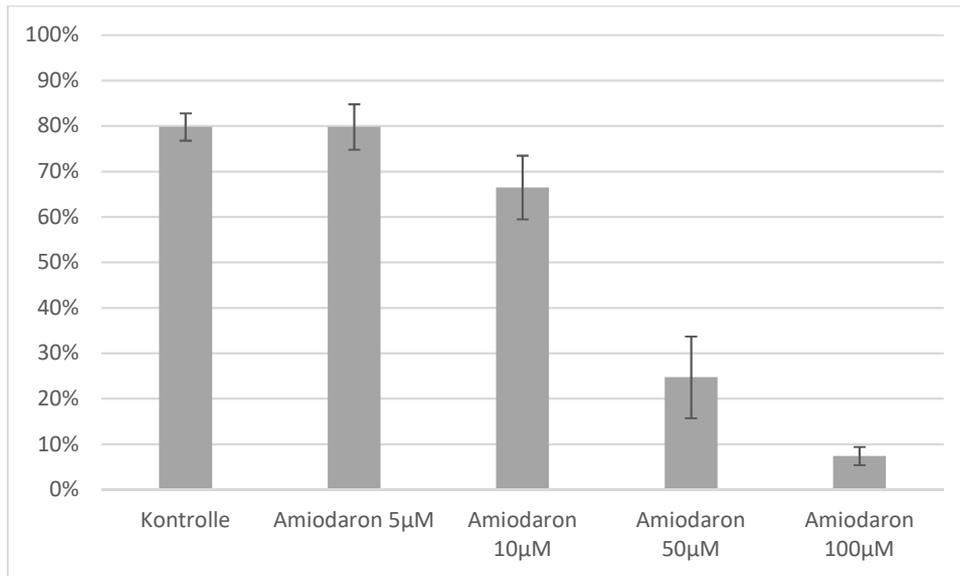


Abbildung 17 Amiodaron - LDH-Aktivität der Lysate an Tag 28

Die Caspase-Aktivität stieg ebenfalls ab einer Medikamentendosis von 50 μ M an und wies unter den Donoren eine einheitliche Struktur auf. Die Höhe der Aktivität zeigte auch hier bei allen Donoren eine positive Korrelation mit der eingesetzten Medikamentendosis (siehe Abb. 18, Tabelle 15).

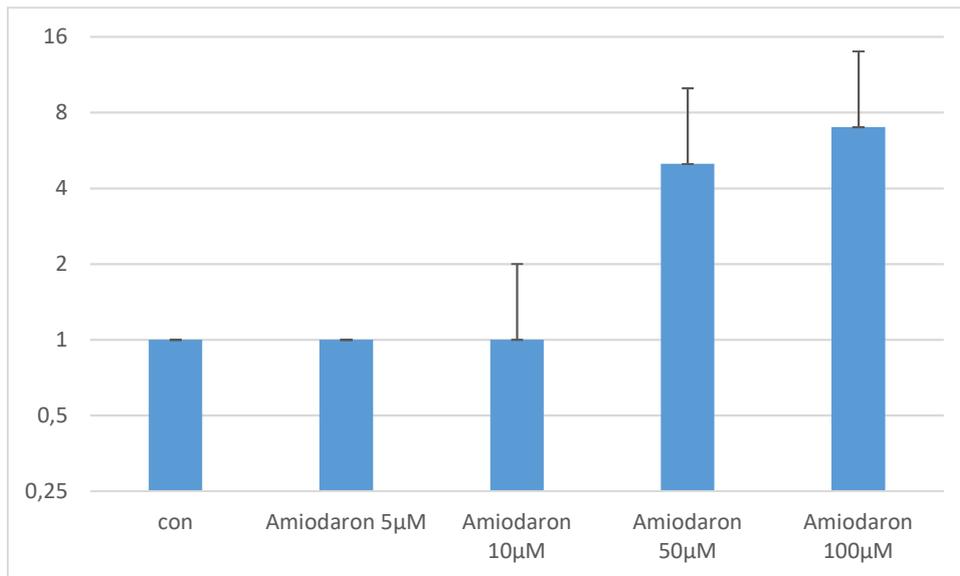


Abbildung 18 Amiodaron - Durchschnittliche Caspase-Aktivität an Tag 28

	Mittelwert	+/-
Kontrolle	1	
5µM	1	0
10µM	1	0,4
50µM	5	2
100µM	7	3

Tabelle 15 Caspase-Aktivitäten an Tag 28 nach Inkubation mit Amiodaron als x-faches der Kontrolle

Unter dem Lichtmikroskop sah man an Tag 10 und Tag 21 bei den Konzentrationen 5µM und 10µM nur am Rand eine Auflockerung des Sphäroids, mit einigen Einzelzellen an der Oberfläche. Bei den Konzentrationen 50µM und 100µM war vor allem an Tag 21 kein intakter Sphäroid mehr vorhanden. Man konnte sehr viele Einzelzellen erkennen, die vor allem an Tag 21 bei 100µM auf das gesamte Well verteilt waren (siehe Abb. 19-21). Optisch waren die mit Amiodaron behandelten Zellen vor allem bei den hohen Konzentrationen immer als erstes angeschlagen. Allerdings hielten die Zellen diesen Zustand relativ konstant bis zum Ende des Versuchs ohne Progredienz bei.

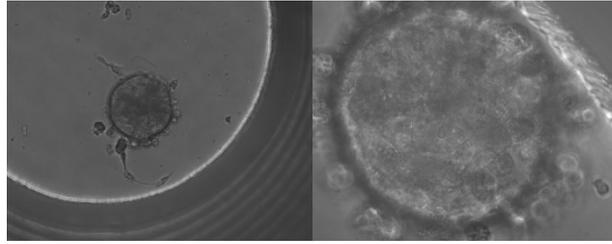


Abbildung 19 IGM unbehandelt

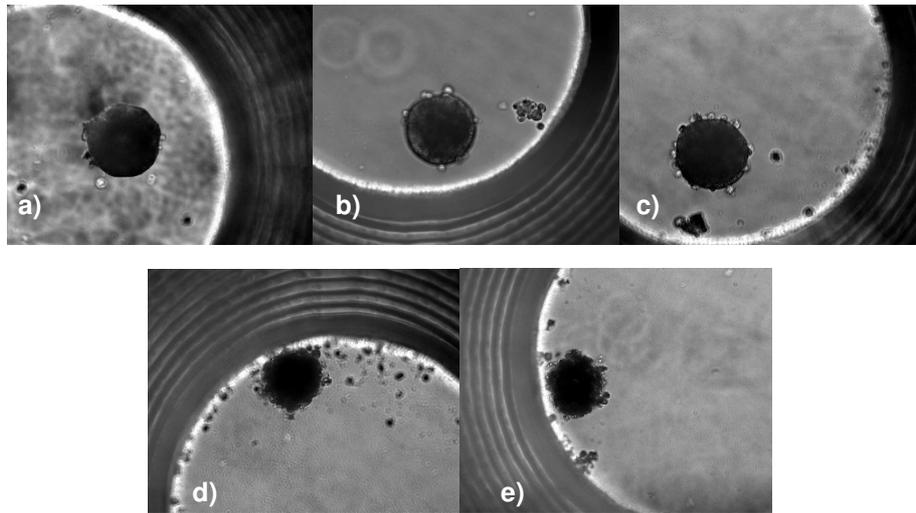


Abbildung 20 IGM Tag 10 a) Kontrolle b) Amiodaron 5 μ M c) Amiodaron 10 μ M d) Amiodaron 50 μ M e) Amiodaron 100 μ M

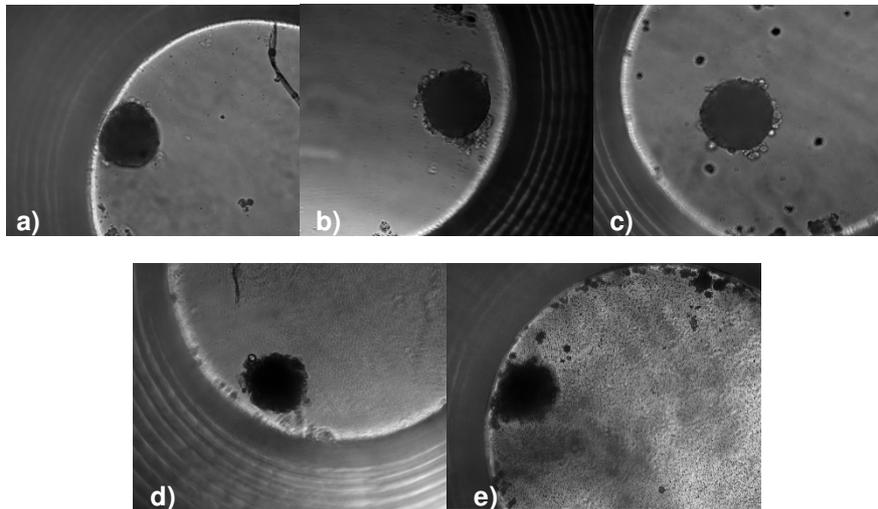


Abbildung 21 IGM Tag 21 a) Kontrolle b) Amiodaron 5 μ M c) Amiodaron 10 μ M d) Amiodaron 50 μ M e) Amiodaron 100 μ M

3.1.3 Diclofenac

Diclofenac kann akut aber auch erst im Verlauf hepatotoxisch wirken und verfügt über eine überwiegend, wenn auch nicht ausschließliche, intrinsische Toxizität (Boelsterli, 2003). Die positive Korrelation zwischen der Medikamentenkonzentration und dem LDH-Release zeigte sich bei allen Donoren. Es ergab sich folgendes Schädigungsmuster:

	Tag 4	Tag 14	Tag 21	Tag 28
Kontrolle	5%	8%	5%	7%
Tween20®	73%	22%		
5µM	5%	13%	5%	13%
10µM	6%	17%	11%	10%
50µM	8%	42%	14%	4%
100µM	17%	34%	7%	5%

Tabelle 16 Diclofenac – LDH-Release-Mittelwerte aller 6 Donoren in Prozent

Bei einer Konzentration von 5µM und 10µM schien vor allem die Zeit der Behandlung im Sinne eines chronischen Geschehens ausschlaggebend für eine Schädigung zu sein. Erst an Tag 14 konnten erhöhte Parameter gemessen werden (siehe Tabelle 16). Bei 5µM stiegen diese an Tag 28 erneut auf durchschnittlich 13% (+/- 4%) an (siehe Tabelle 16). Verglichen mit der Kontrolle, konnten die Schäden bei den therapeutischen Dosen allerdings hier als eher gering eingestuft werden.

Medikamentenkonzentrationen von 50µM und 100µM führten im Sinne eines dosisabhängigen Schadens bei allen Donoren zu einem relevanten Anstieg des LDH-Release mit einer Latenz von durchschnittlich 14 Tagen (siehe Tabelle 16). Diese Latenz nahm bei ansteigender Medikamentendosis ab. So konnten bei einer Medikamentenkonzentration von 50µM an Tag 14 ($p=0,0002$) und Tag 21 ($p=0,008$) signifikante Daten erhoben werden. Bei einer Konzentration von 100µM war bereits an Tag 4 eine signifikante ($p=0,007$) Schädigung mit einem LDH-Release von 17% (+/- 3%) erkennbar (siehe Tabelle 16), welche auch an Tag 14 noch signifikant war ($p=0,002$). In keinem anderen Zellmodell konnten bisher akute Schäden bereits bei einer Dosis von 100µM gemessen werden (Boelsterli, 2003).

Die an Tag 28 aus den Lysaten gemessenen LDH-Aktivitäten passten ebenfalls zu den bisherigen Befunden und lieferten bei den Medikamentenkonzentrationen 50µM ($p=0,0005$) und 100µM ($p=0,004$) signifikante Ergebnisse. Je höher die

Medikamentendosis war, umso weniger LDH-Aktivität war im Lysat noch vorhanden respektive umso weniger Viabilität besaßen die Zellen an Tag 28 noch (siehe Tabelle 17, Abb. 22).

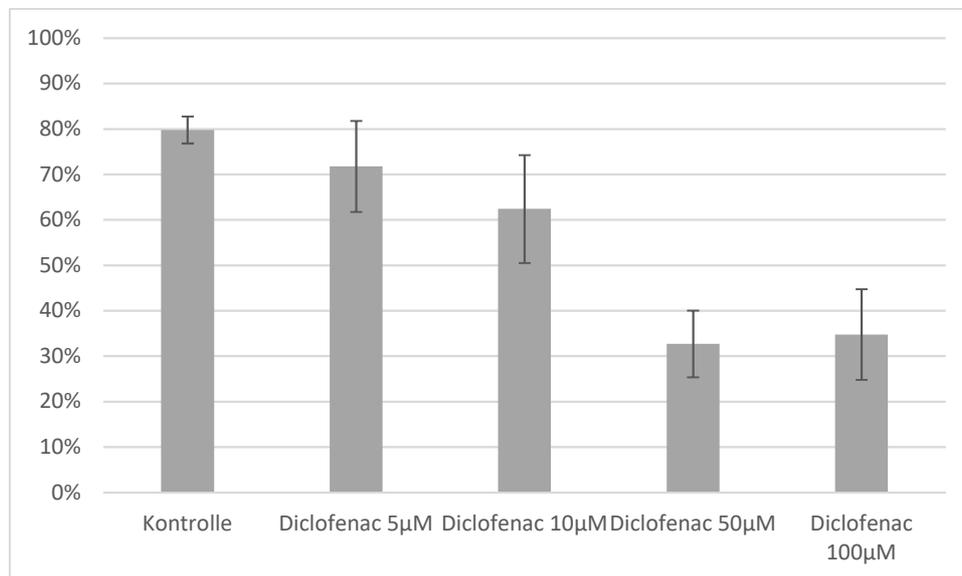


Abbildung 22 Diclofenac - LDH-Aktivität der Lysate an Tag 28

	Mittelwerte	+/-
Kontrolle	80%	3%
5µM	72%	10%
10µM	62%	12%
50µM	33%	7%
100µM	35%	10%

Tabelle 17 LDH-Aktivität der Lysate an Tag 28 nach Inkubation mit Diclofenac

Passend zu den übrigen Befunden, führten nur die beiden höchsten Konzentrationen zu einer Erhöhung der Caspase-Aktivität auf durchschnittlich maximal das 10-fache (+/- 4) der Kontrolle (siehe Abb. 23, Tabelle 18). Auch hier lag eine positive Korrelation zwischen der Höhe der Caspase-Aktivität und der eingesetzten Medikamentendosis vor (siehe Abb. 23, Tabelle 18).

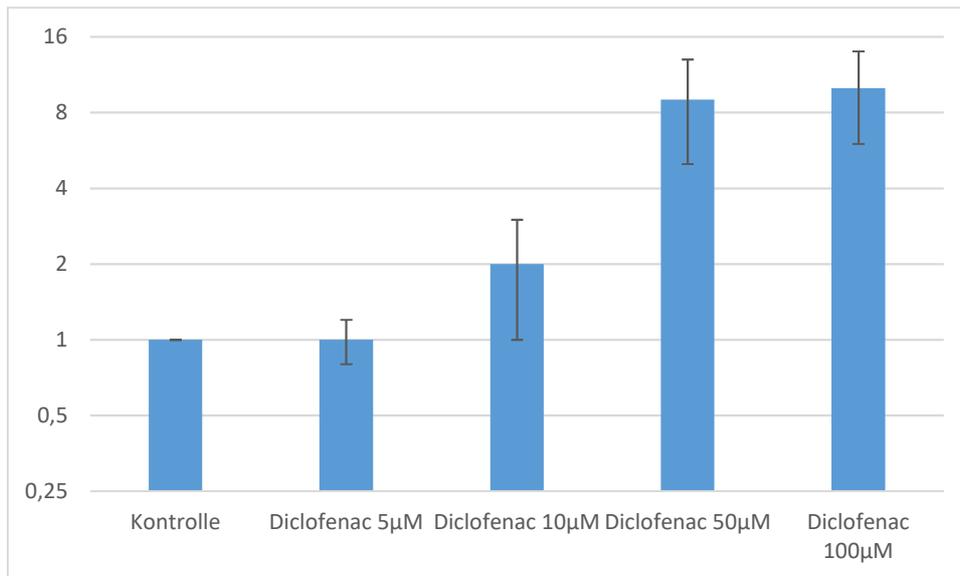


Abbildung 23 Diclofenac - Durchschnittliche Caspase-Aktivität an Tag 28

	Mittelwert	+/-
Kontrolle	1	
5µM	1	0,2
10µM	2	1
50µM	9	4
100µM	10	4

Tabelle 18 Caspase-Aktivitäten an Tag 28 nach der Inkubation mit Diclofenac als x-faches der Kontrolle

Lichtmikroskopisch konnte man auch bei den mit Diclofenac inkubierten Sphäroiden die positive Korrelation zwischen Schädigungsgrad und Medikamentenkonzentration mit einer Latenz von durchschnittlich 14 Tagen beobachten (siehe Abb. 24-26).

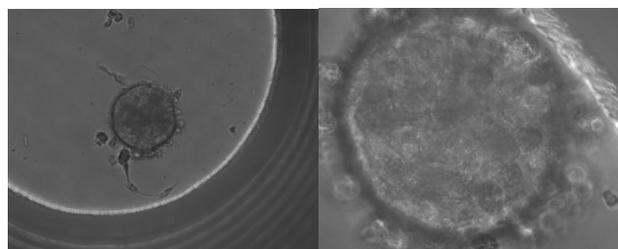


Abbildung 24 IGM unbehandelt

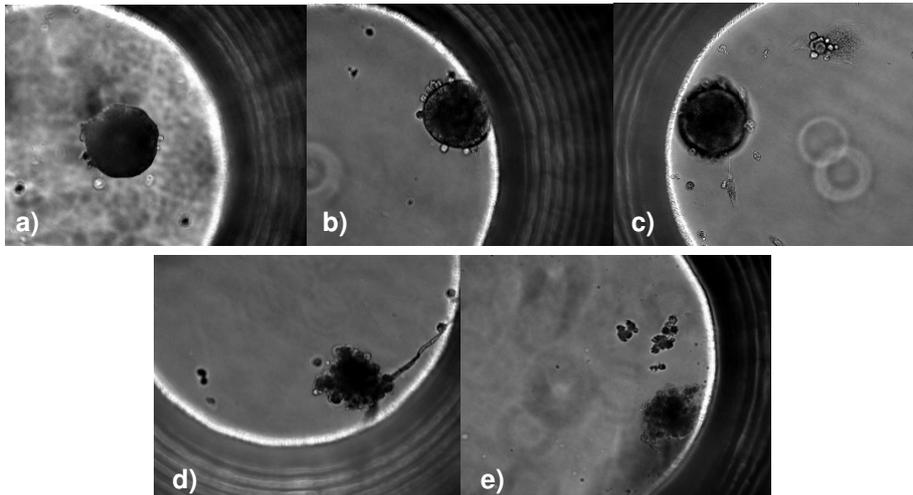


Abbildung 25 IGM Tag 10 a) Kontrolle b) Diclofenac 5µM c) Diclofenac 10µM d) Diclofenac 50µM e) Diclofenac 100µM

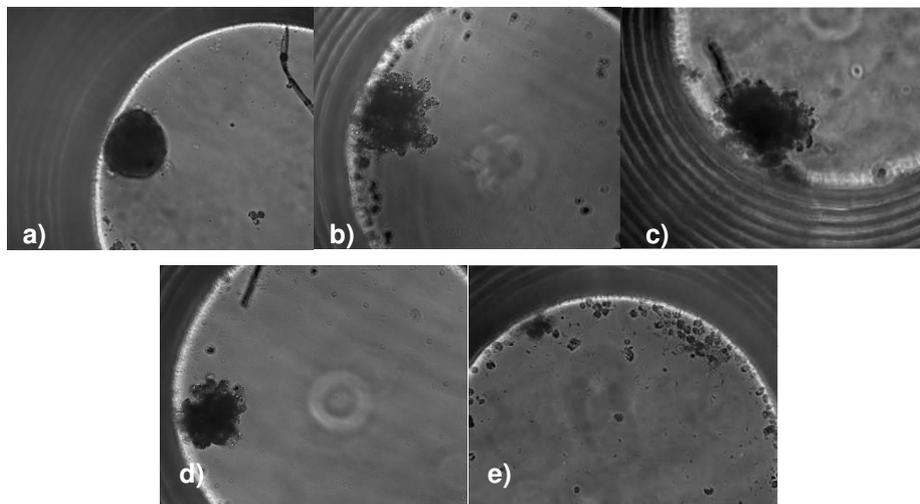


Abbildung 26 IGM Tag 21 a) Kontrolle b) Diclofenac 5µM c) Diclofenac 10µM d) Diclofenac 50µM e) Diclofenac 100µM

3.1.4 Isoniazid

Werden Zellen mit Isoniazid behandelt, sind die pathologischen Effekte überwiegend idiosynkratischer und weniger intrinsischer Genese (Hassan et al., 2015; K. Liu et al., 2014; Metushi et al., 2014; Perwitasari et al., 2015).

Bei den Versuchen an diesem Zellsystem fiel auf, dass selbst bei sehr hohen Konzentrationen von 200µM der maximale LDH-Release nur bei 9% (+/- 1%) lag (siehe Tabelle 19). Die Spitzen der LDH-Release-Werte wurden bei allen Konzentrationen an Tag 4 oder Tag 14 gemessen, mit einer Abnahme der Latenz bei ansteigender Medikamentenkonzentration (siehe Tabelle 19). Lediglich an Tag 14, bei einer Konzentration von 10µM ($p=0,04$), konnte ein signifikanter Unterschied zur Kontrolle

gemessen werden. Es fiel eine positive Korrelation zwischen der Medikamentenkonzentration und der Höhe des LDH-Release auf (siehe Tabelle 19). Hierbei zeigten alle 6 Donoren in etwa dasselbe Verhaltensmuster:

	Tag 4	Tag 14	Tag 21	Tag 28
Kontrolle	5%	8%	5%	7%
Tween20®	73%	22%		
10µM	5%	4%	3%	5%
50µM	6%	6%	3%	5%
100µM	5%	6%	3%	3%
200µM	9%	8%	5%	3%

Tabelle 19 Isoniazid – LDH-Release-Mittelwerte aller 6 Donoren in Prozent

Auch die LDH-Aktivitäten der Lysate an Tag 28 spiegelten die bis zu diesem Zeitpunkt geringe Schädigung der Sphäroide wider, ohne signifikante Anstiege des LDH-Release gegenüber der Kontrolle. Es konnten bei allen Donoren entsprechend hohe LDH-Aktivitäten gemessen werden (siehe Tabelle 20, Abb. 27).

	Mittelwert	+/-
Kontrolle	80%	3%
10µM	85%	2%
50µM	80%	1%
100µM	83%	2%
200µM	74%	2%

Tabelle 20 LDH-Aktivität der Lysate an Tag 28 nach Inkubation mit Isoniazid

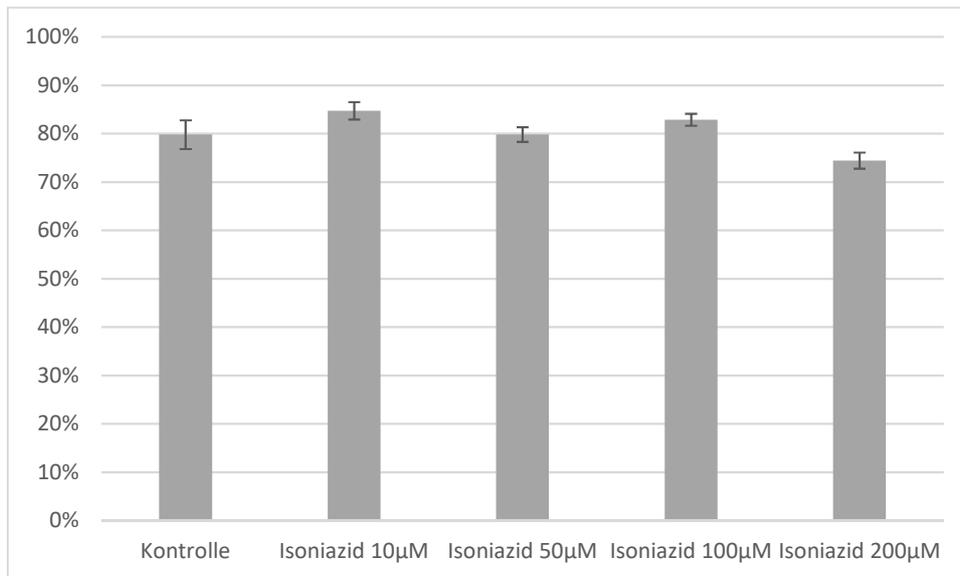


Abbildung 27 Isoniazid - LDH-Aktivität der Lysate an Tag 28

Isoniazid führte zu einer vernachlässigbar geringen Induktion der Caspasen in den Sphäroiden (siehe Abb. 28). Die zu den restlichen Befunden passende maximale Durchschnittsaktivität wurde bei einer Konzentration von 200µM gemessen und lag beim 1,4-fachen (+/- 0,2) der Kontrolle (siehe Tabelle 21).

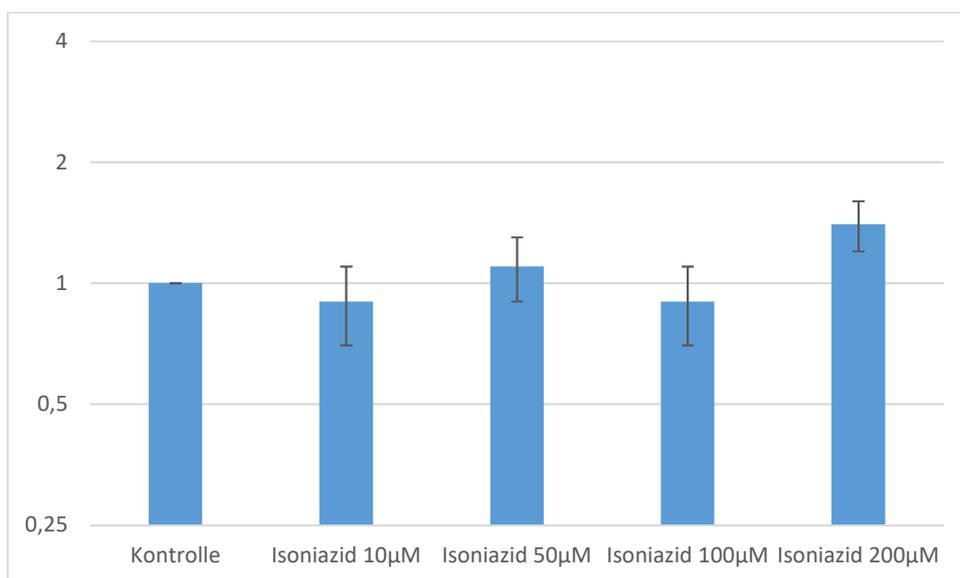


Abbildung 28 Isoniazid - Durchschnittliche Caspase-Aktivität an Tag 28

	Mittelwert	+/-
Kontrolle	1,00	
10 μ M	0,9	0,2
50 μ M	1,1	0,2
100 μ M	0,9	0,2
200 μ M	1,4	0,2

Tabelle 21 Caspase-Aktivitäten an Tag 28 nach der Inkubation mit Isoniazid als x-faches der Kontrolle

Unter dem Lichtmikroskop konnte man bis zu Tag 21 keine wesentlichen Schäden an den Sphäroiden erkennen (siehe Abb. 29-31).

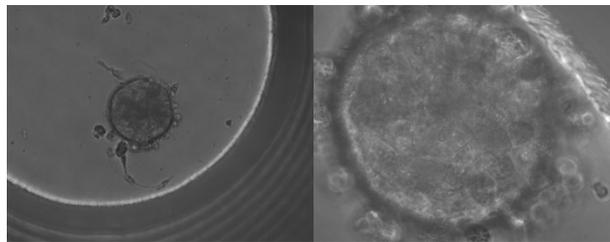


Abbildung 29 IGM unbehandelt

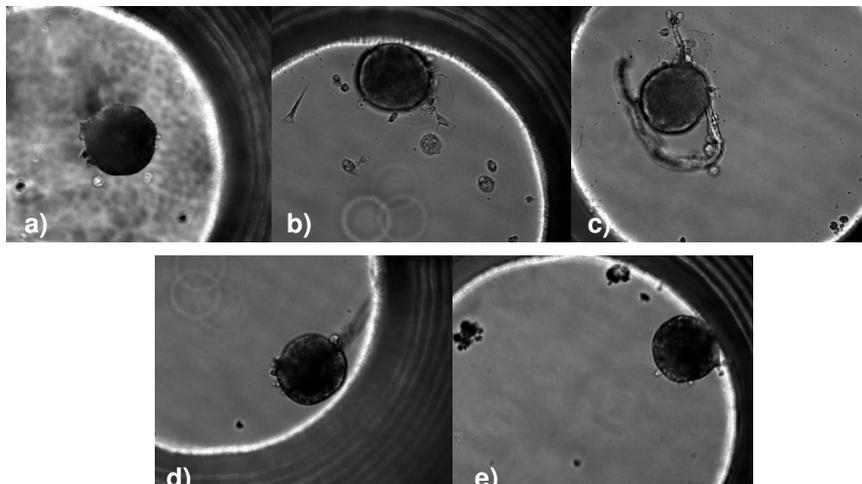


Abbildung 30 IGM Tag 10 a) Kontrolle b) Isoniazid 10 μ M c) Isoniazid 50 μ M d) Isoniazid 100 μ M e) Isoniazid 200 μ M

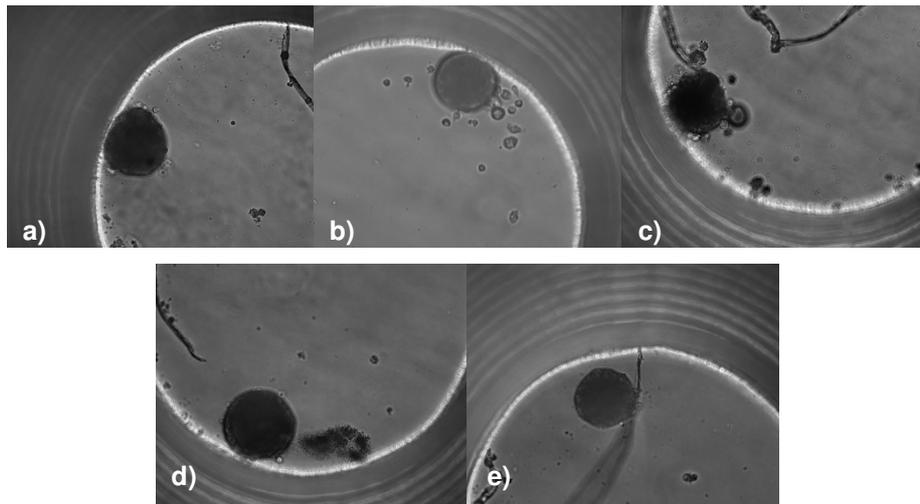


Abbildung 31 IGM Tag 21 a) Kontrolle b) Isoniazid 10µM c) Isoniazid 50µM d) Isoniazid 100µM
e) Isoniazid 200µM

3.1.5 Ximelagatran

Ximelagatran wirkt überwiegend im Sinne eines Antigens auf den menschlichen Körper und führt so vermutlich HLA-abhängig zu einer immunologischen Reaktion im Sinne einer idiosynkratischen Hepatotoxizität (W. M. Lee et al., 2005; Yip et al., 2015). Es wiesen im Mittel alle 6 Donoren folgendes Reaktionsmuster auf:

	Tag 4	Tag 14	Tag 21	Tag 28
Kontrolle	5%	8%	5%	7%
Tween20®	73%	22%		
1µM	5%	4%	4%	11%
5µM	5%	6%	6%	4%
10µM	4%	4%	3%	12%
50µM	12%	25%	6%	6%

Tabelle 22 Ximelagatran – LDH-Release-Mittelwerte aller 6 Donoren in Prozent

Auch bei hohen Medikamentenkonzentrationen konnte nur ein geringer Anstieg der LDH-Release-Daten gemessen respektive ein geringer Schaden der Sphäroide vermutet werden, welcher bei allen Medikamentenkonzentrationen, bis auf 5µM, an Tag 14 signifikant erhöht war (1µM: $p=0,04$; 10µM: $p=0,03$; 50µM: $p=0,005$) (siehe Tabelle 22). Es konnte lediglich ein minimaler Zeit- und Kumulationseffekt beobachtet werden. Dies zeigte sich im Anstieg der LDH-Release-Werte an Tag 28 bei den

Konzentrationen 1 μ M und 10 μ M (siehe Tabelle 22). Die Latenz bis zu einer messbaren Schädigung nahm mit ansteigender Medikamentenkonzentration ab. Bei 50 μ M konnten bereits an Tag 4 mit einem LDH-Release von 12% (+/- 3%) erhöhte Parameter gemessen werden (siehe Tabelle 22). Allerdings stiegen die LDH-Release-Werte selbst bei dieser Konzentration im Schnitt nur auf höchstens 25% (+/- 4%) an Tag 14 an (siehe Tabelle 22).

Dazu entsprechend konnte in den Lysaten an Tag 28 noch viel LDH-Aktivität gemessen werden. Die Werte näherten sich bei den Konzentrationen von 1 μ M, 5 μ M und 10 μ M, im Sinne des geringen Schadens, den Werten der Kontroll-Sphäroide an (siehe Tabelle 23, Abb. 32). Lediglich eine Konzentration von 50 μ M schien die Zellen signifikant geschädigt zu haben ($p=0,03$). Hier wurde nur noch eine LDH-Aktivität von 55% (+/- 7%) gemessen (siehe Tabelle 23). Im Vergleich zu den LDH-Aktivitäten der Lysate nach Inkubation mit Acetaminophen oder Amiodaron konnte dieser Schaden jedoch noch immer als eher gering eingeschätzt werden.

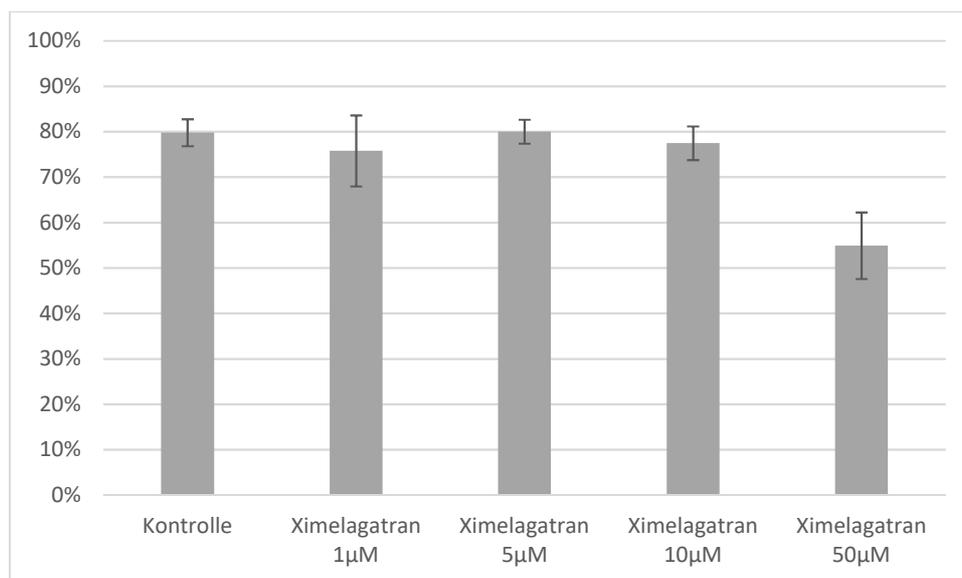


Abbildung 32 Ximelagatran - LDH-Aktivität der Lysate an Tag 28

	Mittelwert	+/-
Kontrolle	80%	3%
1 μ M	76%	8%
5 μ M	80%	3%
10 μ M	77%	4%
50 μ M	55%	7%

Tabelle 23 LDH-Aktivität der Lysate an Tag 28 nach Inkubation mit Ximelagatran

Die Induktion der Caspasen in den mit Ximelagatran behandelten Zellen war entsprechend vernachlässigbar gering (siehe Abb. 33).

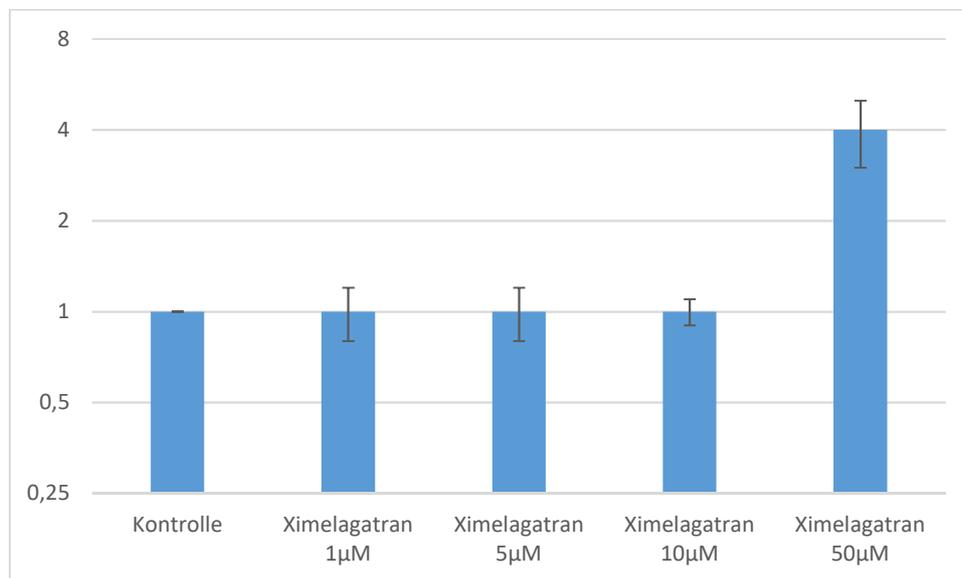


Abbildung 33 Ximelagatran - Durchschnittliche Caspase-Aktivität an Tag 28

Auch hier kam es erst bei einer Konzentration von 50µM zu einer relevant erhöhten Caspase-Aktivität auf das durchschnittlich lediglich 4-fache (+/- 1) der Kontrolle (siehe Tabelle 24).

	Mittelwert	+/-
Kontrolle	1	
1µM	1	0,2
5µM	1	0,2
10µM	1	0,1
50µM	4	1

Tabelle 24 Caspase-Aktivitäten an Tag 28 nach der Inkubation mit Ximelagatran als x-faches der Kontrolle

Unter dem Lichtmikroskop schienen an Tag 10 die Sphäroide der beiden höchsten Konzentrationen am Rand weniger dicht zu sein. Auch an Tag 21 schien bei ansteigender Medikamentenkonzentration die Zelldichte weiter abzunehmen. Der Sphäroid bei 50µM war zu diesem Zeitpunkt bereits lysiert (siehe Abb. 34-36).

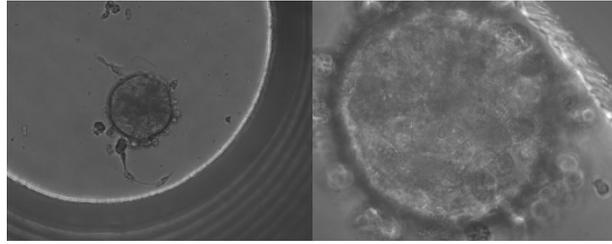


Abbildung 34 IGM unbehandelt

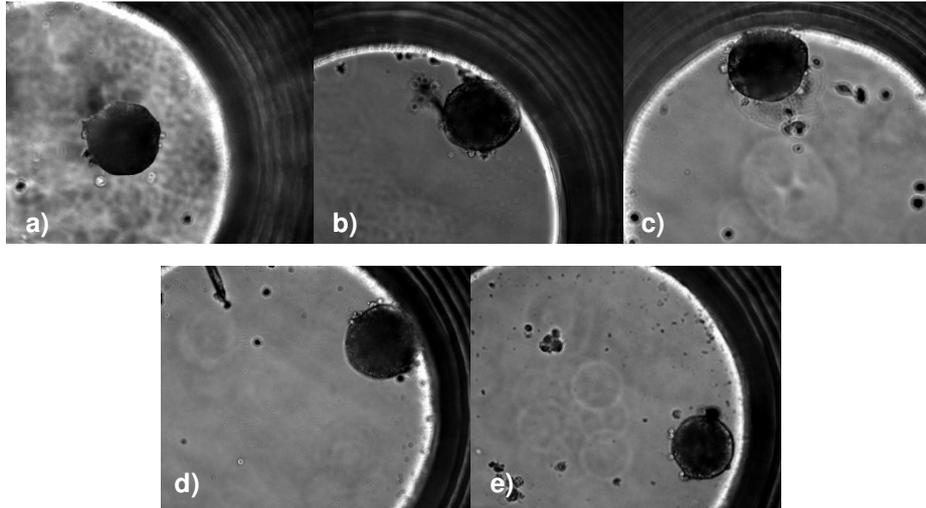


Abbildung 35 IGM Tag 10 a) Kontrolle b) Ximelagatran 1 μ M c) Ximelagatran 5 μ M
d) Ximelagatran 10 μ M e) Ximelagatran 50 μ M

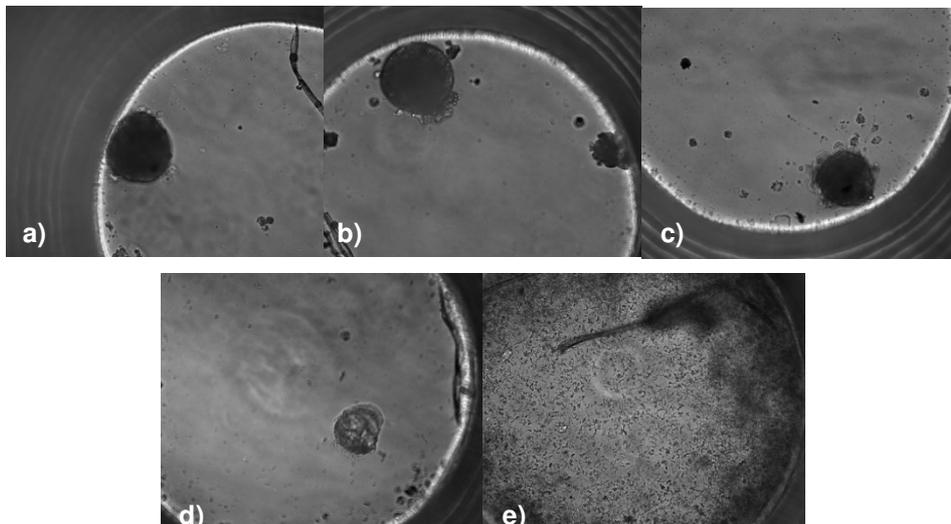


Abbildung 36 IGM Tag 21 a) Kontrolle b) Ximelagatran 1 μ M c) Ximelagatran 5 μ M
d) Ximelagatran 10 μ M e) Ximelagatran 50 μ M

3.2 Darstellung interindividueller Unterschiede

Der Übergang zwischen dosisabhängiger, intrinsischer und idiosynkratischer Hepatotoxizität ist fließend (siehe Abb. 37). Acetaminophen ist der bekannteste und wichtigste Vertreter dosisabhängiger Hepatotoxizität (H. Jaeschke, 2015). Eine gewisse Dosisabhängigkeit existiert allerdings auch bei Amiodaron und Diclofenac (Boelsterli, 2003; Harris et al., 1983), wobei für diese beiden ebenfalls eine gewisse Idiosynkrasie bekannt ist. Keine Dosisabhängigkeit ist jedoch für eine Hepatotoxizität nach Behandlung mit Isoniazid oder Ximelagatran bekannt (Hassan et al., 2015; W. M. Lee et al., 2005), welche idiosynkratische Hepatotoxizität aufweisen.

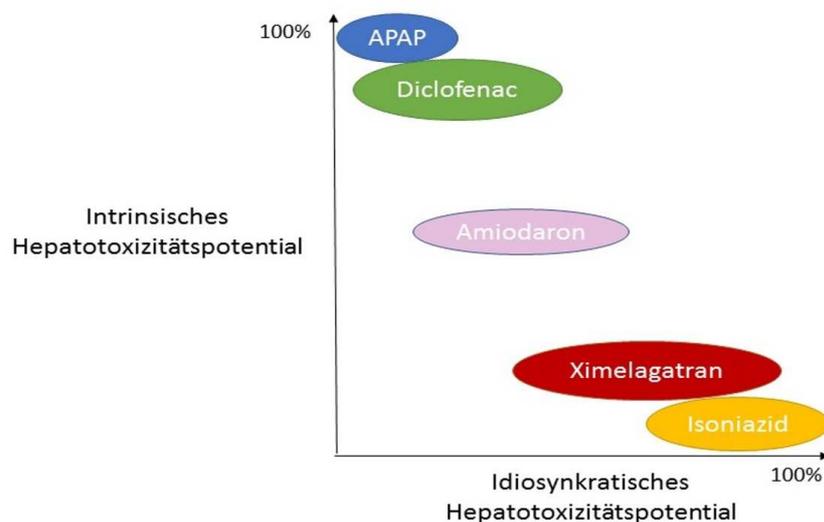


Abbildung 37 Der Anteil von idiosynkratischem und intrinsischem Hepatotoxizitätspotential an den verwendeten Medikamenten

Um zu untersuchen, ob sich interindividuelle Unterschiede zwischen den Donoren bei der Reaktion auf die Medikamente darstellen lassen, wurden die Medikamente entsprechend in 2 Gruppen unterteilt. Acetaminophen, Amiodaron und Diclofenac auf der einen und Ximelagatran und Isoniazid auf der anderen Seite. Es wurden die erhobenen Daten und die einzelnen Donoren bezüglich ihrer individuellen Eigenschaften hin untersucht und gegenübergestellt. Anhand der von InSphero® bereitgestellten Informationen über die Donoren wurden einige Auffälligkeiten und tendenziell protektive oder schädigende Faktoren herausgearbeitet, soweit dies bei der begrenzten Donor-Anzahl möglich war.

3.2.1 Acetaminophen, Amiodaron und Diclofenac

In dieser Gruppe konnte man deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Donoren ausmachen. Erkennbar war dies unter anderem bereits bei den Berechnungen an den sehr großen Intervallen der Standardabweichung.

Die Donoren EPB und QQE wichen am wenigsten von dem jeweils erstellten medikamentenspezifischen Schädigungsmuster (siehe 3.1) ab. Interessant waren vor allem die Donoren SSR, IZT und IGM. SSR und IZT schienen gegenüber den eingesetzten Medikamenten sehr resistent zu sein. IGM wurde hingegen, außer bei Amiodaron, durchgehend am stärksten geschädigt. Waren nach Inkubation mit 1mM Acetaminophen bei IGM nur noch 19% LDH in den Lysaten vorhanden, so waren dies bei SSR noch 78% und bei IZT 80% (siehe Tabelle 25).

	0,1mM	0,5mM	1mM	5mM
IGM	59%	21%	19%	24%
SSR	92%	84%	78%	68%
IZT	93%	82%	80%	14%

Tabelle 25 LDH-Aktivität der Lysate an Tag 28 nach Inkubation mit Acetaminophen

Ein entsprechendes Bild lieferten auch die LDH-Messdaten in den Überständen (siehe Abb. 38). Erst 5mM waren auch für IZT toxisch, wohingegen immer noch mehr als die Hälfte an LDH in den SSR-Zellen vorhanden war (siehe Tabelle 25).

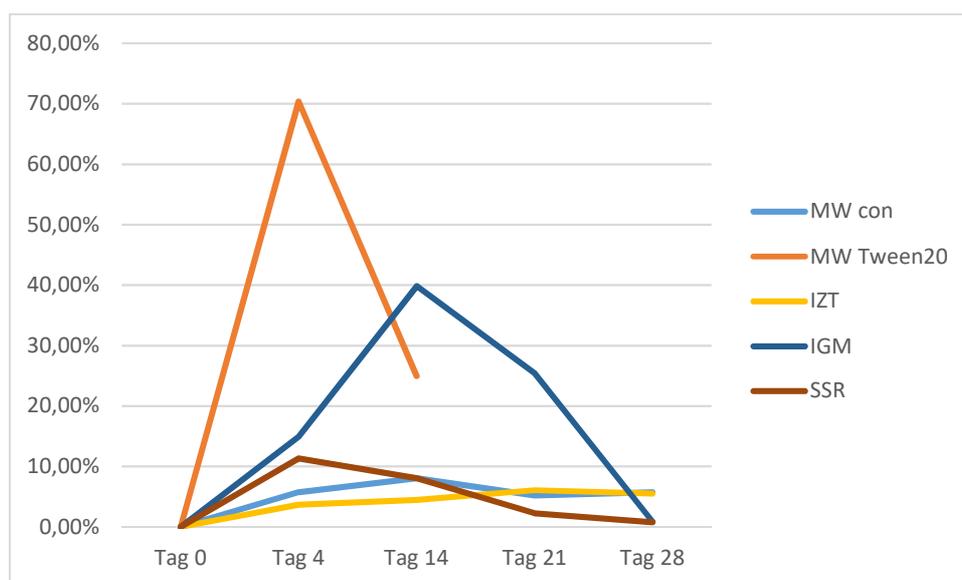


Abbildung 38 Acetaminophen 1mM - LDH-Release im Verlauf

Nach Inkubation mit Diclofenac waren die interindividuellen Unterschiede bei den niedrigen Dosen am stärksten ausgeprägt. 10µM führten bei SSR an Tag 14 beispielsweise nur zu einem LDH-Release von 2%, welcher bei IGM bereits bei 46% lag (siehe Abb. 39).

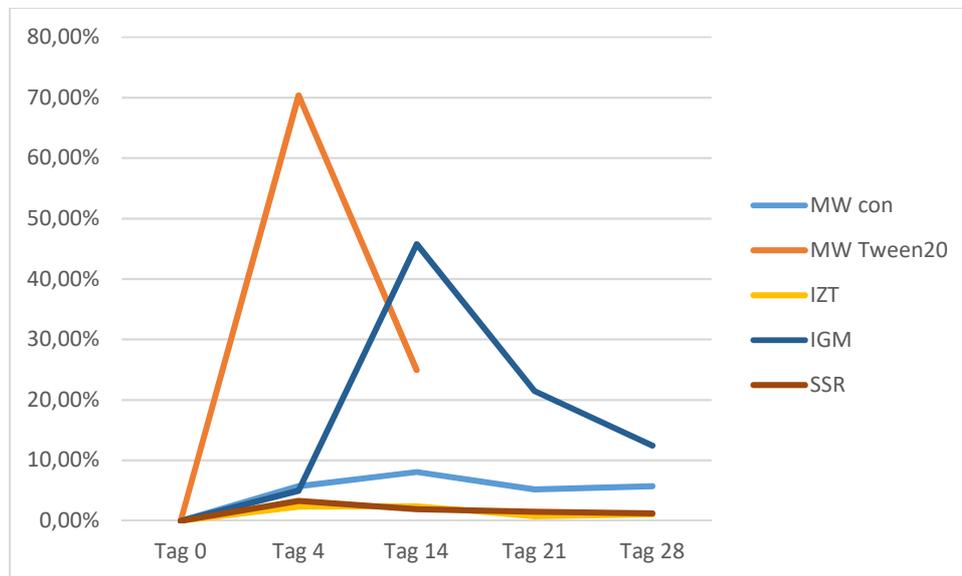


Abbildung 39 Diclofenac 10µM - LDH-Release im Verlauf

Die LDH-Aktivitäten der Lysate passten ebenfalls ins Bild. Bei 10µM war bei SSR und IZT noch annähernd alles an LDH vorhanden, bei IGM nur noch 15% (siehe Tabelle 26).

	10µM
IGM	15%
SSR	92%
IZT	93%

Tabelle 26 LDH-Aktivität der Lysate an Tag 28 nach Inkubation mit Diclofenac

Auch bei der Inkubation mit Amiodaron zeigten IZT und SSR bei 5µM, 10µM und teilweise auch noch 50µM im Vergleich zu den anderen Donoren deutlich weniger LDH-Release in den Überständen an den 4 Messtagen (siehe Abb. 40) und mehr LDH-Aktivität in den Lysaten an Tag 28 (siehe Tabelle 27). IGM hob sich allerdings nicht signifikant von den anderen Donoren ab.

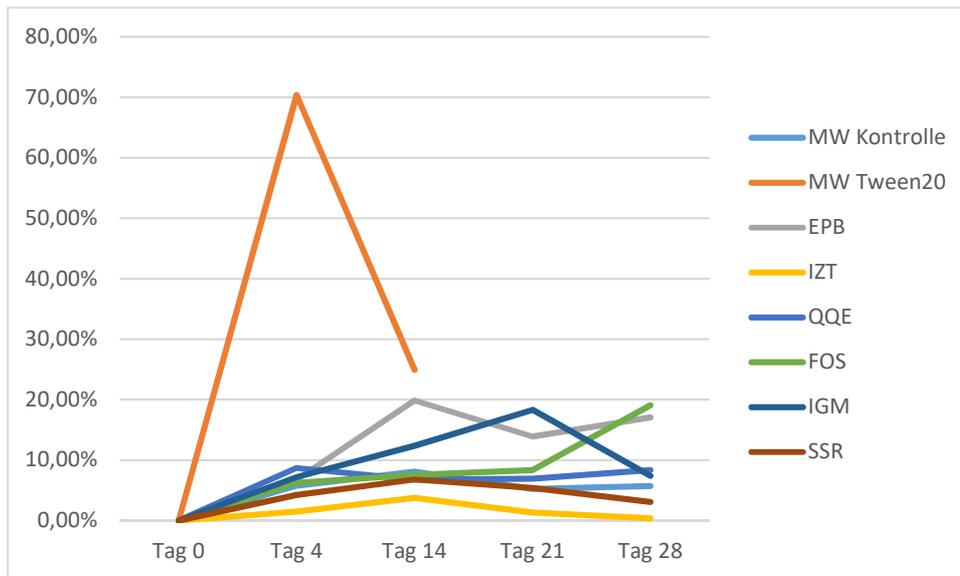


Abbildung 40 Amiodaron 10µM - LDH-Release im Verlauf

	5µM	10µM	50µM	100µM
SSR	88%	81%	15%	16%
IZT	93%	93%	67%	7%
IGM	82%	55%	7%	6%
FOS	82%	59%	5%	6%
EPB	79%	42%	13%	4%
QQE	54%	69%	42%	6%

Tabelle 27 LDH-Aktivität der Lysate an Tag 28 nach Inkubation mit Amiodaron

Zudem fiel auf, dass die Donoren des ersten Versuchs (EPB, IZT und QQE) bei einer Konzentration von 50µM Amiodaron viel weniger LDH-Release zeigten als die Donoren des zweiten Versuchs (FOS, IGM, SSR) (siehe Tabelle 28, Abb. 41). Eine Erklärung hierfür ist, dass Amiodaron sehr schwer löslich ist und deshalb vermutlich in der verwendeten Inkubationslösung beim ersten Versuch weniger konzentriert vorlag als angenommen.

	Tag 4	Tag 14	Tag 21	Tag 28
Versuch I	16% +/- 13%	25% +/- 15%	9% +/- 2%	9% +/- 10%
Versuch II	80% +/- 15%	10% +/- 10%	1% +/- 1%	0% +/- 0%

Tabelle 28 LDH-Release-Mittelwerte der 2 Versuche im Vergleich nach Inkubation mit 50µM Amiodaron

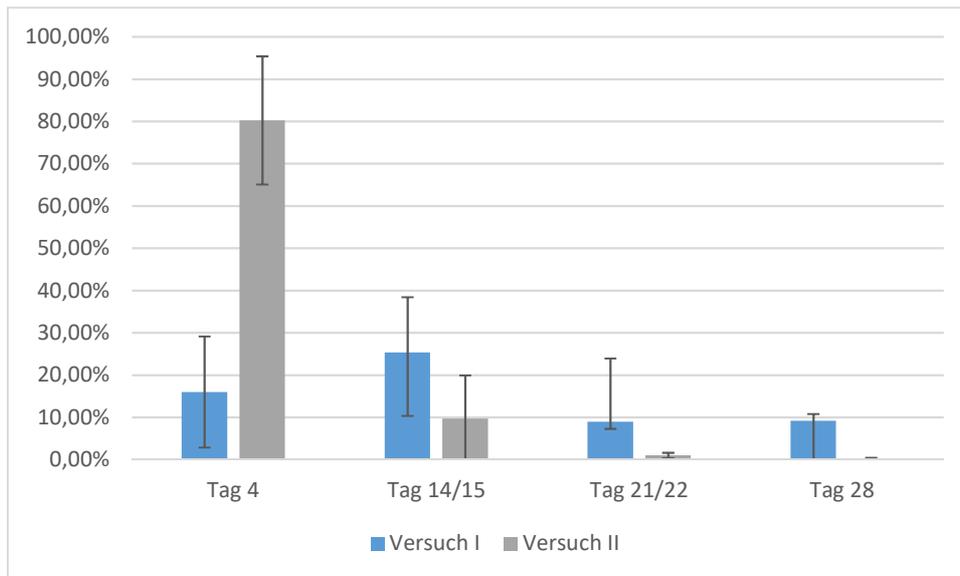


Abbildung 41 Amiodaron 50µM - LDH-Release der 2 Versuche im Vergleich nach Inkubation mit Amiodaron 50µM

Donor FOS zeigte bei allen 3 Medikamenten eine längere Latenz bis zu einer Reaktion. Entsprechend konnten progredient erhöhte LDH-Release-Werte bis zu Tag 21 beziehungsweise Tag 28 (siehe Tabelle 29, Abb. 42) beobachtet werden.

	Tag 4	Tag 14	Tag 21	Tag 28
a	21%	6%	44%	14%
b	6%	8%	14%	20%
c	6%	8%	8%	19%

Tabelle 29 LDH-Release aus den Überständen von Donor FOS im Verlauf nach Inkubation mit Acetaminophen 1mM (a), Diclofenac 10µM (b) und Amiodaron 10µM (c)

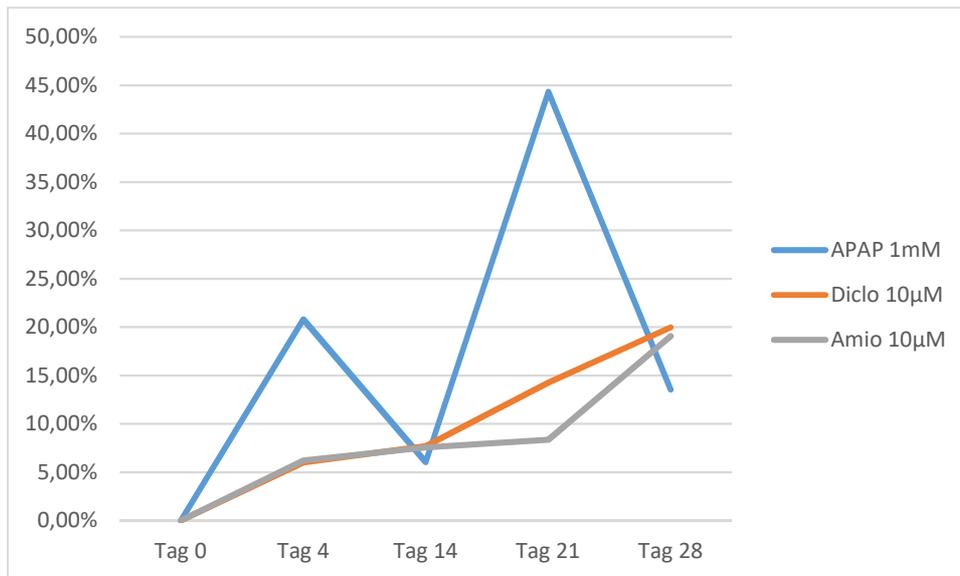


Abbildung 42 Donor FOS - LDH-Release im Verlauf

Die Messergebnisse der Caspase-Aktivitäten zeigten bei diesen 3 Medikamenten ebenfalls deutliche interindividuelle Schwankungen.

Acetaminophen führte ab einer Konzentration von 1mM bei allen Donoren zu einer starken Induktion der Caspasen (siehe Tabelle 30). Es wurden hier die höchsten Werte des ganzen Versuchs erreicht. EPB und FOS zeigten bei 5mM eine Aktivität von 95- respektive 267-mal der Kontrolle (siehe Tabelle 30). IZT und SSR lieferten, den LDH-Aktivitäten und dem geringen Schaden entsprechend, nur moderat erhöhte Caspase-Aktivitäten (siehe Tabelle 30).

	1mM	5mM
EPB	11	95
FOS	39	267
IZT	3	15
SSR	5	15
IGM	18	20
QQE	2	9

Tabelle 30 Caspase-Aktivitäten an Tag 28 nach Inkubation mit 1mM und 5mM Acetaminophen als x-faches der Kontrolle

Bei den mit Diclofenac inkubierten Zellen kam es ebenfalls erst bei den 2 höchsten Konzentrationen zu relevanten interindividuellen Unterschieden in den Caspase-Aktivitäten. Lediglich bei Donor IGM wurden bereits bei den niedrigeren Konzentrationen höhere Aktivitäten gemessen (siehe Tabelle 31). Donor EPB und IZT

zeigten mit dem 29- respektive dem 18-fachen der Kontrolle die höchsten Aktivitäten (siehe Tabelle 31). Wohingegen die Aktivität bei QQE nach Inkubation mit 50µM nur bei 2-mal der Kontrolle lag (siehe Tabelle 31).

	50µM	100µM
EPB	29	27
IZT	9	18
SSR	4	2
FOS	5	3
IGM	4	5
QQE	2	5

Tabelle 31 Caspase-Aktivitäten an Tag 28 nach Inkubation mit 50µM und 100µM Diclofenac als x-faches der Kontrolle

Auch bei Amiodaron führten erst die beiden höchsten Konzentrationen zu sichtbaren Differenzen in den Reaktionen der Donoren. Auch hier wurden wieder bei IZT und EPB im Vergleich zu beispielsweise QQE viel höhere Caspase-Aktivitäten gemessen (siehe Tabelle 32).

	50µM	100µM
EPB	14	13
IZT	2	20
QQE	0	2
SSR	7	2
IGM	2	4
FOS	1	3

Tabelle 32 Caspase-Aktivitäten an Tag 28 nach Inkubation mit 50µM und 100µM Amiodaron als x-faches der Kontrolle

Nun wurden die Donoren hinsichtlich entsprechender Unterschiede in deren Anamnese und Enzymaktivitäten respektive der Serologie-Befunde analysiert. Bei den akuten Schäden, repräsentiert durch die LDH-Release-Daten, wurden IZT und SSR dem Donor IGM gegenübergestellt. Die Donoren SSR und IZT auf der einen Seite und IGM auf der anderen Seite zeigten in fast allen der getesteten Enzymaktivitäten ein gegensätzliches Verhalten. Sie war bei CYP1A2, CYP2C19 und CYP2E1 (6-hydroxychloroxazone) bei Donor IGM wesentlich niedriger als bei SSR und IZT. Wohingegen die Enzymaktivitäten von CYP2B6, CYP2E1 (6β-Hydroxy-Testosteron),

CYP2C8, CYP2D6, CYP3A4 und CYP2C9 höher waren als bei IZT und SSR (siehe Tabelle 33).

Das Geschlecht der Donoren oder ob die Leber bereits durch den Konsum von Drogen oder Alkohol vorgeschädigt war, schienen hier eine eher untergeordnete Rolle zu spielen. Es fiel lediglich auf, dass Donor IGM eine Polymedikation erhalten hatte und einer anderen Ethnie angehörte als IZT und SSR (siehe Tabelle 34).

Bei den Serologiebefunden fiel auf, dass IGM und IZT CMV-positiv waren und SSR CMV-negativ. SSR wurde positiv auf EBV-IgG getestet, bei den beiden anderen Donoren fehlten allerdings die entsprechenden Informationen (siehe Tabelle 35).

Enzym	IZT	SSR	IGM	MW
ECOD	68	115	137	82
UGT	456	494	516	456
ST	58	28	37	42
CYP1A2	12	32	8	20
CYP2A6	24	165	134	95
CYP2B6	-	22	227	70
CYP2C8	-	193	278	242
CYP2C9	35	55	66	53
CYP2C19	1	21	5	8
CYP2D6	0,4	2	40	16
CYP2E1: (6-Hydroxy-Chlorzoxazon)	48	39	13	32
CYP2E1: (6β-Hydroxy-Testosteron)	-	113	182	104
CYP3A4	51	29	63	45

Tabelle 33 Enzymaktivitäten der Donoren IZT, SSR und IGM im Vergleich

	IZT	SSR	IGM
Geschlecht	weiblich	männlich	weiblich
Alter	44	22	54
Ethnie	kaukasisch	kaukasisch	spanisch
Diagnosen	Arterielle Hypertonie Diabetes mellitus Typ 2 COPD V.a. Nierenzellkarzinom	Arterielle Hypertonie Z.n. Karzinoid-Tumor der Appendix Z.n. Nieren-Transplantation 2x (Dialysepflichtig)	Arterielle Hypertonie Diabetes mellitus Typ 2 Z.n. Myokardinfarkt und Stentimplantation Ischämische Kardiomyopathie
Medikamente	unbekannt	keine	Aminosalicylsäure, Enalapril, Plavix, Metoprolol, Metformin
Todesursache	Apoplex	Apoplex	Hypoxie (kardiovaskulär)
Nikotin	nein	gelegentlich Zigarre	nein
Alkohol	nein	nein	nein
Drogen	unbekannt	Marihuana täglich (4-5 Jahre)	keine

Tabelle 34 Allgemeine Anamnese der Donoren IZT, SSR und IGM

	IZT	SSR	IGM
EBV	unbekannt	IgG positiv	unbekannt
CMV	positiv	negativ	positiv
Hepatitis B	negativ	negativ	negativ
Hepatitis C	negativ	negativ	negativ
HIV	negativ	negativ	negativ

Tabelle 35 Serologische Befunde der Donoren IZT, SSR und IGM

Die Caspase-Aktivitäten unterschieden sich bei den Donoren EPB und QQE am stärksten. Dies spiegelt sich auch in deren Aktivitäten der getesteten Enzyme wider. Die beiden Donoren zeigten bei allen ein entgegengesetztes Aktivitätslevel (siehe Tabelle 36).

Auch im Geschlecht, der Vormedikation, dem Drogen-, Tabak- und Alkoholkonsum unterschieden sich die beiden Donoren erheblich voneinander. QQE war weiblich, multimorbide mit einer Polymedikation und ohne Genussmittelanamnese (siehe

Tabelle 37). EPB war hingegen männlich, litt an allergischem Asthma und war ohne Vormedikation. Es wurde bei EPB allerdings ein erheblicher Alkohol- und Drogenabusus in der Anamnese festgehalten (siehe Tabelle 37).

Die Serologiebefunde waren bei beiden identisch (siehe Tabelle 38).

Enzym	EPB	QQE	MW
ECOD	51	97	82
UGT	448	340	456
ST	70	29	42
CYP1A2	10	43	20
CYP2A6	115	38	95
CYP2B6	25	-	70
CYP2C8	270	-	242
CYP2C9	85	38	53
CYP2C19	3	17	8
CYP2D6	1	30	16
CYP2E1: (6-Hydroxy-Chlorzoxazon)	13	70	32
CYP2E1: (6 β -Hydroxy-Testosteron)	69	-	104
CYP3A4	37	58	45

Tabelle 36 Enzymaktivitäten der Donoren EPB und QQE im Vergleich

	QQE	EPB
Geschlecht	weiblich	männlich
Alter	42	31
Ethnie	kaukasisch	kaukasisch
Diagnosen	Arterielle Hypertonie Adipositas Grad II OSAS Anämie Depression Fibromyalgie Z.n. Hautkrebs	Allergisches Asthma
Medikamente	Polymedikation	keine
Todesursache	Hypoxie (kardiovaskulär)	Hypoxie (Heroinintoxikation)
Nikotin	nein	17 Jahre
Alkohol	gelegentlich am Wochenende	2-3 Bier/Tag (10 Jahren)
Drogen	keine	Marihuana Oxycodon Heroin (10 Jahre)

Tabelle 37 Allgemeine Anamnese der Donoren QQE und EPB

	QQE	EPB
EBV	IgG positiv	IgG positiv
CMV	positiv	positiv
Hepatitis B	negativ	negativ
Hepatitis C	negativ	negativ
HIV	negativ	negativ

Tabelle 38 Serologische Befunde der Donoren QQE und EPB

3.2.2 Isoniazid und Ximelagatran

Bei Isoniazid und Ximelagatran konnten keine signifikanten interindividuellen Unterschiede zwischen den Donoren festgestellt werden. Die Daten bewegten sich im Vergleich zur anderen Gruppe alle in einem jeweils relativ kleinen Intervall mit entsprechend geringen Standardabweichungen. Dies lag wohl auch daran, dass die Schäden an den Sphäroiden durch die beiden Medikamente in diesem Testsystem sehr gering ausgefallen waren.

Allein Ximelagatran mit einer Konzentration von 50µM schien die Sphäroide merklich zu schädigen. Hier wurde eine Differenz zwischen IZT und den anderen Donoren

sichtbar. Aus dem Lysat von IZT an Tag 28 konnten noch 91% LDH freigesetzt werden, aus dem Rest durchschnittlich nur 48% (+/- 5%) (siehe Tabelle 39).

	1µM	5µM	10µM	50µM
EPB	81%	78%	83%	53%
IZT	95%	86%	91%	91%
QQE	74%	72%	61%	47%
FOS	40%	77%	68%	53%
IGM	76%	75%	73%	46%
SSR	89%	92%	89%	39%

Tabelle 39 LDH-Aktivität der Lysate an Tag 28 nach Inkubation mit Ximelagatran

Schaut man sich den LDH-Release bei 50µM Ximelagatran an sieht man auch hier eine IZT-Kurve, die deutlich unter den anderen Kurven verläuft (siehe Tabelle 40, Abb. 43).

	Tag 4	Tag 14	Tag 21	Tag 28
MW aller Donoren ohne IZT	14% +/- 6%	27% +/- 7%	7% +/- 3%	6% +/- 3%
IZT	2%	6%	1%	bql

Tabelle 40 LDH-Release im Verlauf nach Inkubation mit Ximelagatran 50µM

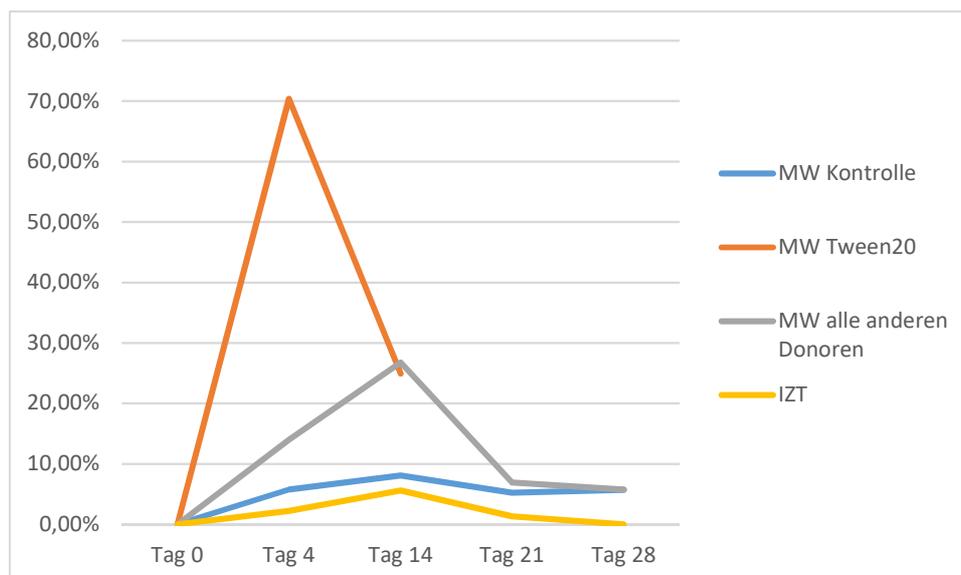


Abbildung 43 Ximelagatran 50µM - LDH-Release im Verlauf

Bei der Inkubation mit Isoniazid waren scheinbar lediglich die QQE-Sphäroide bei 3 der 4 Konzentrationen etwas mehr beeinträchtigt als die Sphäroide der anderen Donoren (siehe Tabelle 41).

	10µM	50µM	100µM	200µM
EPB	83%	79%	76%	71%
IZT	94%	88%	86%	82%
QQE	66%	67%	81%	58%
FOS	90%	81%	85%	77%
IGM	90%	82%	84%	75%
SSR	86%	82%	85%	84%

Tabelle 41 LDH-Aktivität der Lysate an Tag 28 nach Inkubation mit Isoniazid

Der LDH-Release in den Überständen zeigte hier ebenfalls einen einheitlichen Verlauf über die jeweils 28 Tage (beispielhaft siehe Abb. 44).

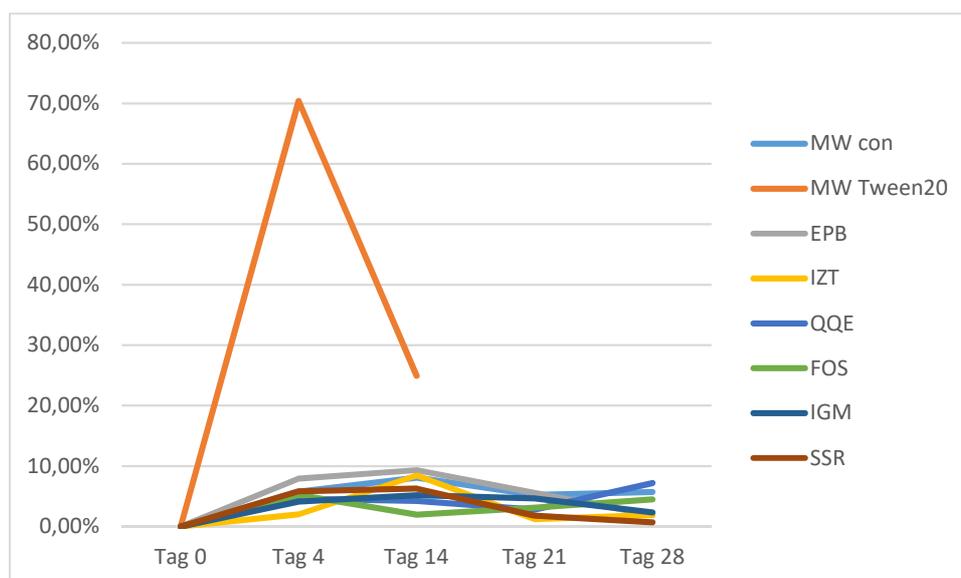


Abbildung 44 Isoniazid 100µM - LDH-Release im Verlauf

Die Messungen der Caspase-Aktivitäten nach der Inkubation mit Ximelagatran und Isoniazid lieferten zudem fast keine signifikanten interindividuellen Unterschiede. Lediglich wieder nach der Inkubation mit 50µM Ximelagatran lagen die Aktivitäten von FOS und SSR mit dem 8- und dem 7-fachen der Kontrolle deutlich höher als die Aktivitäten der anderen Donoren (siehe Tabelle 42).

FOS	8
SSR	7
IGM	2
EPB	3
IZT	1
QQE	1

Tabelle 42 Caspase-Aktivitäten an Tag 28 nach Inkubation mit 50µM Ximelagatran als x-faches der Kontrolle

4 Diskussion

Es führt also eine Reihe unterschiedlichster und noch nicht bis ins letzte aufgedeckter Mechanismen zu einer medikamentös-induzierten Hepatotoxizität (S. J. Lee et al., 2016).

Dosis- und Zeiteffekte können von Substanzen mit überwiegend intrinsischer Toxizität bereits heute valide nachempfunden und mögliche Schäden mit teils hoher Spezifität vorhergesagt werden (James et al., 2003; Yuan & Kaplowitz, 2013).

Schwierigkeiten bereiten bis heute idiosynkratische Effekte, die vor allem von Eigenschaften des Patienten selbst abhängen und klinisch von großer Bedeutung sind (Hussaini & Farrington, 2007; Kaplowitz, 2005). Bis heute gibt es kein verlässliches präklinisches Testsystem, das diese Idiosynkrasie, die individuellen Eigenschaften jedes Patienten und somit seine wahrscheinlichen Reaktionen auf ein bestimmtes Medikament ausreichend berücksichtigt (M. Chen et al., 2014).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher ein neues 3D-Leberzellmodell hinsichtlich der in vitro-Darstellung vor allem auch idiosynkratischer medikamentös-induzierter Hepatotoxizität und interindividueller Reaktionsunterschiede untersucht werden. Dabei stellte sich heraus, dass mit diesem Testsystem interindividuelle Unterschiede bei den Effekten intrinsischer Toxizität signifikant nachempfunden werden können. Jedoch gestaltete sich die Darstellung idiosynkratischer Mechanismen schwierig.

4.1 Patientenkollektiv und Medikamente

Um möglichst viele der verschiedenen Mechanismen medikamentös-induzierter Hepatotoxizität aufzugreifen, wurden für diese Arbeit 5 Medikamente ausgewählt, die auf möglichst unterschiedliche Art und Weise eine Hepatotoxizität hervorrufen können (siehe 2.2.1). Es wurden zum einen Amiodaron, Acetaminophen und Diclofenac verwendet, die überwiegend intrinsisches Toxizitätspotential aufweisen und bei

ausreichend hoher Dosis und Inkubationsdauer bei so gut wie allen Individuen zu einer direkten Leberschädigung führen (Boelsterli, 2003; Harris et al., 1983; James et al., 2003). Zum anderen wurden Isoniazid und Ximelagatran eingesetzt, welche vor allem durch idiosynkratisches Hepatotoxizitätspotential aufgefallen waren (Metushi et al., 2014; Perwitasari et al., 2015; Yip et al., 2015). Es wurden pro Medikament 4 Medikamentenkonzentrationen getestet, die das ganze Spektrum von therapeutisch bis supratherapeutisch abdeckten (Brennan et al., 1991; Chideya et al., 2009; Lissy et al., 2010; Schutzer et al., 2004). Die Inkubationslösungen wurden mittels Verdünnungsreihen selbst hergestellt. Die Löslichkeit vor allem von Amiodaron gestaltete sich allerdings hierbei schwierig. Die Messdaten des ersten Versuchs ließen darauf schließen, dass es durch die schlechte Löslichkeit möglicherweise zu Medikamentenkonzentrationen kam, die weit geringer waren als angenommen (siehe 3.2.1).

Da bei der idiosynkratischen Hepatotoxizität der Patient selbst eine große Rolle spielt, wurden bei InSphero[®] Donoren ausgewählt, die hinsichtlich ihrer biologischen und biochemischen Eigenschaften möglichst unterschiedlich zu sein schienen (siehe 2.2.1 Tabelle 2-4). Allerdings wurden nur 6 Patienten untersucht, weshalb die Ergebnisse dieser Versuche lediglich als grobe Tendenz aufgefasst und interpretiert werden können.

4.2 Promega-Assays und die Auswertung der Messdaten

Die verwendeten Assays zur LDH- und Caspase-Aktivitätsbestimmung wurden bereits bei anderen Testreihen erfolgreich eingesetzt und lieferten auch hier solide Daten. Bei der Auswertung der Daten bereitete einzig die Bestimmung und Interpretation der Basalaktivitäten der verwendeten Medien („Blank“) und Assay-Testreagenzien Schwierigkeiten. Daraus resultierend konnten beispielsweise die mittels CellTiter-Blue[®] Cell Viability Assay gewonnenen Messdaten nicht verwendet werden.

Es lagen nach Abzug des Blank-Wertes zudem 9% der verwendeten Daten unter der Nachweisgrenze - „below the limit of quantification“ (Armbruster & Pry, 2008). Ein Aspekt, der bei der Verwendung solcher Assays und der Auswertung der dadurch gewonnenen Messdaten kontrovers diskutiert werden sollte. Wie auch im Rahmen dieser Arbeit, sollten mehrere verschiedene Assays durchgeführt werden, um so möglichst viele unterschiedliche pathophysiologische Aspekte der Thematik

berücksichtigen zu können und valide Aussagen mit einer Versuchsreihe treffen zu können (Goda et al., 2016).

4.3 Möglichkeiten und Grenzen präklinischer in vivo- und in vitro-Testsysteme

Heute stehen uns präklinisch verschiedene humane und tierische in vivo- und in vitro-Modelle zur Untersuchung von Medikamenteneffekten zur Verfügung. Dadurch können wichtige Informationen bezüglich deren Metabolismus, biologischen Angriffspunkten und somit potentiell toxischen Effekten gemacht werden. Für die dosisabhängige, intrinsische Hepatotoxizität konnten Zell- und Tiermodelle etabliert werden, die mit hoher Spezifität Medikamente mit dem Potential für gravierende Leberschäden bereits präklinisch identifizieren können (Yuan & Kaplowitz, 2013). Allerdings gibt es bis heute kein Modell, das die Komplexität idiosynkratischer Reaktionen der in vivo-Situation entsprechend widerspiegelt und somit die präklinische Detektion entsprechender Medikamente ermöglichen würde. Schwierigkeiten stellen hier vor allem die individuellen Suszeptibilitätsfaktoren und die komplexen Interaktionen der einzelnen Bestandteile der Leber dar (S. J. Lee et al., 2016; Licata, 2016). Eingesetzt werden derzeit isolierte, perfundierte Lebern (als Ganzes oder Slices) und Zellmodelle in 2D und neuerdings 3D (immortale Leberzelllinien, Stammzellen und primäre humane Hepatozyten).

4.3.1 Humane und tierische isolierte, perfundierte Lebern

Isolierte, perfundierte Lebern haben den großen Vorteil, dass sie als tatsächlicher Teil der in vivo-Leber die strukturelle und funktionelle in vivo-Situation der Leber widerspiegeln. Sie beinhalten alle Leberzelltypen inklusive des biliären und vaskulären Systems, sowie Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte und ermöglichen deren Interaktion in der erhaltenen physiologischen 3D-Morphologie (Godoy et al., 2013; vom Dahl & Haussinger, 1997). Durch diese Komplexität ist die Handhabung und Aufrechterhaltung der physiologischen Funktionen und Gegebenheiten dieser Lebern allerdings sehr schwierig. Die Verfügbarkeit vor allem humaner Lebern ist begrenzt, schwierig zu planen und Bedarf einer guten Kooperation von Klinikern und Forschung. Dadurch, sowie durch den Bedarf an geschultem Personal und geeigneten Instrumenten, ist der Aufwand sehr groß, der Informationsgewinn aufgrund einer Kultivierbarkeit von nur wenigen Stunden allerdings relativ gering. Langzeiteffekte

können hier nicht nachempfunden und Versuche meist nicht reproduziert werden. Getestet werden kann auch immer nur ein Medikament pro Leber.

Durch die Herstellung von mehreren Teilen, sogenannten „Precision Cut Liver Slices“, aus einer Leber können verschiedene Substanzen getestet respektive verschiedene biochemische Tests und Beobachtungen bezüglich eines Medikamentes parallel durchgeführt werden (de Graaf et al., 2010). Auch konnten mittels Kryokonservierung Slices für Versuche zu späteren Zeitpunkten erfolgreich aufbewahrt werden (Fahy et al., 2013). Diese sind kommerziell derzeit aber nicht erhältlich. Die Herstellung von Slices reduziert zum einen die Zahl der benötigten Lebern respektive Tieren im Tierversuch. Gleichzeitig erhöht es den Informationsgewinn. Die optimale Dicke eines Slices wurde mit 100µm–250µm angegeben, um die Balance zwischen zerstörten und intakten Zellen, deren Funktion sowie die Versorgung mit allen für die Vitalität wichtigen Substraten aufrechtzuerhalten (de Graaf et al., 2006). Aufgrund essentieller Unterschiede im hepatischen Metabolismus zwischen Mensch und Tier sind Tierlebern allerdings nur bedingt geeignet um die Ergebnisse der Versuche auf die humane Situation zu übertragen. Die Übereinstimmung von präklinischen Tiermodellstudien mit dem Menschen wird teilweise mit nur an die 50% (43% für Nager) angegeben - einer Wahrscheinlichkeit, die mit einem Münzwurf - „toxisch ja/nein“ - vergleichbar ist (Olson et al., 2000). Unter Berücksichtigung bekannter Unterschiede (wie beispielsweise verminderter oder übersteigerter Aktivität bestimmter Enzyme der Biotransformation) können jedoch aus Tierversuchen für den Menschen essentielle Informationen gewonnen werden und Tendenzen aufgezeigt werden (Elferink et al., 2008).

Die humanen PCLS hingegen zeigen in Versuchen die größte Übereinstimmung mit der in vivo-Situation (Olinga et al., 2008; Vickers & Fisher, 2004).

Das große Defizit dieser PCLS stellt die durchschnittliche Kultivierbarkeit von nur 72h dar, da so nur akute Effekte nachempfunden werden können (Klassen et al., 2008; Vickers & Fisher, 2004). Die Expression und Aktivität von Enzymen der Biotransformation nimmt nach 24 Stunden bereits ab (Graaf, Groothuis, & Olinga, 2007). Allerdings können auch anhand der Slices die mit den gemessenen metabolischen Veränderungen korrelierenden histomorphologischen Veränderungen beobachtet werden (Lupp, Danz, & Muller, 2001).

4.3.2 Zellmodelle zur präklinischen Testung medikamentös-induzierter Hepatotoxizität

Die zur Verfügung stehenden Zellen sind in unterschiedlichen Formen und Systemen kultivierbar. Diese sind im Gegensatz zu Versuchen mit Lebern als Ganzes oder Slices leichter zugänglich und in größeren Mengen verfügbar. Die Versuchsbedingungen sind einfacher zu standardisieren, weshalb Versuche mit diesen Zellen valide und in größerem Umfang reproduziert werden können. Es stehen pluripotente Stammzellen, verschiedene immortale oder transfizierte hepatische Zelllinien, primäre Hepatozyten und Ko-Kulturen mit nicht-parenchymatösen Zelltypen zur Verfügung, über welche bereits in der Einleitung dieser Arbeit ein grober Überblick gegeben wurde. Den Goldstandard zur Testung medikamentös-induzierter Hepatotoxizität stellen hierbei primäre humane Hepatozyten in Ko-Kultur mit nicht-parenchymatösen Zellen dar, welche vor allem als 3D-System der Leber in vivo am nächsten kommen (Godoy et al., 2013).

4.3.3 3D InSight™ Human Liver Microtissues

Eines dieser 3D-Systeme wurde dieser Arbeit zugrunde gelegt. Mit den 3D InSight™ Human Liver Microtissues aus primären humanen Hepatozyten der Firma InSphero® konnten im Gegensatz zu den meisten bisher getesteten Zellmodellen (siehe 4.3.1, 4.3.2) stabile Versuchsbedingungen über die jeweils 28 Tage hergestellt und signifikante, reproduzierbare Messdaten erhoben werden. Gerade die nicht-adhärenente 3D-Struktur der Sphäroide kommt der in vivo-Situation sehr nahe und bietet somit bessere Voraussetzungen als bisherige Testsysteme. Der Durchmesser der Sphäroide ist über die initial zugeführte Zellzahl steuerbar, um vitale Bedingungen im ganzen Sphäroid zu gewährleisten.

Im Gegensatz zu den meisten anderen Testsystemen können beliebig viele Sphäroide vom gleichen Donor hergestellt werden. Die Versuche können somit beliebig oft unter gleichen Bedingungen reproduziert werden. Durch die Kultivierung in 96-Well-Platten können zudem mehrere Medikamente gleichzeitig getestet werden.

Die Sphäroide bestehen neben den primären Hepatozyten auch aus den wichtigsten nicht-parenchymatösen Leberzelltypen, die in den meisten anderen Zellsystemen nicht berücksichtigt werden (siehe 4.3.1, 4.3.2). Gerade zur Darstellung von beispielsweise immunologischen Schädigungsmechanismen sind diese essentiell, weshalb man sich hier neue Erkenntnisse erhoffte (Rose, Holman, Green, Andersen, & LeCluyse, 2016).

Allerdings kamen die nicht-parenchymatösen Zellen nicht individuell von dem jeweils entsprechenden Donor, sondern wurden universal von einem einzigen Donor auf alle hier getesteten 6 Donoren angewendet. Individuelle Unterschiede in den Prozessen an denen die nicht-parenchymatösen Zellen beteiligt sind konnten somit nicht dargestellt werden. Es sollten für Folgeversuche alle Zelltypen vom selben Donoren stammen.

Es werden in diesem Zellsystem zwar viele für den Metabolismus von Medikamenten wichtige Enzyme und Transporter, sowie dem Gallensystem entsprechende Strukturen ausgebildet, allerdings werden weitere individuelle und entscheidende Proteine oder Oberflächenmoleküle nicht exprimiert. Diese sind aber gerade auch zur Darstellung weiterer idiosynkratischer Schädigungsmechanismen unerlässlich. Zu nennen sind hier HLA-Merkmale oder Komponenten der inflammatorischen und angeborenen sowie erworbenen allergischen Reaktionskaskaden (Kim & Naisbitt, 2016; Pichler et al., 2015; Yun, Cai, Lee, & Pichler, 2016; Zanni et al., 1998).

Die Aktivitäten einiger Enzyme des Cytochrom P450-Systems wurden im Vorfeld für jeden Donor bestimmt. Diese zeigten dann auch den Messdaten entsprechende Reaktions-Tendenzen und Unterschiede der einzelnen Donoren auf (siehe 3.2). Da man allerdings noch nicht alle Effektoren hinter der Idiosynkrasie identifizieren kann, wurden nur bisher bekannte Proteine und Enzymaktivitäten bei der Herstellung der Sphäroide berücksichtigt und bestimmt. Neue Erkenntnisse hinsichtlich möglicher weiterer beteiligter Effektoren können mit diesem Testsystem so nicht gewonnen werden. Gewinnt man aber neue Erkenntnisse auf anderem Wege, können diese durchaus in diesem Testsystem mitberücksichtigt werden und zur Validierung der entsprechenden Hypothesen herangezogen werden. Die Voraussetzungen sind bei diesem Testsystem allemal gegeben, da dieses in vitro-Testsystem stabile und der in vivo-Situation bisher am nächsten kommende Verhältnisse über mindestens 5 Wochen bietet (Messner et al., 2013). Somit liefert dieses Zellsystem die Möglichkeit sowohl akute als auch Langzeiteffekte bisher validierter oder teils noch hypothetischer Pathomechanismen medikamentös-induzierter Hepatotoxizität valide und reproduzierbar darzustellen. Es scheitert allerdings, wie auch alle bisherigen Testsysteme, an den noch weitgehend unbekanntem und komplexen Interaktionen hinter der idiosynkratischen medikamentös-induzierten Hepatotoxizität.

Allerdings konnten mit dem Testsystem sensitivere beziehungsweise teils konträre Ergebnisse hinsichtlich aktueller Literatur gewonnen werden. Dosisabhängige akute

Schäden via Diclofenac konnten hier bereits ab einer Medikamentendosis von 100µM ($p=0,007$) signifikant dargestellt werden. Dies war bis jetzt erst ab einer Medikamentenkonzentration von mindestens 250µM gelungen (Boelsterli, 2003).

Bei bisherigen Testreihen wurde bei einer durch Acetaminophen bedingten Hepatotoxizität der Apoptose und den damit verbundenen Caspase-Kaskaden eine eher untergeordnete und umstrittene Rolle zugeschrieben (H. Jaeschke, Cover, & Bajt, 2006; Kass, Macanas-Pirard, Lee, & Hinton, 2003). Mit den 3D InSight™ Human Liver Microtissues konnte allerdings bereits bei einer Konzentration von 0,5mM eine im Vergleich zur Kontrolle 3-fach höhere Caspase-Aktivität gemessen werden. Bei 1mM lag diese sogar beim durchschnittlich 13-fachen der Kontrolle und bei 5mM beim 65-fachen der Kontrolle, was der höchsten Aktivität der gesamten Versuchsreihe entspricht. Dies lässt vermuten, dass die Apoptose möglicherweise doch eine größere Rolle spielt, als bisher angenommen.

4.4 Die Schwierigkeit der Darstellung aller essentiellen Pathomechanismen medikamentös-induzierter Hepatotoxizität in einem Testsystem

Eine Vielzahl an präklinischen Testsystemen wurde bisher entwickelt um medikamentös-induzierte Hepatotoxizität zu detektieren (siehe 4.3). Es konnten dadurch schon große Fortschritte gemacht und viele pathophysiologische Zusammenhänge erkannt werden. Einen weiteren Fortschritt stellt die Entwicklung von 3D-Systemen vergleichbar mit dem hier zugrunde liegenden Versuchsmodell dar. Allerdings scheitern bisher alle dieser Testsysteme an der Komplexität medikamentös-induzierter Hepatotoxizität.

4.4.1 Darstellung von bekannten Mechanismen vor allem intrinsischer Hepatotoxizität

Mit diesem Testsystem konnten direkte hepatotoxische Schäden durch Medikamente mit intrinsischem Toxizitätspotential signifikant dargestellt werden. Für Acetaminophen und Diclofenac wurde bereits in vielen Testreihen gezeigt, dass es bei ausreichend hoher Medikamentenkonzentration respektive Inkubationszeit so gut wie immer zu hepatotoxischen Effekten kommt (Bort, Ponsoda, Jover, Gomez-Lechon, & Castell, 1999; H. Jaeschke, 2015; Larson, 2007). Auch bei den Versuchen für diese Arbeit konnten signifikante dosisabhängige Schäden an den Sphäroiden gemessen und dargestellt werden. Die Mechanismen, die durch die Einnahme von Acetaminophen zu einem Leberschaden führen sind weitgehend bekannt und geeignete Testsysteme

validiert (Larson, 2007; McGill & Jaeschke, 2013; McGill et al., 2011; Xie et al., 2014). Auch durch das in dieser Arbeit getestete Zellmodell konnten signifikante akute Toxizitätseffekte via LDH-Messungen bei Konzentrationen von 0,5mM ($p=0,04$), 1mM ($p=0,01$) und 5 mM ($p=0,001$) dargestellt werden. Entsprechend konnte am Ende der Langzeitversuche vor allem bei den suprathérapeutischen Dosen signifikant weniger LDH, entsprechend weniger vitaler Zellen, gemessen werden (1mM: $p=0,03$; 5mM: $p=0,001$).

Dieses Testsystem konnte zudem die dosisabhängigen Effekte von Diclofenac sensibler darstellen als andere vergleichbare Systeme. So konnten bereits bei einer Medikamentenkonzentration von 100 μ M signifikante akute Schäden an Tag 4 gemessen werden ($p=0,007$). Dies gelang mit vergleichbaren Testsysteme bis jetzt erst ab einer Medikamentenkonzentration von mindestens 250 μ M (Boelsterli, 2003).

4.4.2 Probleme der Darstellung idiosynkratischer Hepatotoxizitätspotentiale

Allerdings konnten mit allen bisherigen, sowie auch mit diesem Testsystem, nur ansatzweise idiosynkratische Hepatotoxizitätspotentiale nachempfunden werden. Bei der Idiosynkrasie sind vorrangig nicht der Stoffwechsel des Medikamentes, sondern der Patient und seine individuellen Eigenschaften und pathophysiologischen intraindividuellen Interaktionen ausschlaggebend (M. Chen, Suzuki, Borlak, Andrade, & Lucena, 2015; Hussaini & Farrington, 2007).

Bei der Biotransformation der meisten Medikamente im menschlichen Körper spielen die Enzyme des Cytochrom P450-Systems eine große Rolle. Auch für die meisten der bei dieser Arbeit verwendeten Medikamente sind interindividuelle Differenzen in deren Aktivität als Risikofaktoren für einen späteren Schaden durch das Medikament bekannt. Diese bereits bei anderen wissenschaftlichen Arbeiten gewonnenen Erkenntnisse konnten auch mit diesem Testsystem, teils signifikant, abgebildet werden.

Acetaminophen weist ein höheres Toxizitätspotential bei gesteigerter Aktivität von unter anderem CYP1A2, CYP2E1 und CYP3A4 auf (Laine, Auriola, Pasanen, & Juvonen, 2009). Vergleicht man bei diesem Testsystem die entsprechenden Enzymaktivitäten eines Donors mit messbar größeren Schäden an den Sphäroiden mit denen eines Donors mit geringeren Schäden, so wies der mehr beeinträchtigte Donor ebenfalls höhere CYP3A4- und CYP2E1-Aktivitäten auf. Die CYP1A2-Aktivität war bei diesem allerdings niedriger als beim weniger geschädigten Donor.

Für Amiodaron gilt eine hohe Aktivität an CYP1A1 und CYP3A4 als Risikofaktor für eine medikamentös-induzierte Hepatotoxizität (Wu et al., 2016). Die CYP3A4-Aktivität konnte auch bei den hier zugrunde liegenden Versuchen als potentieller Risikofaktor identifiziert werden. CYP1A1 wurde im Vorfeld leider nicht bestimmt.

Entsprechend dem aktuellen wissenschaftlichen Kenntnisstand (Tang, 2003) konnte hier für Diclofenac unter anderem eine hohe Aktivität an CYP2C9, CYP3A4 und CYP2C8, sowie eine hohe Glukuronidierungsrate via UGT als möglicher Risikofaktor identifiziert werden.

Die vermutlich bei toxischen Schädigungen durch Ximelagatran und Isoniazid essentiellen immunologischen und auch HLA-abhängigen Mechanismen (Sharma, Balamurugan, Saha, Pandey, & Mehra, 2002; Yip et al., 2015) können durch das Testsystem nicht abgebildet werden. Es fehlen die entsprechenden individuellen Zellen und Proteine. Ximelagatran schien bei diesen Versuchen so gut wie keinen schädigenden Einfluss auf die Sphäroide zu haben. Vielleicht ein Hinweis darauf, dass trotz Wegnahme vom Markt bei genauerer Nachforschung nur in etwa 0,5% der beschriebenen Leberversagen auch tatsächlich auf die Einnahme von Ximelagatran und dessen idiosynkratisches Hepatotoxizitätspotential zurückzuführen zu sein schienen

(<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/ScienceResearch/ResearchAreas/ucm073046.pdf>).

Die Mechanismen, die zu einer Hepatotoxizität nach Exposition gegenüber Isoniazid führen sind zudem noch weitgehend ungeklärt. Man geht sowohl von einer gewissen metabolischen als auch einer idiosynkratischen und immunologischen Genese aus (Metushi et al., 2014; Perwitasari et al., 2015; Sharma et al., 2002). Auch dies kann durch das vorliegende Testsystem nicht ausreichend abgebildet werden. Es zeigte sich aber der Literatur entsprechend eine Tendenz zu einem Mehr-Schaden durch ein hohes Aktivitätslevel an CYP2E1 (Metushi et al., 2014; Perwitasari et al., 2015). Die Rolle von CYP3A4 ist umstritten, konnte hier aber als potentieller Risikofaktor identifiziert werden (K. Liu et al., 2014).

Es fehlen diesem Testsystem also viele essentielle Effektoren der überwiegend idiosynkratischen Mechanismen des Hepatotoxizitätspotentials von Ximelagatran und Isoniazid. Dies erklärt auch, warum Medikamentendosen dieser beiden Substanzen weit über dem therapeutischen Bereich bei den damit inkubierten Sphäroiden keine respektive nur geringe Schäden verursacht haben. Die Schwierigkeit, diese

Idiosynkrasie wiederzugeben findet man in allen bis heute bekannten präklinischen Testsystemen. Auch sie können diese Mechanismen nicht ausreichend widerspiegeln.

4.5 Anforderungen an zukünftige Testsysteme und Diagnostikinstrumente – ein Hypothesen-Shift hin zu mehr Individualität?

Die klinische Symptomatik und das histopathologische Erscheinungsbild medikamentös-induzierter Hepatotoxizität sind vielfältig. Es kann zum einen zu zytotoxischen Effekten wie Nekrose respektive Apoptose oder abnormen Umbauprozessen kommen, die zu einer Hepatitis oder Fettleber führen und meist in einer Zirrhose enden. Zum anderen können sie auch Cholestase durch die Beeinträchtigung des biliären Abflusses, sowie selten primär vaskuläre Schäden oder Lebertumoren (W. M. Lee, 2003) hervorrufen.

Die verschiedenen Beschwerdemuster erstrecken sich dementsprechend von chronischen eher moderaten Leberenzymwerterhöhungen mit dezentem Ikterus bis hin zu fulminanten Verläufen mit akutem Leberversagen innerhalb kürzester Zeit.

Eine klinische Einteilung erfolgt nach dem biochemischen Schädigungsmuster des Medikamentes in einen vorwiegend hepatozellulären medikamentösen Schaden, eine cholestatische oder gemischt hepatozellulär-cholestatische Form (Danan & Benichou, 1993).

Hierbei werden die Serumkonzentrationen der Alaninaminotransferase und der Alkalischen Phosphatase, sowie deren Verhältnis zueinander betrachtet. Ausgegangen wird immer von der oberen Grenze des noch als im Normbereich angesehenen Wertes („Upper limit of normal“ – ULN). Auf dieser Grundlage basierend bildete sich ein erstes gängiges diagnostisches Mittel zur präklinischen Evaluierung des Hepatotoxizitätspotentials eines Medikamentes heraus, bekannt als „Hy’s Law“ (Temple, 2006). Hy Zimmerman stellte in seinen Beobachtungen bei Patienten über 50 Jahren fest, dass vor allem ein hepatozellulärer Schaden (repräsentiert als ALT-Erhöhen ≥ 3 ULN) in der Kombination mit einer Hyperbilirubinämie (Gesamtbilirubin > 2 ULN ohne initiale AP-Erhöhen) mit einem besonders hohen Risiko verbunden ist an einem akuten Leberversagen zu versterben (Zimmerman, 1978, 2000). Mehrere Studien unterstützen diese These mit einer beobachteten Letalität von etwa 10% dieser „Hy’s-Law-Fälle“ (Andrade et al., 2005; E. Bjornsson & Olsson, 2005). „Hy’s Law“ bietet somit ein erstes, wenn auch nicht ausreichend verifiziertes Prognosekriterium für die Hepatotoxizität eines Medikamentes. Bis heute

wird es von der FDA in abgewandelter Form beim Zulassungsprozess eines Medikamentes angewandt

(<https://www.fda.gov/downloads/Drugs/.../Guidances/UCM174090.pdf>).

Allerdings reichen die bisher zur Verfügung stehenden Biomarker bei weitem nicht aus, um frühzeitig medikamentös-induzierte Leberschädigungen zu erkennen. Viel mehr noch können Erhöhungen von bisher als Diagnostik-Goldstandard geltender ALT, sowie der AST oder des Bilirubins (Amacher, 1998; Ozer, Ratner, Shaw, Bailey, & Schomaker, 2008) durch diverse andere Diagnosen erklärt werden und sind teils wenig spezifisch (Aithal et al., 2011; Nathwani, Pais, Reynolds, & Kaplowitz, 2005). Hier ist die Definition von neuen und eventuell spezifischeren Biomarkern wie der Glutamat- und Malatdehydrogenase, dem HMBG1-Protein, Keratin-18 oder micro-RNAs vielversprechend (Antoine et al., 2009; Dear, Antoine, Starkey-Lewis, Goldring, & Park, 2014; Robles-Diaz, Medina-Caliz, Stephens, Andrade, & Lucena, 2016; Schomaker et al., 2013). Diese sogenannten „-omics“ setzen an der genetischen Ausstattung des Menschen an und versuchen deren Interaktion mit Medikamenten auf molekularer Ebene zu analysieren (Russmann, Jetter, & Kullak-Ublick, 2010). Allerdings ist dieses Gebiet sehr breit gefächert, teils noch wenig spezifisch und daher oftmals im klinischen Alltag schwer einzuordnen und anzuwenden (Birney, Smith, & Grealley, 2016; Sistare & DeGeorge, 2011; Ulrich & Friend, 2002).

Die Leberbiopsie spielt derzeit in der Diagnostik medikamentös-induzierter Leberschäden ebenfalls nur eine untergeordnete Rolle, gewinnt aber zunehmend wieder an Bedeutung (Fisher, Vuppalanchi, & Saxena, 2015). Nur in weniger als der Hälfte der Verdachtsfälle wird eine Biopsie durchgeführt (E. Bjornsson, Kalaitzakis, & Olsson, 2007). Ist die medikamentös-induzierte Genese allerdings sehr wahrscheinlich, können durch die histologische Begutachtung der Biopsate wertvolle Informationen bezüglich der Art des Schädigungsmusters des Medikaments, der Schwere, der möglichen Pathogenese der Schädigungsmechanismen und Angriffspunkte des Medikamentes, sowie die Prognose des Patienten gewonnen werden (Fisher et al., 2015). Wie man am Beispiel einer medikamentös-induzierten Autoimmunhepatitis sieht, die eine Therapie mit Steroiden nach sich zieht, kann eine Biopsie mögliche Therapieoptionen aufzeigen. In der Therapie mit mehreren Medikamenten kann man durch die Art des Schädigungsmusters in der Biopsie auf das wahrscheinlich dafür verantwortliche Medikament schließen, vorausgesetzt man kennt das vorrangige Schädigungsmuster des Medikamentes. Aufgrund des doch

relativ hohen Risikos einer Biopsie als invasives Verfahren und dem relativ geringen Nutzen, wird dies im Klinikalltag heute allerdings nur selten durchgeführt.

Es gibt diverse Versuche die Diagnostik medikamentös-induzierter Hepatotoxizität zu standardisieren. Darunter die „Naranjo Adverse Drug Reactions Probability Scale“ (NADRPS) und die „Mara and Victorino Clinical Scale“, welche sich mangels genügend hoher Sensitivität und Spezifität aber nicht durchsetzen konnten (Maria & Victorino, 1997; Naranjo et al., 1981).

Derzeit gibt es zwei anerkannte diagnostische Ansätze: den „Council for International Organizations of Medical Sciences/Roussel Uclaf Causality Assessment Method-Score“ (CIOMS/RUCAM-Score) und die Diagnose durch einen auf diesem Themengebiet erfahrenen Experten. Wobei der Goldstandard in der Expertenmeinung basierend auf der Berücksichtigung des CIOMS/RUCAM-Scores und fallbezogener Daten besteht (Danan & Teschke, 2016). Der CIOMS/RUCAM-Score besteht aus einem Fragebogen mit standardisierten Fragen zu Sachverhalten wie der Latenz zwischen Medikamenteneinnahme und Auftreten der ersten Symptome, der klinischen Präsentation inklusive biochemischem Schädigungsmuster (siehe oben), dem Ausschluss anderer Ursachen, individuellen Risikofaktoren (z. B. begleitender Alkoholkonsum oder Vorerkrankungen) oder die Inzidenz medikamentös-induzierter Schäden innerhalb der mit diesem Medikament behandelten Patientengruppe. Die erreichte Punktezahl und die Wahrscheinlichkeit einer medikamentösen Genese korrelieren hierbei positiv (Danan & Benichou, 1993). Allerdings liefert auch das keine 100%-ige Diagnose.

Die Diagnose begründet sich auch heute weitgehend auf einer Ausschlussdiagnostik. Deshalb ist es wichtig alle wahrscheinlichen Hepatopathien anderer Genese differentialdiagnostisch mittels entsprechender Labortests, gezielter Anamnese und klinischen Merkmalen auszuschließen. Zu bedenken sind hier beispielsweise Hepatitis-A-, -B-, -C-Viren, Herpesviren (EBV/CMV), Autoimmunhepatitiden, alkoholinduzierte Hepatitiden, Abnormitäten der Gallenwege, Herzinsuffizienz, vaskuläre Erkrankungen (Budd-Chiari-Syndrom, Portalvenenthrombose) oder genetisch bedingte Ursachen und Vorerkrankungen wie ein Alpha-1-Antitrypsinmangel, Morbus Wilson oder eine Hämochromatose (Watkins, 2015). Vor allem die Inzidenz von Schädigungen durch Hepatitis-E-Erkrankungen, Nahrungsergänzungsmittel und rein pflanzliche Mittel nimmt stetig zu, so dass auch diese erfragt und in Erwägung gezogen werden sollte (Davern et al., 2011; Navarro et

al., 2014; Navarro & Lucena, 2014). Diese Hepatopathien stellen wiederum selbst einen Risikofaktor für medikamentös-induzierte Schäden dar, indem sie die Leber im Sinne der anfangs erwähnten „Danger-Hypothese“ sensibilisieren. So weisen beispielsweise Patienten mit bestehender Hepatopathie ein erhöhtes Risiko für ein akutes Leberversagen nach Acetaminophen-Überdosis auf (Nguyen, Sam, & Thuluvath, 2008). Chronische Infektionen mit dem Hepatitis C- oder HI-Virus während der Behandlung mit bestimmten Antituberkulotika erhöhen ebenfalls das Risiko für einen medikamentös-induzierten Leberschaden (Lomtadze et al., 2013; Shu et al., 2013).

Trotz der Variabilität nimmt man an, dass die Toxizität eines bestimmten Medikamentes immer wieder den in etwa gleichen Mustern – medikamentenspezifischen „signatures“ – folgt. Sei es in identischen Latenzen bis zum Symptombeginn, gleichem Schädigungsmuster (hepatozellulär, cholestatisch, gemischt), Vorhandensein bestimmter Antikörper oder identischen, extrahepatischen Manifestationen (Watkins, 2015). Dieser Annahme folgend wurde die Internetseite „www.livertox.nih.gov/LiverTox“ zusammen vom „National Institute of Diabetes & Digestive & Kidney Diseases“ und der „National Library of Medicine“ ins Leben gerufen. Für mehr als 600 Substanzen können die jeweilige Klinik und dazu passende Fallstudien eruiert werden. Der Nutzer kann zusätzlich seine Fall-spezifischen Daten eingeben und einen individuellen „Causality Score“, basierend auf dem zuvor beschriebenen CIOMS/RUCAM-Score, berechnen lassen (Hoofnagle, Serrano, Knoben, & Navarro, 2013). Es wird somit jedem ermöglicht, schnellen Zugang zur „expert opinion without the expert“ zu erlangen (Watkins, 2015).

Aber auch diese Diagnostikinstrumente führen meist nur über eine Ausschlussdiagnostik zur somit eben nur „wahrscheinlichsten“ Diagnose „medikamentös-induzierte Hepatotoxizität“.

Betrachtet man also die bereits jahrzehntelang andauernden und doch frustrierten Versuche vor allem auch idiosynkratische Effekte medikamentös-induzierter Hepatotoxizität bis ins Detail zu verstehen, stellt sich die Frage, ob es nicht an der Zeit ist, umzudenken. Die bisherigen diagnostischen Methoden reichen nicht aus, sonst wäre die Kontroverse um medikamentös-induzierte Hepatotoxizität längst kein Thema mehr. Natürlich ist es beim Zulassungsprozess eines Medikamentes in erster Linie wichtig offensichtliche, intrinsische Hepatotoxizitätspotentiale der jeweiligen Substanzen festzustellen. Dass dies mit den bereits vorhandenen in vivo- und in vitro-

Modellen durchaus suffizient durchgeführt werden kann, wurde zu genüge gezeigt. Aber was ist mit den idiosynkratischen Effekten? Es stellt sich die Frage, ob nicht noch zusätzlich an Stelle des zu testenden Medikamentes der eben für die Idiosynkrasie ausschlaggebende jeweilige Patient treten sollte. Der Weg hin zur personalisierten, auf den Patienten abgestimmten Medizin wurde bereits auf den unterschiedlichsten Gebieten eingeläutet. Wäre dies nicht im Hinblick auf medikamentös-induzierte Hepatotoxizität vor allem auch für nicht-suszeptible Patienten von großem Zugewinn? Diese würden von der Behandlung mit einem wiederum für einen anderen Patienten hepatotoxischen Medikament vor allem auch als kurative Option profitieren (siehe die durchaus umstrittene Marktrücknahme von Ximelagatran wie vorausgehend ausgeführt). Schritte in diese Richtung werden bereits immer mehr unternommen. Neue Erkenntnisse können durch die retrospektive Aufarbeitung bisher bekannter Fälle hepatotoxischer Effekte durch ein bestimmtes Medikament im Sinne der LiverTox-Internetseite und ähnlichen bereits erwähnten Diagnostikinstrumenten gewonnen werden. Was hatten die Patienten in diesen Fällen gemeinsam? Waren im Vergleich zu Patienten mit hepatotoxischen Reaktionen bestimmte Enzymaktivitäten erhöht oder erniedrigt? Welches Geschlecht hatten wiederum diese Patienten? Ansatzweise konnten so bereits viele Risiko- und Suszeptibilitätsfaktoren für die Behandlung mit bestimmten Medikamenten identifiziert werden (Abboud & Kaplowitz, 2007; E. S. Bjornsson et al., 2013; Kaplowitz, 2004; Kim & Naisbitt, 2016). Stehen die Patienten nun vor der Therapie mit einem bestimmten Medikament, können sie hinsichtlich der bekannten Risikofaktoren gescreent und die Therapie gegebenenfalls auf ein anderes Medikament umgestellt werden. Auch dies wurde bereits erfolgreich durchgeführt (Cargnin, Jommi, Canonico, Genazzani, & Terrazzino, 2014; P. Chen et al., 2011). Allerdings reagieren nicht alle dieser als Risikopatienten deklarierten Patienten hepatotoxisch auf das Medikament. Die Spezifität dieser Suszeptibilitäts-respektive Risikofaktoren ist bisher relativ gering (Alfirevic & Pirmohamed, 2012). Vielleicht auch weil das Augenmerk bis jetzt noch nicht auf die ausschlaggebenden Biomarker gerichtet wurde. Es muss also zusätzlich die individuelle Anamnese des Patienten mit in die Risiko-Nutzen-Analyse einbezogen werden. Aufgrund fehlender Standardisierung, hoher Kosten und vor allem auch dem Mangel an entsprechenden Informationen wird allerdings standardmäßig kein Risikoprofil des Patienten vor einer medikamentösen Therapie erstellt.

Noch besser wäre es also, wenn man eventuelle Schäden durch ein Medikament frühzeitig zu Beginn der Therapie diagnostizieren könnte. Prätherapeutisch die Reaktion eines Patienten vorherzusagen, beziehungsweise ein allumfassendes präklinisches Testsystem medikamentös-induzierter Hepatotoxizität zu entwickeln, wird wegen der eben ausgeführten Limitationen noch lange ein Problem darstellen. Man geht nun also einen Schritt weiter in den klinischen Bereich. Der Fokus liegt nun auf den Patienten, die bereits unter einer medikamentösen Therapie stehen. Mit neuen Biomarkern und dem Gebiet der „-omics“ wird eine frühzeitige Diagnose medikamentös-induzierter Hepatotoxizität angestrebt (siehe oben). Was macht man nun aber bei Patienten, die unter einer Polymedikation stehen und Zeichen eines Leberschadens zeigen? Theoretisch ist so gut wie jedes Medikament in der Lage schädigend auf die Leber zu wirken. Hier setzt das Konzept um „MetaHeps“ an (Benesic & Gerbes, 2015; Benesic, Leitl, & Gerbes, 2016). Es werden aus dem Blut des jeweiligen Patienten Monozyten extrahiert, aus denen Hepatozyten-ähnliche Zellen entstehen. Diese spiegeln die entsprechenden individuellen biochemischen Eigenschaften, wie beispielsweise die Cytochrom P450-Enzymaktivitäten des Patienten, wider (Benesic, Rahm, Ernst, & Gerbes, 2012). Sie können nun mit den entsprechenden Medikamenten inkubiert werden und lassen die individuelle Reaktion des Patienten auf die Behandlung erkennen. So kann gezielt nach dem schädigenden Agens gesucht werden und eine idiosynkratische medikamentös-induzierte Hepatotoxizität mit einer größeren Spezifität als bisher mit dem RUCAM-Score diagnostiziert und erfolgreich behandelt werden (Benesic & Gerbes, 2015; Benesic et al., 2016).

5 Zusammenfassung

Seit jeher stellt die präklinische Testung und somit die Vorhersage intrinsischer und vor allem idiosynkratischer medikamentös-induzierter Hepatotoxizität ein Problem dar, für das es bis heute keine zufriedenstellende Lösung gibt. Die unterschiedlichsten in vivo- und in vitro-Modelle wurden entwickelt, um die Pathomechanismen dieser komplexen Thematik bis ins kleinste Detail nachzuempfinden. So auch das dieser Arbeit zugrunde liegende Zellsystem bestehend aus 3D InSight™ Human Liver Microtissues. Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob dieses Testsystem zur präklinischen Testung medikamentös-induzierter Hepatotoxizität geeignet ist.

Aus heutiger Sicht gelingt die präklinische in vitro-Testung medikamentös-induzierter Hepatotoxizität am besten in einem 3D-Zellsystem aus primären humanen Hepatozyten und nicht-parenchymatösen Zellen, entsprechend dem dieser Arbeit zugrunde liegenden Zellmodell. Bisher bekannte pathophysiologische Erkenntnisse sowohl intrinsischer als auch idiosynkratischer medikamentös-induzierter Hepatotoxizität konnten im Rahmen dieser Arbeit signifikant und valide reproduzierbar dargestellt werden. Es konnten Aussagen über sowohl akute als auch chronische Effekte medikamentös-induzierter Hepatotoxizität getroffen werden, da stabile Bedingungen der in vivo-Situation entsprechend in Langzeitversuchen über jeweils 28 Tage hinweg aufrechterhalten werden konnten. Ebenfalls konnten individuelle Tendenzen der untersuchten Donoren bezüglich ihrer Ausprägung und der Wahrscheinlichkeit des Auftretens medikamentös-induzierter Hepatotoxizität aufgezeigt werden. Durch die Charakterisierung der Donoren unter anderem hinsichtlich verschiedener Enzymausprägungen, deren Geschlecht und anamnestischer Besonderheiten, konnten zudem Rückschlüsse auf tendenzielle Risikofaktoren für das Auftreten einer medikamentös-induzierten Hepatotoxizität gezogen werden.

Die 3D InSight™ Human Liver Microtissues wurden mit 5 auf unterschiedlichem Wege hepatotoxisch wirkenden Medikamenten in jeweils 4 aufsteigenden Medikamentenkonzentrationen behandelt. Von Acetaminophen, dem bekanntesten Vertreter intrinsischer Hepatotoxizität, bis hin zu Ximelagatran, welches fast ausschließlich idiosynkratisches Hepatotoxizitätspotential besitzt. Mittels Fluoreszenz- und Lumineszenzmessungen zu 4 verschiedenen Zeitpunkten im Laufe der jeweils 28 Tage eines Langzeitversuchs wurden LDH- sowie Caspase-Aktivitäten bestimmt. Dadurch konnten Rückschlüsse auf die Vitalität der Zellen respektive die schädigende Wirkung der Medikamente auf die jeweiligen Zellen gezogen werden, welche sich mit den makroskopischen Veränderungen an den Zellen unter dem Lichtmikroskop deckten.

In Bezug auf Medikamente mit überwiegend intrinsischem Hepatotoxizitätspotential, abhängig von Dosis- und Zeiteffekten, lieferte dieses Zellsystem sehr zufriedenstellende, signifikante Ergebnisse. Allerdings umfasst dies nur einen kleinen Teil medikamentös-induzierter Hepatotoxizität, welcher mittels äquivalenter Testsysteme ebenfalls nachempfunden werden kann. Der Großteil medikamentös-induzierte Hepatotoxizität, welcher wiederum idiosynkratischer Natur ist, wird von sehr

vielen individuellen Effektoren beeinflusst, welche meist von Dosis- und Zeiteffekten sowie auch voneinander selbst unabhängig sind. Das Zusammenwirken all dieser Effektoren zu entschlüsseln und dann in einem Testsystem abzubilden stößt auch in diesem Zellsystem an seine Grenzen. Die durch diese Langzeitversuche gewonnenen Erkenntnisse decken sich überwiegend mit den Thesen der aktuellen Literatur zu diesem Thema. Neue Erkenntnisse durch dieses Zellsystem zu erlangen stellte sich aber schwierig dar.

Die 3D Human Liver Microtissues stellen somit ein vielversprechendes präklinisches in vitro-Modell zur Testung medikamentös-induzierter Hepatotoxizität dar. Sie stoßen aber bei der Darstellung der idiosynkratischen Mechanismen, wie alle präklinischen Testsysteme davor, an ihre Grenzen.

Betrachtet man zudem die klinische Relevanz der hierdurch gewonnenen Erkenntnisse, stellt man fest, dass der Patient als Individuum in der Realität teils paradox und doch anders als vorhergesagt auf eine medikamentöse Therapie reagiert. Diese überwiegend idiosynkratische medikamentös-induzierte Hepatotoxizität, genauso wie der Mensch selbst, ist so komplex aufgebaut, dass eine in vitro-Darstellung wohl auch in Zukunft nur schwer bis ins kleinste Detail möglich sein wird. Aber wenn man das idiosynkratische medikamentös-induzierte Hepatotoxizitätspotential auch genauer in einem in vitro System darstellen und somit besser vorhersehen könnte schließt dies keines Falls aus, dass eine Großzahl, wenn nicht sogar eine Mehrzahl der Patienten erfolgreich mit eben diesem für manche Individuen toxischen Medikament therapiert werden könnten (siehe Amiodaron oder Diclofenac). Gerade die Individualität jedes Patienten, nicht nur auf biochemischer Ebene, macht deutlich, dass man neben dem Fortschritt im Bereich präklinischer Medikamententestung auch einen Fortschritt im Bereich der Diagnostik medikamentös-induzierter Hepatotoxizität braucht. Ein Risikoprofil des Patienten kann durchaus präklinisch vor einer medikamentösen Therapie erstellt werden, doch wird die Reaktion des Patienten auch genau wie vorhergesagt eintreffen? Wahrscheinlich ja, vielleicht aber auch nicht. In diesem Falle könnte folglich eine mit hoher Wahrscheinlichkeit auftretende hepatotoxische Reaktion ausbleiben und der Patient hätte durch die ihm verwehrt medikamentöse Therapie womöglich geheilt werden können. Er hätte sie aber als sogenannter Risikopatient nie erhalten. Eine im Vergleich zu heute frühere, sensitivere sowie auch spezifischere klinische und nicht bereits präklinische Diagnostik medikamentös-induzierter Hepatotoxizität ist hier nun

vonnöten, um dem Patienten eine sichere Anwendung medikamentöser Therapien mit Aussicht auf dauerhafte Heilung zu ermöglichen. Erste Schritte hin zu dieser personalisierten Medizin sind bereits getan, liefern vielversprechende Ergebnisse und geben Hoffnung, die Herausforderung der bereits 1965 postulierten „penalty for progress“ (Popper et al., 1965) erfolgversprechend angenommen und daraus gelernt zu haben.

A Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
%	Prozent
+/-	Standardabweichung oder in 3.1.1-3.1.5 Standardfehler des Mittelwertes
Abb.	Abbildung
ALT	Alaninaminotransferase
Amio	Amiodaron
AP	Alkalische Phosphatase
APAP	Acetaminophen
AST	Aspartataminotransferase
ATP	Adenosintriphosphat
CIOMS	Council for International Organizations of Medical Sciences
C _{max}	Maximale Konzentration
CMV	Zytomegalievirus
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
con	Kontrolle
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
CYP	Cytochrom P450-Enzym
2D	2-dimensional
3D	3-dimensional
DEVD	Peptid aus 2 Asparaginsäure, Glutaminsäure und Valin
Diclo	Diclofenac
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EBV	Epstein-Barr-Virus
ECOD	Ethoxycoumarin-O-Deethylase
g	Gramm
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HLA	Humanes Leukozyten Antigen

HMGB1-Proteine	High mobility group box 1-Proteine
IgG	Immunglobulin G
INH	Isoniazid
l	Liter
LDH	Laktatdehydrogenase
m	Milli-
M	Molar (=mol/l)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute
mol	Basiseinheit der Stoffmenge
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
MW	Mittelwert
μ	Mikro-
n	Nano-
NADH/ NAD ⁺	Nicotinamidadenindinukleotid
OSAS	Obstruktives Schlafapnoesyndrom
p	Signifikanzwert
PBS	Phosphate-buffered Saline (Tris-gepufferte Kochsalzlösung)
PCLS	Precision Cut Liver Slices (Leberschnitte)
rpm	Revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
RNA	Ribonukleinsäure
RUCAM	Roussel Uclaf Causality Assessment Method
s	Sekunde
ST	Sulfotransferase
Tween20 [®]	Poly(oxy-1,2-ethandiyl)- monododekansäure-sorbitylester
U	Umdrehung
UGT	UDP-Glucuronosyltransferase
ULN	Upper limit of normal (höchster noch normaler Wert)
v	Geschwindigkeit
V. a.	Verdacht auf
Xime	Ximelagatran
z. B.	zum Beispiel
Z. n.	Zustand nach

B Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Produktionsschritte des 3D InSight™ Human Liver Microtissues (Messner et al., 2013)	16
Abbildung 2 Schematische Darstellung einer 96-Well-Platte beim erstmaligen Medienwechsel mit den Inkubationslösungen.....	24
Abbildung 3 Schematische Darstellung einer 96-Well-Platte an den ersten 10 Tagen	25
Abbildung 4 Ansetzen der Pipettenspitze beim Aspirieren (A) und Zugeben (B) der jeweiligen Flüssigkeit laut Herstellerangaben	26
Abbildung 5 Schematische Darstellung einer 96-Well-Platte ab dem 11. Tag des jeweiligen Versuchs	26
Abbildung 6 Aspiration des Microtissues mit der 1ml-Pipettenspitze laut Herstellerangaben.....	27
Abbildung 7 Reaktion des CellTiter-Blue® Cell Viability Assays.....	28
Abbildung 8 Reaktionswege des Caspase-Glo® 3/7-Assays	30
Abbildung 9 Chemische Reaktionen des CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assays	31
Abbildung 10 Brandplatte mit Überständen des Donors IGM vor der Messung mit dem GloMax®-Multi + Detection System an Tag 4 des Langzeitversuchs; rot (entspricht viel LDH) links unten Positiv-Kontrolle (Tween20®) und rechts Amiodaron 50µM und 100µM.....	32
Abbildung 11 IGM a) Kontrolle Tag 10 b) Tween20® nach 4h Inkubation.....	37
Abbildung 12 Acetaminophen - LDH-Aktivität der Lysate an Tag 28	39
Abbildung 13 Acetaminophen - Durchschnittliche Caspase-Aktivität an Tag 28.....	40
Abbildung 14 IGM unbehandelt	40
Abbildung 15 IGM Tag 10 a) Kontrolle b) APAP 0,1mM c) APAP 0,5mM d) APAP 1mM	41
Abbildung 16 IGM Tag 21 a) Kontrolle b) APAP 0,1mM c) APAP 0,5mM d) APAP 1mM	41
Abbildung 17 Amiodaron - LDH-Aktivität der Lysate an Tag 28.....	43
Abbildung 18 Amiodaron - Durchschnittliche Caspase-Aktivität an Tag 28	44
Abbildung 19 IGM unbehandelt	45

Abbildung 20 IGM Tag 10 a) Kontrolle b) Amiodaron 5µM c) Amiodaron 10µM d) Amiodaron 50µM.....	45
Abbildung 21 IGM Tag 21 a) Kontrolle b) Amiodaron 5µM c) Amiodaron 10µM d) Amiodaron 50µM.....	45
Abbildung 22 Diclofenac - LDH-Aktivität der Lysate an Tag 28	47
Abbildung 23 Diclofenac - Durchschnittliche Caspase-Aktivität an Tag 28.....	48
Abbildung 24 IGM unbehandelt	48
Abbildung 25 IGM Tag 10 a) Kontrolle b) Diclofenac 5µM c) Diclofenac 10µM d) Diclofenac 50µM	49
Abbildung 26 IGM Tag 21 a) Kontrolle b) Diclofenac 5µM c) Diclofenac 10µM d) Diclofenac 50µM	49
Abbildung 27 Isoniazid - LDH-Aktivität der Lysate an Tag 28.....	51
Abbildung 28 Isoniazid - Durchschnittliche Caspase-Aktivität an Tag 28	51
Abbildung 29 IGM unbehandelt	52
Abbildung 30 IGM Tag 10 a) Kontrolle b) Isoniazid 10µM c) Isoniazid 50µM d) Isoniazid 100µM	52
Abbildung 31 IGM Tag 21 a) Kontrolle b) Isoniazid 10µM c) Isoniazid 50µM d) Isoniazid 100µM	53
Abbildung 32 Ximelagatran - LDH-Aktivität der Lysate an Tag 28.....	54
Abbildung 33 Ximelagatran - Durchschnittliche Caspase-Aktivität an Tag 28	55
Abbildung 34 IGM unbehandelt	56
Abbildung 35 IGM Tag 10 a) Kontrolle b) Ximelagatran 1µM c) Ximelagatran 5µM .	56
Abbildung 36 IGM Tag 21 a) Kontrolle b) Ximelagatran 1µM c) Ximelagatran 5µM .	56
Abbildung 37 Der Anteil von idiosynkratischem und intrinsischem Hepatotoxizitätspotential an den verwendeten Medikamenten	57
Abbildung 38 Acetaminophen 1mM - LDH-Release im Verlauf	58
Abbildung 39 Diclofenac 10µM - LDH-Release im Verlauf	59
Abbildung 40 Amiodaron 10µM - LDH-Release im Verlauf.....	60
Abbildung 41 Amiodaron 50µM - LDH-Release der 2 Versuche im Vergleich.....	61
Abbildung 42 Donor FOS - LDH-Release im Verlauf.....	62
Abbildung 43 Ximelagatran 50µM - LDH-Release im Verlauf.....	68
Abbildung 44 Isoniazid 100µM - LDH-Release im Verlauf.....	69

C Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Konzentrationen der verwendeten Medikamente.....	21
Tabelle 2 Allgemeine Anamnese der 3 Donoren des ersten Langzeitversuchs.....	21
Tabelle 3 Allgemeine Anamnese der 3 Donoren des zweiten Langzeitversuchs.....	22
Tabelle 4 Enzymaktivitäten der 6 Donoren.....	22
Tabelle 5 Konzentrationen der verwendeten Stock Solutions (A) und die im Versuch verwendeten Medikamentenkonzentrationen (B).....	25
Tabelle 6 LDH-Release der Kontrollen des jeweiligen Donors	35
Tabelle 7 Mittelwert der LDH-Release-Daten der Kontrollen des jeweiligen Donors	35
Tabelle 8 LDH-Aktivität der Lysate der Kontrollen an Tag 28.....	36
Tabelle 9 LDH-Release-Werte an Tag 4 nach Inkubation mit Tween20®.....	36
Tabelle 10 Acetaminophen – LDH-Release-Mittelwerte aller 6 Donoren in Prozent.	38
Tabelle 11 LDH-Aktivität der Lysate an Tag 28 nach Inkubation mit Acetaminophen	39
Tabelle 12 Caspase-Aktivitäten an Tag 28 nach Inkubation mit Acetaminophen als x- faches der Kontrolle	40
Tabelle 13 Amiodaron – LDH-Release-Mittelwerte aller 6 Donoren in Prozent	42
Tabelle 14 LDH-Aktivität der Lysate an Tag 28 nach Inkubation mit Amiodaron.....	43
Tabelle 15 Caspase-Aktivitäten an Tag 28 nach Inkubation mit Amiodaron als x-faches der Kontrolle.....	44
Tabelle 16 Diclofenac – LDH-Release-Mittelwerte aller 6 Donoren in Prozent.....	46
Tabelle 17 LDH-Aktivität der Lysate an Tag 28 nach Inkubation mit Diclofenac.....	47
Tabelle 18 Caspase-Aktivitäten an Tag 28 nach der Inkubation mit Diclofenac als x- faches der Kontrolle	48
Tabelle 19 Isoniazid – LDH-Release-Mittelwerte aller 6 Donoren in Prozent	50
Tabelle 20 LDH-Aktivität der Lysate an Tag 28 nach Inkubation mit Isoniazid	50
Tabelle 21 Caspase-Aktivitäten an Tag 28 nach der Inkubation mit Isoniazid als x- faches der Kontrolle	52
Tabelle 22 Ximelagatran – LDH-Release-Mittelwerte aller 6 Donoren in Prozent	53
Tabelle 23 LDH-Aktivität der Lysate an Tag 28 nach Inkubation mit Ximelagatran ..	54
Tabelle 24 Caspase-Aktivitäten an Tag 28 nach der Inkubation mit Ximelagatran als x- faches der Kontrolle	55
Tabelle 25 LDH-Aktivität der Lysate an Tag 28 nach Inkubation mit Acetaminophen	58
Tabelle 26 LDH-Aktivität der Lysate an Tag 28 nach Inkubation mit Diclofenac.....	59

Tabelle 27 LDH-Aktivität der Lysate an Tag 28 nach Inkubation mit Amiodaron.....	60
Tabelle 28 LDH-Release-Mittelwerte der 2 Versuche im Vergleich	60
Tabelle 29 LDH-Release aus den Überständen von Donor FOS im Verlauf nach Inkubation mit Acetaminophen 1mM (a), Diclofenac 10µM (b) und Amiodaron 10µM (c).....	61
Tabelle 30 Caspase-Aktivitäten an Tag 28 nach Inkubation mit 1mM und 5mM Acetaminophen als x-faches der Kontrolle.....	62
Tabelle 31 Caspase-Aktivitäten an Tag 28 nach Inkubation mit 50µM und 100µM Diclofenac als x-faches der Kontrolle	63
Tabelle 32 Caspase-Aktivitäten an Tag 28 nach Inkubation mit 50µM und 100µM Amiodaron als x-faches der Kontrolle	63
Tabelle 33 Enzymaktivitäten der Donoren IZT, SSR und IGM im Vergleich	64
Tabelle 34 Allgemeine Anamnese der Donoren IZT, SSR und IGM.....	65
Tabelle 35 Serologische Befunde der Donoren IZT, SSR und IGM.....	65
Tabelle 36 Enzymaktivitäten der Donoren EPB und QQE im Vergleich	66
Tabelle 37 Allgemeine Anamnese der Donoren QQE und EPB	67
Tabelle 38 Serologische Befunde der Donoren QQE und EPB.....	67
Tabelle 39 LDH-Aktivität der Lysate an Tag 28 nach Inkubation mit Ximelagatran ..	68
Tabelle 40 LDH-Release im Verlauf nach Inkubation mit Ximelagatran 50µM	68
Tabelle 41 LDH-Aktivität der Lysate an Tag 28 nach Inkubation mit Isoniazid	69
Tabelle 42 Caspase-Aktivitäten an Tag 28 nach Inkubation mit 50µM Ximelagatran als x-faches der Kontrolle	70

D Literaturverzeichnis

Paper und Bücher:

- Abboud, G., & Kaplowitz, N. (2007). Drug-induced liver injury. *Drug Saf*, 30(4), 277-294.
- Aithal, G. P., Watkins, P. B., Andrade, R. J., Larrey, D., Molokhia, M., Takikawa, H., et al. (2011). Case definition and phenotype standardization in drug-induced liver injury. *Clin Pharmacol Ther*, 89(6), 806-815.
- Alfirevic, A., & Pirmohamed, M. (2012). Predictive genetic testing for drug-induced liver injury: considerations of clinical utility. *Clin Pharmacol Ther*, 92(3), 376-380.
- Amacher, D. E. (1998). Serum transaminase elevations as indicators of hepatic injury following the administration of drugs. *Regul Toxicol Pharmacol*, 27(2), 119-130.
- Andrade, R. J., Lucena, M. I., Fernandez, M. C., Pelaez, G., Pachkoria, K., Garcia-Ruiz, E., et al. (2005). Drug-induced liver injury: an analysis of 461 incidences submitted to the Spanish registry over a 10-year period. *Gastroenterology*, 129(2), 512-521.
- Anson, B. D., Kolaja, K. L., & Kamp, T. J. (2011). Opportunities for use of human iPS cells in predictive toxicology. *Clin Pharmacol Ther*, 89(5), 754-758.
- Antherieu, S., Chesne, C., Li, R., Camus, S., Lahoz, A., Picazo, L., et al. (2010). Stable expression, activity, and inducibility of cytochromes P450 in differentiated HepaRG cells. *Drug Metab Dispos*, 38(3), 516-525.
- Antoine, D. J., Williams, D. P., Kipar, A., Jenkins, R. E., Regan, S. L., Sathish, J. G., et al. (2009). High-mobility group box-1 protein and keratin-18, circulating serum proteins informative of acetaminophen-induced necrosis and apoptosis in vivo. *Toxicol Sci*, 112(2), 521-531.
- Armbruster, D. A., & Pry, T. (2008). Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation. *Clin Biochem Rev*, 29 Suppl 1, S49-52.
- Au, J. S., Navarro, V. J., & Rossi, S. (2011). Review article: Drug-induced liver injury--its pathophysiology and evolving diagnostic tools. *Aliment Pharmacol Ther*, 34(1), 11-20.
- Benesic, A., & Gerbes, A. L. (2015). Drug-Induced Liver Injury and Individual Cell Models. *Dig Dis*, 33(4), 486-491.
- Benesic, A., Leidl, A., & Gerbes, A. L. (2016). Monocyte-derived hepatocyte-like cells for causality assessment of idiosyncratic drug-induced liver injury. *Gut*, 65(9), 1555-1563.
- Benesic, A., Rahm, N. L., Ernst, S., & Gerbes, A. L. (2012). Human monocyte-derived cells with individual hepatocyte characteristics: a novel tool for personalized in vitro studies. *Lab Invest*, 92(6), 926-936.
- Bierthon, C., Gilbert, J. D., Kostakis, C., & Langlois, N. E. (2013). Route of drug administration may influence toxicological levels in the liver. *J Clin Pathol*, 66(7), 630-631.
- Birney, E., Smith, G. D., & Grealley, J. M. (2016). Epigenome-wide Association Studies and the Interpretation of Disease -Omics. *PLoS Genet*, 12(6), e1006105.
- Bjornsson, E. (2010). Review article: drug-induced liver injury in clinical practice. *Aliment Pharmacol Ther*, 32(1), 3-13.
- Bjornsson, E., Kalaitzakis, E., & Olsson, R. (2007). The impact of eosinophilia and hepatic necrosis on prognosis in patients with drug-induced liver injury. *Aliment Pharmacol Ther*, 25(12), 1411-1421.
- Bjornsson, E., & Olsson, R. (2005). Outcome and prognostic markers in severe drug-induced liver disease. *Hepatology*, 42(2), 481-489.

- Bjornsson, E., Talwalkar, J., Treeprasertsuk, S., Kamath, P. S., Takahashi, N., Sanderson, S., et al. (2010). Drug-induced autoimmune hepatitis: clinical characteristics and prognosis. *Hepatology*, *51*(6), 2040-2048.
- Bjornsson, E. S., Bergmann, O. M., Bjornsson, H. K., Kvaran, R. B., & Olafsson, S. (2013). Incidence, presentation, and outcomes in patients with drug-induced liver injury in the general population of Iceland. *Gastroenterology*, *144*(7), 1419-1425, 1425 e1411-1413; quiz e1419-1420.
- Boelsterli, U. A. (2003). Diclofenac-induced liver injury: a paradigm of idiosyncratic drug toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*, *192*(3), 307-322.
- 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. *J Pharmacol Exp Ther*, *288*(1), 65-72.
- Bower, W. A., Johns, M., Margolis, H. S., Williams, I. T., & Bell, B. P. (2007). Population-based surveillance for acute liver failure. *Am J Gastroenterol*, *102*(11), 2459-2463.
- Brennan, F. J., Brien, J. F., & Armstrong, P. W. (1991). Plasma concentration time course and pharmacological effects of a standardized oral amiodarone dosing regimen in humans. *Can J Cardiol*, *7*(3), 117-124.
- Cargnin, S., Jommi, C., Canonico, P. L., Genazzani, A. A., & Terrazzino, S. (2014). Diagnostic accuracy of HLA-B*57:01 screening for the prediction of abacavir hypersensitivity and clinical utility of the test: a meta-analytic review. *Pharmacogenomics*, *15*(7), 963-976.
- Chalasani, N., & Bjornsson, E. (2010). Risk factors for idiosyncratic drug-induced liver injury. *Gastroenterology*, *138*(7), 2246-2259.
- Chen, M., Bisgin, H., Tong, L., Hong, H., Fang, H., Borlak, J., et al. (2014). Toward predictive models for drug-induced liver injury in humans: are we there yet? *Biomark Med*, *8*(2), 201-213.
- Chen, M., Borlak, J., & Tong, W. (2013). High lipophilicity and high daily dose of oral medications are associated with significant risk for drug-induced liver injury. *Hepatology*, *58*(1), 388-396.
- Chen, M., Suzuki, A., Borlak, J., Andrade, R. J., & Lucena, M. I. (2015). Drug-induced liver injury: Interactions between drug properties and host factors. *J Hepatol*, *63*(2), 503-514.
- Chen, P., Lin, J. J., Lu, C. S., Ong, C. T., Hsieh, P. F., Yang, C. C., et al. (2011). Carbamazepine-induced toxic effects and HLA-B*1502 screening in Taiwan. *N Engl J Med*, *364*(12), 1126-1133.
- Chideya, S., Winston, C. A., Peloquin, C. A., Bradford, W. Z., Hopewell, P. C., Wells, C. D., et al. (2009). Isoniazid, rifampin, ethambutol, and pyrazinamide pharmacokinetics and treatment outcomes among a predominantly HIV-infected cohort of adults with tuberculosis from Botswana. *Clin Infect Dis*, *48*(12), 1685-1694.
- Danan, G., & Benichou, C. (1993). Causality assessment of adverse reactions to drugs--I. A novel method based on the conclusions of international consensus meetings: application to drug-induced liver injuries. *J Clin Epidemiol*, *46*(11), 1323-1330.
- Danan, G., & Teschke, R. (2016). RUCAM in Drug and Herb Induced Liver Injury: The Update. *Int J Mol Sci*, *17*(1).
- Davern, T. J., Chalasani, N., Fontana, R. J., Hayashi, P. H., Protiva, P., Kleiner, D. E., et al. (2011). Acute hepatitis E infection accounts for some cases of suspected drug-induced liver injury. *Gastroenterology*, *141*(5), 1665-1672 e1661-1669.

- de Graaf, I. A., de Kanter, R., de Jager, M. H., Camacho, R., Langenkamp, E., van de Kerkhof, E. G., et al. (2006). Empirical validation of a rat in vitro organ slice model as a tool for in vivo clearance prediction. *Drug Metab Dispos*, 34(4), 591-599.
- de Graaf, I. A., Olinga, P., de Jager, M. H., Merema, M. T., de Kanter, R., van de Kerkhof, E. G., et al. (2010). Preparation and incubation of precision-cut liver and intestinal slices for application in drug metabolism and toxicity studies. *Nat Protoc*, 5(9), 1540-1551.
- Dear, J. W., Antoine, D. J., Starkey-Lewis, P., Goldring, C. E., & Park, B. K. (2014). Early detection of paracetamol toxicity using circulating liver microRNA and markers of cell necrosis. *Br J Clin Pharmacol*, 77(5), 904-905.
- Donato, M. T., Jover, R., & Gomez-Lechon, M. J. (2013). Hepatic cell lines for drug hepatotoxicity testing: limitations and strategies to upgrade their metabolic competence by gene engineering. *Curr Drug Metab*, 14(9), 946-968.
- Dunn, J. C., Tompkins, R. G., & Yarmush, M. L. (1991). Long-term in vitro function of adult hepatocytes in a collagen sandwich configuration. *Biotechnol Prog*, 7(3), 237-245.
- 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. *Faseb j*, 3(2), 174-177.
- Eichelbaum, M., Kroemer, H. K., & Mikus, G. (1992). Genetically determined differences in drug metabolism as a risk factor in drug toxicity. *Toxicol Lett*, 64-65 Spec No, 115-122.
- Elferink, M. G., Olinga, P., Draaisma, A. L., Merema, M. T., Bauerschmidt, S., Polman, J., et al. (2008). Microarray analysis in rat liver slices correctly predicts in vivo hepatotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*, 229(3), 300-309.
- Fahy, G. M., Guan, N., de Graaf, I. A., Tan, Y., Griffin, L., & Groothuis, G. M. (2013). Cryopreservation of precision-cut tissue slices. *Xenobiotica*, 43(1), 113-132.
- Faulkner, L., Meng, X., Park, B. K., & Naisbitt, D. J. (2014). The importance of hapten-protein complex formation in the development of drug allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 14(4), 293-300.
- Fisher, K., Vuppalanchi, R., & Saxena, R. (2015). Drug-Induced Liver Injury. *Arch Pathol Lab Med*, 139(7), 876-887.
- Fujimura, H., Murakami, N., Miwa, S., Aruga, C., & Toriumi, W. (2012). The suitability of rat hepatoma cell line H4IIE for evaluating the potentials of compounds to induce CYP3A23 expression. *Exp Toxicol Pathol*, 64(5), 527-533.
- Goda, K., Takahashi, T., Kobayashi, A., Shoda, T., Kuno, H., & Sugai, S. (2016). Usefulness of in vitro combination assays of mitochondrial dysfunction and apoptosis for the estimation of potential risk of idiosyncratic drug induced liver injury. *J Toxicol Sci*, 41(5), 605-615.
- Godoy, P., Hewitt, N. J., Albrecht, U., Andersen, M. E., Ansari, N., Bhattacharya, S., et al. (2013). Recent advances in 2D and 3D in vitro systems using primary hepatocytes, alternative hepatocyte sources and non-parenchymal liver cells and their use in investigating mechanisms of hepatotoxicity, cell signaling and ADME. *Arch Toxicol*, 87(8), 1315-1530.
- Gomez-Lechon, M. J., Lahoz, A., Jimenez, N., Vicente Castell, J., & Donato, M. T. (2006). Cryopreservation of rat, dog and human hepatocytes: influence of preculture and cryoprotectants on recovery, cytochrome P450 activities and induction upon thawing. *Xenobiotica*, 36(6), 457-472.

- Graaf, I. A., Groothuis, G. M., & Olinga, P. (2007). Precision-cut tissue slices as a tool to predict metabolism of novel drugs. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 3(6), 879-898.
- Greene, S. L., Dargan, P. I., Leman, P., & Jones, A. L. (2006). Paracetamol availability and recent changes in paracetamol poisoning: is the 1998 legislation limiting availability of paracetamol being followed? *Postgrad Med J*, 82(970), 520-523.
- Guguen-Guillouzo, C., Corlu, A., & Guillouzo, A. (2010). Stem cell-derived hepatocytes and their use in toxicology. *Toxicology*, 270(1), 3-9.
- Guillouzo, A., Corlu, A., Aninat, C., Glaise, D., Morel, F., & Guguen-Guillouzo, C. (2007). The human hepatoma HepaRG cells: a highly differentiated model for studies of liver metabolism and toxicity of xenobiotics. *Chem Biol Interact*, 168(1), 66-73.
- Gulmez, S. E., Larrey, D., Pageaux, G. P., Lignot, S., Lassalle, R., Jove, J., et al. (2013). Transplantation for acute liver failure in patients exposed to NSAIDs or paracetamol (acetaminophen): the multinational case-population SALT study. *Drug Saf*, 36(2), 135-144.
- Halegoua-De Marzio, D., & Navarro, V. J. (2008). Drug-induced hepatotoxicity in humans. *Curr Opin Drug Discov Devel*, 11(1), 53-59.
- Hariparsad, N., Carr, B. A., Evers, R., & Chu, X. (2008). Comparison of immortalized Fa2N-4 cells and human hepatocytes as in vitro models for cytochrome P450 induction. *Drug Metab Dispos*, 36(6), 1046-1055.
- Harris, L., McKenna, W. J., Rowland, E., Holt, D. W., Storey, G. C., & Krikler, D. M. (1983). Side effects of long-term amiodarone therapy. *Circulation*, 67(1), 45-51.
- Hassan, H. M., Guo, H. L., Yousef, B. A., Luyong, Z., & Zhenzhou, J. (2015). Hepatotoxicity mechanisms of isoniazid: A mini-review. *J Appl Toxicol*, 35(12), 1427-1432.
- Hewitt, N. J., Lechon, M. J., Houston, J. B., Hallifax, D., Brown, H. S., Maurel, P., et al. (2007). Primary hepatocytes: current understanding of the regulation of metabolic enzymes and transporter proteins, and pharmaceutical practice for the use of hepatocytes in metabolism, enzyme induction, transporter, clearance, and hepatotoxicity studies. *Drug Metab Rev*, 39(1), 159-234.
- Ho, R. H., Leake, B. F., Kilkenny, D. M., Meyer Zu Schwabedissen, H. E., Glaeser, H., Kroetz, D. L., et al. (2010). Polymorphic variants in the human bile salt export pump (BSEP; ABCB11): functional characterization and interindividual variability. *Pharmacogenet Genomics*, 20(1), 45-57.
- Hoofnagle, J. H., Serrano, J., Knoben, J. E., & Navarro, V. J. (2013). LiverTox: a website on drug-induced liver injury. *Hepatology*, 57(3), 873-874.
- Hughes, J. D., Blagg, J., Price, D. A., Bailey, S., Decrescenzo, G. A., Devraj, R. V., et al. (2008). Physicochemical drug properties associated with in vivo toxicological outcomes. *Bioorg Med Chem Lett*, 18(17), 4872-4875.
- Hussaini, S. H., & Farrington, E. A. (2007). Idiosyncratic drug-induced liver injury: an overview. *Expert Opin Drug Saf*, 6(6), 673-684.
- Jaeschke, H. (2011). Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury: Present concepts. *J Gastroenterol Hepatol*, 26 Suppl 1, 173-179.
- Jaeschke, H. (2015). Acetaminophen: Dose-Dependent Drug Hepatotoxicity and Acute Liver Failure in Patients. *Dig Dis*, 33(4), 464-471.
- Jaeschke, H., Cover, C., & Bajt, M. L. (2006). Role of caspases in acetaminophen-induced liver injury. *Life Sci*, 78(15), 1670-1676.

- Jaeschke, H., Farhood, A., Bautista, A. P., Spolarics, Z., & Spitzer, J. J. (1993). Complement activates Kupffer cells and neutrophils during reperfusion after hepatic ischemia. *Am J Physiol*, 264(4 Pt 1), G801-809.
- Jaeschke, H., Gores, G. J., Cederbaum, A. I., Hinson, J. A., Pessayre, D., & Lemasters, J. J. (2002). Mechanisms of Hepatotoxicity. *Toxicological Sciences*, 65(2), 166-176.
- James, L. P., Mayeux, P. R., & Hinson, J. A. (2003). Acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Drug Metab Dispos*, 31(12), 1499-1506.
- Josse, R., Aninat, C., Glaise, D., Dumont, J., Fessard, V., Morel, F., et al. (2008). Long-term functional stability of human HepaRG hepatocytes and use for chronic toxicity and genotoxicity studies. *Drug Metab Dispos*, 36(6), 1111-1118.
- Ju, C. (2005). Immunological mechanisms of drug-induced liver injury. *Curr Opin Drug Discov Devel*, 8(1), 38-43.
- Kanebratt, K. P., & Andersson, T. B. (2008a). Evaluation of HepaRG cells as an in vitro model for human drug metabolism studies. *Drug Metab Dispos*, 36(7), 1444-1452.
- Kanebratt, K. P., & Andersson, T. B. (2008b). HepaRG cells as an in vitro model for evaluation of cytochrome P450 induction in humans. *Drug Metab Dispos*, 36(1), 137-145.
- Kaplowitz, N. (2004). Drug-induced liver injury. *Clin Infect Dis*, 38 Suppl 2, S44-48.
- Kaplowitz, N. (2005). Idiosyncratic drug hepatotoxicity. *Nat Rev Drug Discov*, 4(6), 489-499.
- Kaplowitz, N. (2013). Avoiding idiosyncratic DILI: two is better than one. *Hepatology*, 58(1), 15-17.
- Kass, G. E., Macanas-Pirard, P., Lee, P. C., & Hinton, R. H. (2003). The role of apoptosis in acetaminophen-induced injury. *Ann N Y Acad Sci*, 1010, 557-559.
- Kenny, J. R., Chen, L., McGinnity, D. F., Grime, K., Shakesheff, K. M., Thomson, B., et al. (2008). Efficient assessment of the utility of immortalized Fa2N-4 cells for cytochrome P450 (CYP) induction studies using multiplex quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (qRT-PCR) and substrate cassette methodologies. *Xenobiotica*, 38(12), 1500-1517.
- Kensler, T. W., Wakabayashi, N., & Biswal, S. (2007). Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 47, 89-116.
- Kia, R., Sison, R. L., Heslop, J., Kitteringham, N. R., Hanley, N., Mills, J. S., et al. (2013). Stem cell-derived hepatocytes as a predictive model for drug-induced liver injury: are we there yet? *Br J Clin Pharmacol*, 75(4), 885-896.
- Kim, S. H., & Naisbitt, D. J. (2016). Update on Advances in Research on Idiosyncratic Drug-Induced Liver Injury. *Allergy Asthma Immunol Res*, 8(1), 3-11.
- Klassen, L. W., Thiele, G. M., Duryee, M. J., Schaffert, C. S., DeVeney, A. L., Hunter, C. D., et al. (2008). An in vitro method of alcoholic liver injury using precision-cut liver slices from rats. *Biochem Pharmacol*, 76(3), 426-436.
- Kmiec, Z. (2001). Cooperation of liver cells in health and disease. *Adv Anat Embryol Cell Biol*, 161, lii-xiii, 1-151.
- Kobori, L., Kohalmy, K., Porrogi, P., Sarvary, E., Gerlei, Z., Fazakas, J., et al. (2008). Drug-induced liver graft toxicity caused by cytochrome P450 poor metabolism. *Br J Clin Pharmacol*, 65(3), 428-436.
- Laine, J. E., Auriola, S., Pasanen, M., & Juvonen, R. O. (2009). Acetaminophen bioactivation by human cytochrome P450 enzymes and animal microsomes. *Xenobiotica*, 39(1), 11-21.

- Lammert, C., Bjornsson, E., Niklasson, A., & Chalasani, N. (2010). Oral medications with significant hepatic metabolism at higher risk for hepatic adverse events. *Hepatology*, *51*(2), 615-620.
- Lammert, C., Einarsson, S., Saha, C., Niklasson, A., Bjornsson, E., & Chalasani, N. (2008). Relationship between daily dose of oral medications and idiosyncratic drug-induced liver injury: search for signals. *Hepatology*, *47*(6), 2003-2009.
- Larrey, D., & Pageaux, G. P. (2005). Drug-induced acute liver failure. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, *17*(2), 141-143.
- Larson, A. M. (2007). Acetaminophen hepatotoxicity. *Clin Liver Dis*, *11*(3), 525-548, vi.
- Larson, A. M., Polson, J., Fontana, R. J., Davern, T. J., Lalani, E., Hynan, L. S., et al. (2005). Acetaminophen-induced acute liver failure: results of a United States multicenter, prospective study. *Hepatology*, *42*(6), 1364-1372.
- Lavergne, S. N., Park, B. K., & Naisbitt, D. J. (2008). The roles of drug metabolism in the pathogenesis of T-cell-mediated drug hypersensitivity. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, *8*(4), 299-307.
- Lecluyse, E. L., & Alexandre, E. (2010). Isolation and culture of primary hepatocytes from resected human liver tissue. *Methods Mol Biol*, *640*, 57-82.
- LeCluyse, E. L., Witek, R. P., Andersen, M. E., & Powers, M. J. (2012). Organotypic liver culture models: meeting current challenges in toxicity testing. *Crit Rev Toxicol*, *42*(6), 501-548.
- Lee, S. J., Lee, Y. J., & Park, K. K. (2016). The pathogenesis of drug-induced liver injury. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 1-11.
- Lee, W. M. (2003). Drug-induced hepatotoxicity. *N Engl J Med*, *349*(5), 474-485.
- Lee, W. M. (2012). Recent developments in acute liver failure. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, *26*(1), 3-16.
- Lee, W. M., Larrey, D., Olsson, R., Lewis, J. H., Keisu, M., Auclert, L., et al. (2005). Hepatic findings in long-term clinical trials of ximelagatran. *Drug Saf*, *28*(4), 351-370.
- Levy, M. (1997). Role of viral infections in the induction of adverse drug reactions. *Drug Saf*, *16*(1), 1-8.
- Li, A. P. (2010). Evaluation of drug metabolism, drug-drug interactions, and in vitro hepatotoxicity with cryopreserved human hepatocytes. *Methods Mol Biol*, *640*, 281-294.
- Li, J., & Uetrecht, J. P. (2010). The danger hypothesis applied to idiosyncratic drug reactions. *Handb Exp Pharmacol*(196), 493-509.
- Licata, A. (2016). Adverse drug reactions and organ damage: The liver. *Eur J Intern Med*, *28*, 9-16.
- Lin, J., Schyschka, L., Muhl-Benninghaus, R., Neumann, J., Hao, L., Nussler, N., et al. (2012). Comparative analysis of phase I and II enzyme activities in 5 hepatic cell lines identifies Huh-7 and HCC-T cells with the highest potential to study drug metabolism. *Arch Toxicol*, *86*(1), 87-95.
- Lissy, M., Scallion, R., Stiff, D. D., & Moore, K. (2010). Pharmacokinetic comparison of an oral diclofenac potassium liquid-filled soft gelatin capsule with a diclofenac potassium tablet. *Expert Opin Pharmacother*, *11*(5), 701-708.
- Liu, K., Li, F., Lu, J., Gao, Z., Klaassen, C. D., & Ma, X. (2014). Role of CYP3A in isoniazid metabolism in vivo. *Drug Metab Pharmacokinet*, *29*(2), 219-222.
- Liu, Z. X., & Kaplowitz, N. (2002). Immune-mediated drug-induced liver disease. *Clin Liver Dis*, *6*(3), 755-774.
- Lomtadze, N., Kupreishvili, L., Salakaia, A., Vashakidze, S., Sharvadze, L., Kempker, R. R., et al. (2013). Hepatitis C virus co-infection increases the risk of anti-

- tuberculosis drug-induced hepatotoxicity among patients with pulmonary tuberculosis. *PLoS One*, 8(12), e83892.
- Lucena, M. I., Garcia-Martin, E., Andrade, R. J., Martinez, C., Stephens, C., Ruiz, J. D., et al. (2010). Mitochondrial superoxide dismutase and glutathione peroxidase in idiosyncratic drug-induced liver injury. *Hepatology*, 52(1), 303-312.
- Lupp, A., Danz, M., & Muller, D. (2001). Morphology and cytochrome P450 isoforms expression in precision-cut rat liver slices. *Toxicology*, 161(1-2), 53-66.
- Maddrey, W. C., & Boitnott, J. K. (1973). Isoniazid hepatitis. *Ann Intern Med*, 79(1), 1-12.
- Maria, V. A., & Victorino, R. M. (1997). Development and validation of a clinical scale for the diagnosis of drug-induced hepatitis. *Hepatology*, 26(3), 664-669.
- McGill, M. R., & Jaeschke, H. (2013). Metabolism and disposition of acetaminophen: recent advances in relation to hepatotoxicity and diagnosis. *Pharm Res*, 30(9), 2174-2187.
- McGill, M. R., Yan, H. M., Ramachandran, A., Murray, G. J., Rollins, D. E., & Jaeschke, H. (2011). HepaRG cells: a human model to study mechanisms of acetaminophen hepatotoxicity. *Hepatology*, 53(3), 974-982.
- McIntyre, I. M. (2014). Liver and peripheral blood concentration ratio (L/P) as a marker of postmortem drug redistribution: a literature review. *Forensic Sci Med Pathol*, 10(1), 91-96.
- Meadows, M. (2001). Serious liver injury. Leading reason for drug removals, restrictions. *FDA Consum*, 35(3), 8-9.
- Messner, S., Agarkova, I., Moritz, W., & Kelm, J. M. (2013). Multi-cell type human liver microtissues for hepatotoxicity testing. *Arch Toxicol*, 87(1), 209-213.
- Metushi, I. G., Sanders, C., Lee, W. M., & Uetrecht, J. (2014). Detection of anti-isoniazid and anti-cytochrome P450 antibodies in patients with isoniazid-induced liver failure. *Hepatology*, 59(3), 1084-1093.
- Mills, J. B., Rose, K. A., Sadagopan, N., Sahi, J., & de Moraes, S. M. (2004). Induction of drug metabolism enzymes and MDR1 using a novel human hepatocyte cell line. *J Pharmacol Exp Ther*, 309(1), 303-309.
- Naranjo, C. A., Busto, U., Sellers, E. M., Sandor, P., Ruiz, I., Roberts, E. A., et al. (1981). A method for estimating the probability of adverse drug reactions. *Clin Pharmacol Ther*, 30(2), 239-245.
- Nathwani, R. A., Pais, S., Reynolds, T. B., & Kaplowitz, N. (2005). Serum alanine aminotransferase in skeletal muscle diseases. *Hepatology*, 41(2), 380-382.
- Navarro, V. J., Barnhart, H., Bonkovsky, H. L., Davern, T., Fontana, R. J., Grant, L., et al. (2014). Liver injury from herbals and dietary supplements in the U.S. Drug-Induced Liver Injury Network. *Hepatology*, 60(4), 1399-1408.
- Navarro, V. J., & Lucena, M. I. (2014). Hepatotoxicity induced by herbal and dietary supplements. *Semin Liver Dis*, 34(2), 172-193.
- Nguyen, G. C., Sam, J., & Thuluvath, P. J. (2008). Hepatitis C is a predictor of acute liver injury among hospitalizations for acetaminophen overdose in the United States: a nationwide analysis. *Hepatology*, 48(4), 1336-1341.
- Olinga, P., Elferink, M. G., Draaisma, A. L., Merema, M. T., Castell, J. V., Perez, G., et al. (2008). Coordinated induction of drug transporters and phase I and II metabolism in human liver slices. *Eur J Pharm Sci*, 33(4-5), 380-389.
- Olson, H., Betton, G., Robinson, D., Thomas, K., Monroe, A., Kolaja, G., et al. (2000). Concordance of the toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals. *Regul Toxicol Pharmacol*, 32(1), 56-67.

- Ostapowicz, G., Fontana, R. J., Schiodt, F. V., Larson, A., Davern, T. J., Han, S. H., et al. (2002). Results of a prospective study of acute liver failure at 17 tertiary care centers in the United States. *Ann Intern Med*, *137*(12), 947-954.
- Ozer, J., Ratner, M., Shaw, M., Bailey, W., & Schomaker, S. (2008). The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. *Toxicology*, *245*(3), 194-205.
- Park, I. H., Arora, N., Huo, H., Maherali, N., Ahfeldt, T., Shimamura, A., et al. (2008). Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell*, *134*(5), 877-886.
- Perwitasari, D. A., Atthobari, J., & Wilffert, B. (2015). Pharmacogenetics of isoniazid-induced hepatotoxicity. *Drug Metab Rev*, *47*(2), 222-228.
- Pessayre, D., Fromenty, B., Berson, A., Robin, M. A., Letteron, P., Moreau, R., et al. (2012). Central role of mitochondria in drug-induced liver injury. *Drug Metab Rev*, *44*(1), 34-87.
- Pichler, W. J. (2002). Pharmacological interaction of drugs with antigen-specific immune receptors: the p-i concept. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, *2*(4), 301-305.
- Pichler, W. J., Adam, J., Watkins, S., Wullemmin, N., Yun, J., & Yerly, D. (2015). Drug Hypersensitivity: How Drugs Stimulate T Cells via Pharmacological Interaction with Immune Receptors. *Int Arch Allergy Immunol*, *168*(1), 13-24.
- Popper, H., Rubin, E., Cardiol, D., Schaffner, F., & Paronetto, F. (1965). DRUG-INDUCED LIVER DISEASE: A PENALTY FOR PROGRESS. *Arch Intern Med*, *115*, 128-136.
- Rabinowich, L., & Shibolet, O. (2015). Drug Induced Steatohepatitis: An Uncommon Culprit of a Common Disease. *Biomed Res Int*, *2015*, 168905.
- Raschi, E., Poluzzi, E., Koci, A., Salvo, F., Pariente, A., Biselli, M., et al. (2015). Liver injury with novel oral anticoagulants: assessing post-marketing reports in the US Food and Drug Administration adverse event reporting system. *Br J Clin Pharmacol*, *80*(2), 285-293.
- Rassow, J., Hauser, K., Netzker, R., Deutzmann, R., et al. (2008). Duale Reihe Biochemie. *Georg Thieme Verlag KG, 2. Auflage, S. 756 ff.*
- Reuben, A., Koch, D. G., & Lee, W. M. (2010). Drug-induced acute liver failure: results of a U.S. multicenter, prospective study. *Hepatology*, *52*(6), 2065-2076.
- Robles-Diaz, M., Medina-Caliz, I., Stephens, C., Andrade, R. J., & Lucena, M. I. (2016). Biomarkers in DILI: One More Step Forward. *Front Pharmacol*, *7*, 267.
- Rose, K. A., Holman, N. S., Green, A. M., Andersen, M. E., & LeCluyse, E. L. (2016). Co-culture of Hepatocytes and Kupffer Cells as an In Vitro Model of Inflammation and Drug-Induced Hepatotoxicity. *J Pharm Sci*, *105*(2), 950-964.
- Rudiger, H. A., Graf, R., & Clavien, P. A. (2003). Sub-lethal oxidative stress triggers the protective effects of ischemic preconditioning in the mouse liver. *J Hepatol*, *39*(6), 972-977.
- Russmann, S., Jetter, A., & Kullak-Ublick, G. A. (2010). Pharmacogenetics of drug-induced liver injury. *Hepatology*, *52*(2), 748-761.
- Schauer, R. J., Gerbes, A. L., Vonier, D., op den Winkel, M., Fraunberger, P., & Bilzer, M. (2003). Induction of cellular resistance against Kupffer cell-derived oxidant stress: a novel concept of hepatoprotection by ischemic preconditioning. *Hepatology*, *37*(2), 286-295.
- Schomaker, S., Warner, R., Bock, J., Johnson, K., Potter, D., Van Winkle, J., et al. (2013). Assessment of emerging biomarkers of liver injury in human subjects. *Toxicol Sci*, *132*(2), 276-283.
- Schutzer, K. M., Wall, U., Lonnerstedt, C., Ohlsson, L., Teng, R., Sarich, T. C., et al. (2004). Bioequivalence of ximelagatran, an oral direct thrombin inhibitor, as

- whole or crushed tablets or dissolved formulation. *Curr Med Res Opin*, 20(3), 325-331.
- Senior, J. R. (2008). What is idiosyncratic hepatotoxicity? What is it not? *Hepatology*, 47(6), 1813-1815.
- Sgro, C., Clinard, F., Ouazir, K., Chanay, H., Allard, C., Guilleminet, C., et al. (2002). Incidence of drug-induced hepatic injuries: a French population-based study. *Hepatology*, 36(2), 451-455.
- Sharma, S. K., Balamurugan, A., Saha, P. K., Pandey, R. M., & Mehra, N. K. (2002). Evaluation of clinical and immunogenetic risk factors for the development of hepatotoxicity during antituberculosis treatment. *Am J Respir Crit Care Med*, 166(7), 916-919.
- Shin, J., Hunt, C. M., Suzuki, A., Papay, J. I., Beach, K. J., & Cheetham, T. C. (2013). Characterizing phenotypes and outcomes of drug-associated liver injury using electronic medical record data. *Pharmacoepidemiol Drug Saf*, 22(2), 190-198.
- Shu, C. C., Lee, C. H., Lee, M. C., Wang, J. Y., Yu, C. J., & Lee, L. N. (2013). Hepatotoxicity due to first-line anti-tuberculosis drugs: a five-year experience in a Taiwan medical centre. *Int J Tuberc Lung Dis*, 17(7), 934-939.
- Sistare, F. D., & DeGeorge, J. J. (2011). Promise of new translational safety biomarkers in drug development and challenges to regulatory qualification. *Biomark Med*, 5(4), 497-514.
- Stephens, C., Andrade, R. J., & Lucena, M. I. (2014). Mechanisms of drug-induced liver injury. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 14(4), 286-292.
- Stevens, J. L., & Baker, T. K. (2009). The future of drug safety testing: expanding the view and narrowing the focus. *Drug Discov Today*, 14(3-4), 162-167.
- Suzuki, M., Ichikawa, K., Sakoda, A., & Sakai, Y. (1993). Long-term culture of primary rat hepatocytes with high albumin secretion using membrane-supported collagen sandwich. *Cytotechnology*, 11(3), 213-218.
- Tang, W. (2003). The metabolism of diclofenac--enzymology and toxicology perspectives. *Curr Drug Metab*, 4(4), 319-329.
- Temple, R. (2006). Hy's law: predicting serious hepatotoxicity. *Pharmacoepidemiol Drug Saf*, 15(4), 241-243.
- Testa, L., Bhindi, R., Agostoni, P., Abbate, A., Zoccai, G. G., & van Gaal, W. J. (2007). The direct thrombin inhibitor ximelagatran/melagatran: a systematic review on clinical applications and an evidence based assessment of risk benefit profile. *Expert Opin Drug Saf*, 6(4), 397-406.
- Tolman, K. G. (2000). Defining patient risks from expanded preventive therapies. *Am J Cardiol*, 85(12A), 15E-19E.
- Uetrecht, J. (2007). Idiosyncratic drug reactions: current understanding. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 47, 513-539.
- Uetrecht, J. (2008). Idiosyncratic drug reactions: past, present, and future. *Chem Res Toxicol*, 21(1), 84-92.
- Ulrich, R., & Friend, S. H. (2002). Toxicogenomics and drug discovery: will new technologies help us produce better drugs? *Nat Rev Drug Discov*, 1(1), 84-88.
- Vergani, D., Mieli-Vergani, G., Alberti, A., Neuberger, J., Eddleston, A. L., Davis, M., et al. (1980). Antibodies to the surface of halothane-altered rabbit hepatocytes in patients with severe halothane-associated hepatitis. *N Engl J Med*, 303(2), 66-71.
- Vickers, A. E., & Fisher, R. L. (2004). Organ slices for the evaluation of human drug toxicity. *Chem Biol Interact*, 150(1), 87-96.

- vom Dahl, S., & Haussinger, D. (1997). Experimental methods in hepatology. Guidelines of the German Association for the Study of the Liver (GASL). Liver perfusion--technique and applications. *Z Gastroenterol*, *35*(3), 221-226.
- Vuppalanchi, R., Gotur, R., Reddy, K. R., Fontana, R. J., Ghabril, M., Kosinski, A. S., et al. (2014). Relationship between characteristics of medications and drug-induced liver disease phenotype and outcome. *Clin Gastroenterol Hepatol*, *12*(9), 1550-1555.
- Vuppalanchi, R., Liangpunsakul, S., & Chalasani, N. (2007). Etiology of new-onset jaundice: how often is it caused by idiosyncratic drug-induced liver injury in the United States? *Am J Gastroenterol*, *102*(3), 558-562; quiz 693.
- Walsky, R. L., & Boldt, S. E. (2008). In vitro cytochrome P450 inhibition and induction. *Curr Drug Metab*, *9*(9), 928-939.
- Watkins, P. B. (2011). Drug safety sciences and the bottleneck in drug development. *Clin Pharmacol Ther*, *89*(6), 788-790.
- Watkins, P. B. (2015). How to Diagnose and Exclude Drug-Induced Liver Injury. *Dig Dis*, *33*(4), 472-476.
- Westerink, W. M., & Schoonen, W. G. (2007). Cytochrome P450 enzyme levels in HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes and their induction in HepG2 cells. *Toxicol In Vitro*, *21*(8), 1581-1591.
- Wilkening, S., Stahl, F., & Bader, A. (2003). Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line Hepg2 with regard to their biotransformation properties. *Drug Metab Dispos*, *31*(8), 1035-1042.
- Wu, Q., Ning, B., Xuan, J., Ren, Z., Guo, L., & Bryant, M. S. (2016). The role of CYP 3A4 and 1A1 in amiodarone-induced hepatocellular toxicity. *Toxicol Lett*, *253*, 55-62.
- Xie, Y., McGill, M. R., Dorko, K., Kumer, S. C., Schmitt, T. M., Forster, J., et al. (2014). Mechanisms of acetaminophen-induced cell death in primary human hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol*, *279*(3), 266-274.
- Xu, J. J., Henstock, P. V., Dunn, M. C., Smith, A. R., Chabot, J. R., & de Graaf, D. (2008). Cellular imaging predictions of clinical drug-induced liver injury. *Toxicol Sci*, *105*(1), 97-105.
- Yip, V. L., Alfirevic, A., & Pirmohamed, M. (2015). Genetics of immune-mediated adverse drug reactions: a comprehensive and clinical review. *Clin Rev Allergy Immunol*, *48*(2-3), 165-175.
- Yu, J., Vodyanik, M. A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J. L., Tian, S., et al. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, *318*(5858), 1917-1920.
- Yuan, L., & Kaplowitz, N. (2013). Mechanisms of drug-induced liver injury. *Clin Liver Dis*, *17*(4), 507-518, vii.
- Yun, J., Cai, F., Lee, F. J., & Pichler, W. J. (2016). T-cell-mediated drug hypersensitivity: immune mechanisms and their clinical relevance. *Asia Pac Allergy*, *6*(2), 77-89.
- Zanni, M. P., von Greyerz, S., Schnyder, B., Brander, K. A., Frutig, K., Hari, Y., et al. (1998). HLA-restricted, processing- and metabolism-independent pathway of drug recognition by human alpha beta T lymphocytes. *J Clin Invest*, *102*(8), 1591-1598.
- Zhang, X., Liu, F., Chen, X., Zhu, X., & Uetrecht, J. (2011). Involvement of the immune system in idiosyncratic drug reactions. *Drug Metab Pharmacokinet*, *26*(1), 47-59.
- Zimmerman, H. J. (1978). Drug-induced liver disease. *Drugs*, *16*(1), 25-45.

Zimmerman, H. J. (1986). Effects of alcohol on other hepatotoxins. *Alcohol Clin Exp Res*, 10(1), 3-15.
Zimmerman, H. J. (2000). Drug-induced liver disease. *Clin Liver Dis*, 4(1), 73-96, vi.

Internetseiten:

<https://www.fda.gov/downloads/Drugs/.../Guidances/UCM174090.pdf> (letzter Aufruf: 19.04.2017)

<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/ScienceResearch/ResearchAreas/ucm073046.pdf> (letzter Aufruf: 19.04.2017)

<https://www.promega.de/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/101/caspase-glo-3-7-assay-protocol.pdf>, S. 3 (letzter Aufruf: 19.04.2017)

<http://www.thermofisher.com/order/catalog/product/88953> (letzter Aufruf: 19.04.2017)

E Danksagung

Ich möchte mich als erstes bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Alexander L. Gerbes, für die Überlassung des Themas herzlich bedanken.

Besonderer Dank gebührt meinem Betreuer Dr. med. Andreas Benesic für die zu jeder Zeit herausragende Unterstützung, die fruchtbaren Gespräche und Diskussionen und die Begeisterung für dieses Thema und das wissenschaftliche Arbeiten, die mich bereits beim ersten Treffen überzeugt und angesteckt hat.

Des Weiteren möchte ich den Medizinisch-Technischen Assistentinnen Frau Sabine Pirsig und Frau Maria Escobar für ihre liebenswürdige Einarbeitung und Unterstützung im Labor danken. Wie auch das gesamte Team des Forschungslabores standen sie mir immer mit Rat und Tat zur Seite und haben zum guten Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Von Herzen danke ich vor allem auch meinen Eltern, die mir das Medizinstudium ermöglicht haben, mich bei allem bedingungslos unterstützen und ohne jeden Zweifel immer an mich glauben.

Zum Schluss einen liebevollen Dank an Claus, der mich unermüdlich und tatkräftig selbst dann unterstützt hat, als mir gewisse Formatvorstellungen für diese Arbeit vermeintlich den letzten Nerv geraubt haben. Danke, dass du mich in Momenten des Zweifels antreibst und motivierst, an mich glaubst und mein Leben seit unserer ersten Begegnung jeden Tag aufs Neue bereicherst.

F Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

„3D-Mikrogewebe menschlicher Hepatozyten als in vitro-Modell zur Testung
medikamentös-induzierter Hepatotoxizität“

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient
und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen
sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der
Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in
ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades
eingereicht wurde.

München, 04.07.2018

Ort, Datum

Daniela Rimböck

Unterschrift Doktorandin