

In-vitro-Modelle der Leberfibrose-Forschung

Fábia Lobo de Sá*, Peter Hauff
Bayer Pharma AG, Drug Discovery, Therapeutic Research Groups, Cross Indication Platform, Indication Expansion, Berlin (*Studentin im Masterstudiengang Toxikologie, Charité - Universitätsmedizin Berlin)

Die Leberfibrose (LeFi) ist eine chronische Erkrankung der Leber, bei der zunehmend Lebergewebe durch die kontinuierliche Einwirkung von Noxen, wie bspw. Alkohol, bestimmte Arzneimittel, Hepatitisviren, Parasiten oder Fehl- und Überernährung, zerstört und durch Bindegewebe ersetzt wird. Die schwerste Form der LeFi ist die Leberzirrhose, die mit vielen Komplikationen einhergeht und an deren Folgen allein in Europa jährlich ca. 170.000 Menschen sterben.

Bedingt durch die großen gesundheitlichen Gefahren, die mit einer LeFi einhergehen gibt es zwei grundlegende Forschungsrichtungen:

- 1) In der toxikologischen Forschung gilt es herauszufinden, ob bestimmte Substanzen oder Arzneimittel ein fibrogenes Potential für Menschen in sich bergen und falls das der Fall ist, ob dies für alle Menschen oder nur für definierte Risikogruppen zutrifft.
- 2) In der Arzneimittelforschung wird nach Substanzen gesucht, die geeignet sind einen laufenden Fibrosierungsprozess zu stoppen oder zur Rückbildung einer existierenden Fibrose in der Leber führen.

Pathogenese: Voraussetzung für die Ausbildung einer LeFi ist eine chronische Intoxikation, die zu einer anhaltenden Schädigung und somit auch zu kontinuierlichen Reparaturprozessen in der Leber mit Ausbildung von Narbengewebe (Fibrose) führt. Zu Beginn kommt es dabei zu einer Leberzellfetteinlagerung, dem Leberzelluntergang und einer Anreicherung von Entzündungszellen. Über die angestoßene Entzündungskaskade werden Kupffer'sche Sternzellen (KSZ) aktiviert und Zytokine freigesetzt, die zur Aktivierung von Hepatic Stellate Cells (HSC) und deren Transformation in Myofibroblasten (MFB) führen. Die MFB sezernieren extrazelluläre Matrix (EZM), die sich im Disse'schen Raum anreichert und zu einer Versteifung (Fibrosierung) des Lebergewebes führt. Neben den HSC werden auch Fibroblasten, Epithelzellen, Endothelzellen oder KSZ in MFB transformiert.

In-vitro-Modelle

Im Rahmen der LeFi-Forschung ermöglichen *in-vitro*-Modelle ein schnelles und umfangreiches Screening von Substanzen auf ihre fibrotischen oder antifibrotischen Eigenschaften. Die *in vitro*-Modelle lassen sich in die routinemäßig verwendeten 2D-

Zellkulturen und die sich in der Erforschung befindlichen 3D-Zell- und Gewebekulturen einteilen.

Die 2D-Zellkulturen wachsen als Monolayer und die verwendeten Zellen lassen sich einteilen in:

- A.) *Primäre Zellen* (frisch isolierte Zellen), die ihre ursprünglichen Eigenschaften, wie sie im komplexen Organ vorkommen überwiegend beibehalten, jedoch nur eine geringe Lebensdauer besitzen und
- B.) *Immortalisierte Zellen* (= permanent wachsend), die eine lange Lebensdauer haben, jedoch einige Eigenschaften gegenüber den frisch isolierten Zellen durch den Immortalisierungsprozess verloren haben.

Für A) und B) werden alle Leberzelltypen verwendet, die zur Transformation in MFB und somit zur Bildung von ECM fähig sind, wobei die HSC am häufigsten verwendet werden.

In diesem System lassen sich Substanzen parallel in Zellen von Mensch, Maus und Ratte testen und geben somit erste Hinweise auf eine Translatierbarkeit der Ergebnisse aus nachfolgenden *in vivo* Studien an Nagermodellen auf den Menschen.

Mit den 3D-Zell- und Gewebekulturen sollen Modelle etabliert werden, die der komplexen Leberstruktur und den darin ablaufenden physiologischen und patho-physiologischen Mechanismen näher kommen. Dazu zählen bspw.:

- Co-Kulturen (bestehend z. B. aus primären Hepatozyten, HSC und / oder KSZ)
- 3D-Leberstanzkulturen (Precision-cut liver slices)
- 3D-Organbioprinting.

Toxikologisches Beispiel: Es ist bekannt, dass die chronische Einnahme von Paracetamol [= Acetaminophen (APAP)] zu schweren Leberschäden führen kann, jedoch in unterschiedlichem Ausmaß bei verschiedenen Menschen. Jetten *et al.* (2016) untersuchten verschiedene Dosierungen von APAP an primären humanen Hepatozyten von fünf Spendern um zu klären, ob diese zu interindividuellen Unterschieden in der Expression von Genen führen. Von den ca. 10.000 untersuchten Genen wurden die mit den größten interindividuellen Unterschieden für weitere Analysen verwendet. In dieser Untersuchung wurden große interindividuelle Unterschiede in der Bildung toxischer APAP-Metabolite wie Hydroxy-/ Methoxy-APAP und im Expressionsniveau von Cytochrom P450 Enzymen, UDP-Glucuronyl-, Sulfo- und Glutathion S-Transferasen gefunden.

1) Hauff, P. *et al.* (2015): Early to Phase II drugs currently under investigation for the treatment of liver fibrosis. *Expert Opin Investig Drugs*. 24(3):309-327

2) Crespo Yanguas, S. *et al.* (2016): Experimental models of liver fibrosis. *Arch Toxicol* 90:1025-1048

3) Jetten, M. J. A. *et al.* (2016): Interindividual variation in gene expression responses and metabolite formation in acetaminophen-exposed primary human hepatocytes. *Arch Toxicol*. 90:1103-1115