

## 5 Zusammenfassung

Die Bestimmung des humanen Metabolismus bereits in der präklinischen Entwicklungsphase von Arzneistoffen ist von äußerster Wichtigkeit, da dadurch die systemische Bioverfügbarkeit abgeschätzt werden kann. In zunehmendem Maße werden *in vitro* Modelle für präklinische Metabolismusuntersuchungen eingesetzt. Da die Verfügbarkeit von menschlichem Gewebe grundsätzlich limitiert ist, wird auch die Nutzbarkeit von tierischen *in vitro* Modellen für die Prädiktion des Metabolismus im Menschen untersucht.

Es war deshalb das Ziel der vorliegenden Arbeit, Zellkultursysteme für primäre Enterozyten und Hepatozyten des Schweines zu entwickeln.

Eine Methode zur Gewinnung vitaler Enterozyten aus dem Dünndarm des Schweines konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit etabliert werden. Wenngleich Enterozyten mit hoher Ausgangsvitalität isoliert werden konnten, verloren die Enterozyten in Kultur sehr schnell an Vitalität und morphologischer Differenzierung. Im Gegensatz zu Enterozyten konnten Hepatozyten über einen längeren Zeitraum in Kultur gehalten werden (bis zu 11 Tage experimentell ermittelt), ohne an Vitalität zu verlieren. Schweinehepatozyten wurden zwischen zwei Schichten Kollagen Typ I kultiviert (Sandwichkultur).

Die metabolische Kompetenz der kultivierten Enterozyten und Hepatozyten wurde mittels CYP-Markersubstraten untersucht. Sowohl Enterozyten als auch Hepatozyten metabolisierten Ethoxyresorufin und Ethoxycoumarin. In Enterozytenkulturen wurde zusätzlich der Metabolismus von Testosteron untersucht. Enterozyten hydroxylierten Testosteron in der 6 $\beta$ -Position.

Die Induzierbarkeit der EROD- und der ECOD-Aktivität wurde in Enterozyten- und Hepatozyten untersucht. Die Kulturen wurden dazu mit 50  $\mu$ M  $\beta$ -Naphthoflavon bzw. 50  $\mu$ M 3-Methylcholanthren behandelt, und der Metabolismus von Ethoxyresorufin und Ethoxycoumarin wurde nach 48 h Behandlung untersucht. In Enterozytenkulturen war nur die ECOD-Aktivität induzierbar (Faktor 16), während die EROD-Aktivität weder durch  $\beta$ -Naphthoflavon noch durch 3-Methylcholanthren zu beeinflussen war. In Hepatozytenkulturen

war nach Behandlung mit 50  $\mu\text{M}$  3-Methylcholanthren für 48 h ein Anstieg beider Enzymaktivitäten im Vergleich zu unbehandelten Kulturen zu beobachten (EROD Faktor 2, ECOD Faktor 5).

Der Metabolismus der CYP3A Substrate Diazepam und Tacrolimus wurde in beiden Zellkultursystemen untersucht. Diazepam wurde in Hepatozytenkulturen zu Temazepam, Desmethyldiazepam und Oxazepam verstoffwechselt, wohingegen in Enterozyten kein Metabolismus von Diazepam zu beobachten war. Im Gegensatz dazu wurde Tacrolimus sowohl in Enterozyten, als auch in Hepatozytenkulturen metabolisiert, und es wurden in beiden Kultursystemen Demethyl-Tacrolimus, Didemethyl-Tacrolimus, Demethyl-Hydroxy-Tacrolimus sowie Hydroxy-Tacrolimus produziert. Behandlung von Enterozytenkulturen mit 50  $\mu\text{M}$  Dexamethason für 48 Stunden führte zu einem signifikanten Anstieg der Metabolitenproduktion. Der Metabolismus von Tacrolimus wurde auch in humanen Hepatozyten untersucht, und es wurde ein vergleichbares Metabolitenprofil gefunden.

Darüberhinaus wurde der Metabolismus von Tacrolimus und Diazepam auch mit Mikrosomenpräparationen von Insektenzellen, die spezifisch humane CYP-Isoenzyme (2C8, 2C9-ARG, 2C9-CYS, 2C19, 3A4, 3A4 + Cytochrom b<sub>5</sub> und 3A5) exprimieren, untersucht. Mit diesen Versuchen konnte bestätigt werden, daß Tacrolimus ausschließlich von Enzymen der CYP3A Subfamilie verstoffwechselt wird. Im Fall des Diazepam wurden die hydroxylierten Metabolite Temazepam und Oxazepam ausschließlich in Mikrosomenpräparationen gefunden, die rekombinantes 3A4 oder 3A5 enthielten.

Die Expression von CYP1A sowie CYP3A Protein in kultivierten Enterozyten wurde in Western Blot Experimenten nachgewiesen. Die Induzierbarkeit der CYP1A und der CYP3A Proteinexpression wurde in Enterozytenkulturen nach Exposition zu Aroclor 1254,  $\beta$ -Naphthoflavon, Phenobarbital und Dexamethason untersucht. Die Expression des CYP3A Proteins war durch alle Chemikalien induzierbar, wobei  $\beta$ -Naphthoflavon den stärksten Effekt hatte. Die CYP1A Proteinexpression in Enterozytenkulturen war nach Exposition zu Aroclor 1254 und  $\beta$ -Naphthoflavon deutlich verstärkt, eine geringgradige Induktion wurde auch nach Behandlung der Kulturen mit Phenobarbital und Dexamethason beobachtet.

Primäre Enterozytenkulturen sollten nur für einen kurzen Zeitraum (bis zu 48 h) in Kultur gehalten und für das Erstellen von Metabolitenprofilen sowie Enzyminduktionsstudien genutzt werden. Im Gegensatz dazu konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, daß Hepatozytenkulturen über 11 Tage mit adäquater Albuminsekretion kultiviert werden können und sich daher für Metabolismusuntersuchungen und andere hepato-spezifische Fragestellungen (Cytotoxizität/Hepatotoxizität) eignen. Am Beispiel der Arzneistoffe Tacrolimus und Diazepam konnte gezeigt werden, daß die in porcinen Zellkulturen gefundenen Metabolitenprofile den Metabolitenprofilen, die beim Menschen gefunden werden, entsprechen. Die Übertragbarkeit der im Schweinemodell gewonnenen Ergebnisse auf den menschlichen Metabolismus muß für jede neue Substanz durch Vergleich mit humanen Enterozyten- und Hepatozytenkulturen untersucht werden.

## 6 Summary

### Tanja Bestmann: Use of primary porcine enterocyte and hepatocyte cultures for *in vitro* drug biotransformation studies

In general, the availability of human tissue for biomedical research is limited. Therefore, other sources and in particular animal tissues are being evaluated for their potential to predict human drug biotransformation reactions.

The aim of the present study was to develop a primary porcine enterocyte and hepatocyte cell culture system to study intestinal and hepatic xenobiotransformation.

A method for the isolation and short term cultivation (up to 48 h) of porcine duodenal enterocytes was developed and it can be shown that cultured enterocytes are governed by rapid loss of cellular differentiation as well as cell viability. In addition, porcine hepatocytes were isolated and cultured using a 3-dimensional culture system and these cultures could be maintained for up to 11 days without any sign of deterioration.

The metabolic capacity of cultured porcine enterocytes and hepatocytes was investigated using marker substrates for CYP monooxygenases (ethoxyresorufin and ethoxycoumarin). Hepatocytes as well as enterocytes were capable to metabolise ethoxyresorufin and ethoxycoumarin. With enterocyte cultures, the metabolism of testosterone was also investigated and testosterone-6 $\beta$ -hydroxylase-activity was measurable.

The ability to induce enzymes responsible for the metabolism of ethoxyresorufin and ethoxycoumarin was investigated *in vitro* upon treatment of the cells with either 50  $\mu$ M 3-methylcholanthrene or 50  $\mu$ M  $\beta$ -naphthoflavone. In enterocyte cultures, only ECOD was inducible, the level being 16-fold above control values, whilst EROD-activity remained unchanged following treatment with either 3-methylcholanthrene or  $\beta$ -naphthoflavone. Treatment of hepatocyte cultures with 50  $\mu$ M 3-methylcholanthrene led to a minor increase in EROD and ECOD activities, the level being 2-fold and 5-fold above control values, respectively.

The metabolism of the tranquiliser diazepam and the immunosuppressant tacrolimus were additionally investigated, because both drugs are substrates for CYP3A.

Diazepam was metabolised by porcine hepatocytes but not in the case of porcine enterocytes. Tacrolimus was, however, metabolised by cultured porcine enterocytes as well as hepatocytes and the metabolite profiles were comparable in so far as demethyl-tacrolimus, didemethyl-tacrolimus, demethyl-hydroxy-tacrolimus and hydroxy-tacrolimus were formed by both cell types. Treatment of enterocyte cultures with 50  $\mu$ M dexamethasone for 48 hours led to a significant increase in the overall metabolite formation of tacrolimus. The biotransformation of tacrolimus was also investigated in human hepatocyte cultures and the results were comparable to those obtained with porcine hepatocyte cultures.

Furthermore, the metabolism of diazepam and tacrolimus was studied with microsomes from insect cells, which express specifically human CYP-isoenzymes (2C8, 2C9-ARG, 2C9-CYS, 2C19, 3A4, 3A4 + cytochrome b<sub>5</sub> and 3A5). Temazepam and oxazepam, which are important and clinically relevant metabolites of Diazepam, were generated by CYP3A4 and CYP3A5. In the case of tacrolimus also all metabolites were produced by enzymes of the CYP3A-subfamily.

Western Blot experiments provided evidence for the expression of CYP1A1 and CYP3A4 in cultured enterocytes. The inducibility of CYP1A and CYP3A protein by Aroclor 1254,  $\beta$ -naphthoflavone, phenobarbital and dexamethasone was studied in cultured porcine enterocytes and it was shown that the CYP3A protein expression was increased by all chemicals, with  $\beta$ -naphthoflavone having the strongest effect. CYP1A of enterocytes was significantly induced by Aroclor 1254 and  $\beta$ -naphthoflavone and interestingly by phenobarbital and dexamethasone as well, albeit to a smaller extent.

Because of the rapid loss of cellular differentiation primary enterocytes should be cultured for a short period of time following isolation (48 h) in contrast to hepatocytes, which can be cultured over prolonged periods of time (up to 11 days).

In general, *in vitro* systems do not replace *in vivo* studies and in particular are unable to predict the pharmacokinetics of a drug. However, for certain types of experiments *in vitro* systems

provide a unique opportunity to assess metabolism across species in a time and cost effective manner. In the present study enterocytes proved to be of limited value when cultured for prolonged periods of time, but for hepatocytes the reverse was seen. Using metabolite profiles the present cell culture model is of great value in predicting the human biotransformation of drugs as shown for the macrolide tacrolimus