

Prediction of hepatotoxic responses in humans : a toxicogenomics-based parallelogram approach'

Citation for published version (APA):

Kienhuis, A. S. (2008). *Prediction of hepatotoxic responses in humans : a toxicogenomics-based parallelogram approach*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Universitaire Pers Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20080313ak>

Document status and date:

Published: 01/01/2008

DOI:

[10.26481/dis.20080313ak](https://doi.org/10.26481/dis.20080313ak)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

DOEL VAN DIT PROEFSCHRIFT

Het doel van dit proefschrift is te onderzoeken of een betrouwbare voorspelling gegeven kan worden van effecten die giftige stoffen in de lever van de mens teweeg kunnen brengen, gebruikmakend van een op toxicogenomics technieken gebaseerde parallellogrambenadering. Genexpressie resultaten van dierproeven waarin ratten blootgesteld zijn aan levergiftige stoffen worden daartoe vergeleken met resultaten verkregen uit alternatieven voor dierproeven, waarin zowel levercellen van de rat als levercellen van de mens buiten het lichaam blootgesteld zijn aan dezelfde giftige stoffen. Volgens de parallellogrambenadering, afgebeeld in **hoofdstuk 1**, figuur 4 van dit proefschrift, kunnen dan uitspraken gedaan worden of de gevonden effecten voorspellend zijn voor effecten in de lever van de mens. Ook kunnen de gevonden resultaten inzicht geven in de betrouwbaarheid van proefdierstudies en de bijdrage van alternatieven voor proefdieren aan de verfijning, vermindering en vervanging van proefdieren in de toxicologie. Alle experimenten zijn gedaan met drie stoffen waarvan bekend is dat ze giftig zijn voor de lever, namelijk, coumarine, thioacetamide, en acetaminophen.

KORTE INTRODUCTIE

De lever in de toxicologie

In de toxicologie, de leer van giftige stoffen, is de lever een belangrijk orgaan. De lever is namelijk verantwoordelijk voor de omzetting van giftige stoffen waaraan wij dagelijks blootgesteld worden, onder andere door onze voeding, het milieu, enzovoorts. Deze stoffen worden idealiter omgezet tot producten die makkelijker uit te scheiden zijn in bijvoorbeeld de urine. Toch kan omzetting ook leiden tot de vorming van producten die giftiger zijn dan de oorspronkelijke stof. In de toxicologie worden de effecten van deze stoffen en hun producten bestudeerd.

Proefdieren in de toxicologie

Erg vaak worden voor experimenten in de toxicologie proefdieren gebruikt. Om het gebruik van proefdieren te beperken, wordt veel studie gedaan naar alternatieven voor proefdieren. Een alternatief voor proefdieren dat in dit proefschrift beschreven is, is het gebruik van levercellen van de rat. Dit alternatief leidt tot zowel vermindering als verfijning van proefdieronderzoek. Ondanks dat er nog steeds een rat als leverdonor op moet treden om cellen te verkrijgen, is de hoeveelheid cellen uit één rattenlever echter zo groot dat tig experimenten uitgevoerd kunnen worden. Bovendien is het ongerief dat de rat ondervindt tijdens het verwijderen van zijn lever minimaal, vele malen minder dan het ongerief dat de rat moet doorstaan tijdens blootstelling aan een giftige stof. Het gebruik van levercellen van de mens biedt perspectief tot het volledig vervangen van proefdieren. In dit proefschrift zijn de levercellen van de mens geïsoleerd uit stukjes lever van donoren die een tumorverwijderende operatie hebben ondergaan.

Experimenten waarbij de rat in levende lijve wordt blootgesteld aan (giftige) stoffen, worden ook wel *in vivo* experimenten genoemd. Experimenten waarbij cellen buiten het lichaam van ofwel het proefdier ofwel de mens worden blootgesteld, worden *in vitro* experimenten genoemd.

Toxicogenomics

De genomics benadering is ongeveer tien jaar geleden geïntroduceerd en is gebaseerd op de tegenwoordige kennis van de genen op het genoom, het DNA, van verschillende organismen. Met genomics technieken kan genexpressie van wel 20.000 genen in één keer gemeten worden. Genexpressie is de mate waarin een gen tot uiting komt in bijvoorbeeld de lever. Het tot uiting komen van een gen is ongeveer vergelijkbaar met zijn omzetting in een functioneel eiwit dat een specifieke rol in de cel en het orgaan vervuld en geeft informatie over specifieke mechanismen in een orgaan of een cel.

Een voorbeeld. Een leverenzym is verantwoordelijk voor de omzetting van een specifieke stof. Op het moment dat deze stof in aanraking komt met levercellen, gaat er een signaal naar het DNA van deze cellen met de opdracht veel van dit enzym aan te maken. Genomics technieken, in het bijzonder de microarray techniek zoals beschreven in dit proefschrift, zullen dan een hoge expressie van het gen voor dit leverenzym op het DNA meten. Het meten van de expressie van een zeer grote hoeveelheid genen in één keer, geeft een beeld van de effecten van een bepaalde stof op genexpressie in bijvoorbeeld de lever of levercellen. De toepassing van genomics technieken in de toxicologie wordt toxicogenomics genoemd.

Levergiftige stoffen beschreven in dit proefschrift

Coumarine Coumarine is een natuurlijke stof die geëxtraheerd is uit planten. De geur van coumarine is vergelijkbaar met de geur van vanille. Daartoe wordt coumarine gebruikt in cosmetica, oliën en parfums die de geur van vanille verspreiden. In de mens wordt coumarine ook klinisch toegepast bij de behandeling van sommige soorten kankers. Afgeleiden van coumarine worden gebruikt als bloedverdunners. In de mens wordt coumarine niet als giftig beschouwd. In de rat echter, is coumarine een zeer bekende lever giftige stof en zelfs een bestanddeel van rattengif. Verschil in giftigheid tussen de mens en de rat wordt verklaard door het verschil in omzetting van de stof in de lever. In de mens wordt de stof door leverenzymen omgezet in wateroplosbare producten die gemakkelijk uitgescheiden worden in de urine. In de rat wordt coumarine door leverenzymen omgezet in juist heel giftige producten.

Thioacetamide Thioacetamide is een stof welke vroeger gebruikt is ter voorkoming van het verderven van sinaasappelen en als antischimmel. Tegenwoordig wordt thioacetamide nog industrieel gebruikt bij het productieproces van leer, textiel, papier en rubber. Thioacetamide is een stabilisator van motorbrandstoffen. Proefdierstudies in de toxicologie hebben uitgewezen dat thioacetamide, na omzetting door leverenzymen, een zeer giftige stof is. Experimenten op

alternatieven voor proefdieren hebben in het verleden echter weinig effecten van thioacetamide op levercellen laten zien.

Acetaminophen De stof acetaminophen, ook wel paracetamol genoemd, heeft weinig introductie. Toch is misschien niet algemeen bekend dat deze populaire pijnstiller het meest gebruikte middel is bij zelfmoordpogingen. Overdosis, in het bijzonder in combinatie met alcohol, veroorzaakt ernstig leverfalen met de dood als gevolg. Net als bij de voorgaande stoffen, is bekend dat acetaminophen wordt omgezet door leverenzymen die op hun beurt nadelige effecten in de lever teweeg brengen. Alcohol beïnvloedt de activiteit van deze leverenzymen, waardoor er meer giftige producten gevormd worden en de nadelige effecten alleen maar groter worden.

SAMENVATTING VAN DE STUDIES BESCHREVEN IN DIT PROEFSCHRIFT

Vergelijk van genexpressie tussen de rat *in vivo* en levercellen van de rat *in vitro*

De eerste studie die gedaan is in het kader van dit proefschrift is beschreven in **hoofdstuk 2**. In dit hoofdstuk werden levercellen van de rat gekweekt in een omgeving die zoveel mogelijk de situatie in de lever van de rat nabootst, tussen twee lagen collageen volgens het sandwich model, een al bestaand en regelmatig toegepast model. Het vernieuwende van de studie beschreven in **hoofdstuk 2** is, dat de cellen gekweekt zijn in een nieuw ontwikkeld kweekmedium om ze zo natuurlijk mogelijk op giftige stoffen te laten reageren. Genexpressie van deze levercellen is vergeleken met genexpressie van cellen in de oorspronkelijke rattenlever. Ook werd de hoeveelheid leverenzymen werkelijk gevormd door de verhoogde genexpressie gemeten. Resultaten wezen uit dat het nieuwe celsysteem een verbetering is ten opzichte van het bestaande sandwich model. Zowel genexpressie als de hoeveelheid leverenzymen is in het nieuwe model beter vergelijkbaar met de situatie in de lever van de rat.

De vraag of het vernieuwde alternatief voor dierproeven ook beter in staat is om de giftige stof coumarine om te zetten, werd beantwoord in **hoofdstuk 3**. In dit hoofdstuk is genexpressie vergeleken tussen het bestaande sandwich model, het nieuwe model, en de lever van de blootgestelde rat. Inderdaad, genexpressie in het nieuwe sandwich model bleek meer overeen te komen met genexpressie in de lever van de rat.

In **hoofdstuk 5** en **hoofdstuk 6** is het effect van thioacetamide op genexpressie in de lever van de rat en levercellen van de rat vergeleken. De effecten die geïdentificeerd zijn in de lever van de blootgestelde rat zijn onmiskenbaar bewijs van de giftigheid van thioacetamide. Toch waren deze effecten niet terug te vinden in rattencellen. Levercellen van de rat als alternatief zijn in het geval van thioacetamide niet betrouwbaar, zonder proefdieronderzoek zou uit de studies die beschreven zijn in dit proefschrift niet gebleken zijn dat thioacetamide giftig is.

Tot slot werd de geschiktheid van levercellen van de rat als alternatief voor proefdieren onderzocht voor de stof acetaminophen in **hoofdstuk 7**. Net als de resultaten in **hoofdstuk 3** voor coumarine, zijn resultaten in de cellen van de rat vergelijkbaar met resultaten in de lever van de blootgestelde rat.

Samenvattend, voor zowel coumarine als acetaminophen blijkt het alternatief voor proefdieren, levercellen van de rat gekweekt in het sandwich model met geoptimaliseerd kweekmedium, betrouwbare resultaten op te leveren die vergelijkbaar zijn met resultaten verkregen in de blootgestelde rat als proefdier. Echter, voor de stof thioacetamide waren de resultaten niet vergelijkbaar. De in de levende rat erg giftige stof was niet giftig voor levercellen van de rat.

Vergelijk van genexpressie tussen levercellen van de rat en levercellen van de mens *in vitro*

In **hoofdstuk 4** is het effect van coumarine gemeten in levercellen van de mens. Onze kennis over het verschil in omzetting van coumarine tussen mens (niet-giftige producten) en rat (giftige producten) benadrukt al de noodzaak om cellen van menselijke oorsprong te gebruiken in toxicologisch onderzoek. De resultaten op het niveau van genexpressie, zoals beschreven in **hoofdstuk 4**, hebben deze noodzaak in het geval van coumarine onderschreven.

Het effect van thioacetamide op levercellen van de rat en levercellen van de mens werd vergeleken in **hoofdstuk 6**. Hoewel de genexpressie resultaten in zowel rat als menselijke levercellen vergelijkbaar waren, bleken de effecten op genexpressie zeer laag te zijn. Levercellen bleken, ongeacht hun oorsprong, niet representatief voor het bestuderen van giftige effecten van thioacetamide.

In **hoofdstuk 7** zijn de effecten van acetaminophen vergeleken tussen levercellen van de rat en de mens. Resultaten op het niveau van genexpressie kwamen sterk overeen tussen levercellen van de rat en de mens blootgesteld aan acetaminophen.

Concluderend waren de genexpressie resultaten van zowel thioacetamide als acetaminophen vergelijkbaar in levercellen van de rat en de mens *in vitro*. Echter, de verschillen in genexpressie tussen rat en menselijke levercellen na blootstelling aan coumarine, die te wijten zijn aan verschil in omzetting van coumarine tussen rat en mens, laten duidelijk zien hoe belangrijk het is om menselijke levercellen te gebruiken in toekomstig toxicologisch onderzoek.

De parallellogrambenadering: vertaling van de effecten naar de mens

Wat zeggen bovenstaande resultaten nu over de effecten die coumarine, thioacetamide, en acetaminophen waarschijnlijk veroorzaken in de lever van de mens? Dit is de belangrijkste vraag die ik heb getracht te beantwoorden in dit proefschrift. Aan de hand van de parallellogrambenadering kunnen resultaten die zowel in de rat *in vivo* als in de levercellen van de rat en de mens *in vitro* gevonden zijn, vertaald worden naar de mens. Effecten die in alle drie systemen optreden hebben een voorspellende waarde voor de effecten die in de lever van de blootgestelde mens verwacht kunnen worden.

De giftige effecten van coumarine zijn wel vergelijkbaar tussen de rat *in vivo* en levercellen van de rat *in vitro*, maar niet tussen de rat en de mens vanwege het verschil in omzetting van coumarine in giftige producten. Volgens de parallellogrambenadering kunnen de giftige effecten van coumarine die wel gevonden zijn in rat dus niet vertaald worden naar de mens. Op basis van de resultaten beschreven in dit proefschrift kan niet voorspeld worden dat coumarine giftig is voor de mens. Ook voor thioacetamide kan geen voorspelling gedaan worden. Het blijkt dat toxiciteit van thioacetamide complex is, waardoor proefdieronderzoek niet benadert kan worden met het *in vitro* systeem zoals beschreven in dit proefschrift. Echter, voor acetaminophen kan wel een voorspelling gedaan worden. Een groot gedeelte van de resultaten op het niveau van genexpressie is goed vergelijkbaar tussen de rat *in vivo* en levercellen van de rat en de mens *in vitro*. De effecten van acetaminophen beschreven in dit proefschrift kunnen volgens de parallellogrambenadering vertaald worden naar de mens.

CONCLUSIE

Concluderend zijn in dit proefschrift drie stoffen getest die bekend staan om hun giftigheid voor de lever. Gebruikmakend van deze stoffen is beoogd de voorspelbaarheid van *in vivo* proeven in de rat en *in vitro* proeven in zowel rat als menselijke levercellen te testen voor effecten in de lever van de blootgestelde mens. Resultaten beschreven in dit proefschrift zijn niet eenduidig. Genexpressie veranderingen die optreden in de lever van de aan giftige stoffen blootgestelde mens kunnen niet voorspeld worden door alleen experimenten uit te voeren op cellen zoals beschreven in dit proefschrift. Bovendien, verschil in omzetting van giftige stoffen tussen organismen beïnvloedt de betrouwbaarheid van effecten gemeten in proefdieren. Echter, met de op toxicogenomics gebaseerde parallellogrambenadering zoals beschreven in dit proefschrift, kunnen specifieke effecten die gevonden worden in alle drie de pijlers van het parallellogram (rat *in vivo* en cellen van rat en mens *in vitro*) vertaald worden naar de mens.