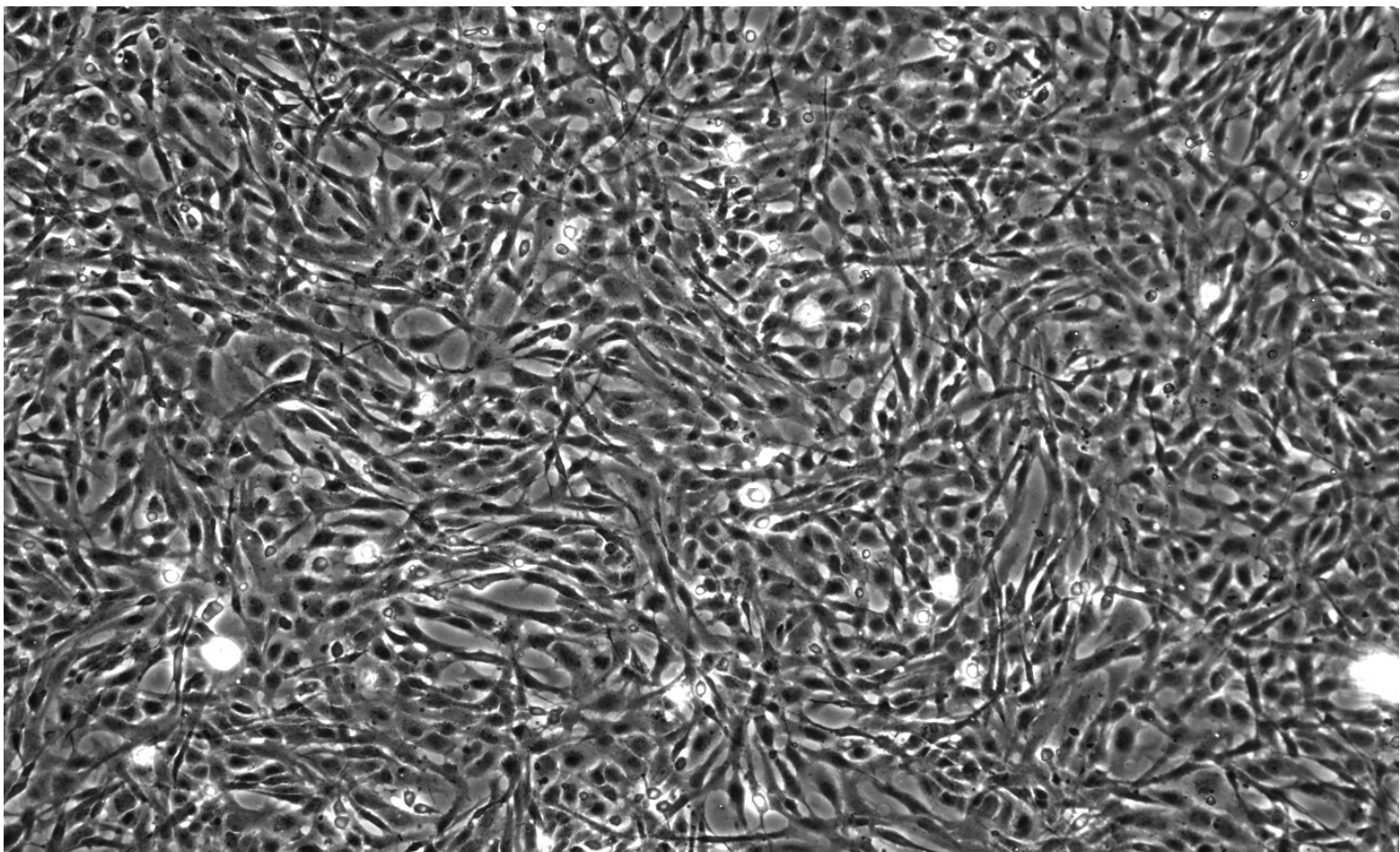


Kiemenzellen statt Fische für Toxizitätstests

Bevor Chemikalien auf den Markt kommen, durchlaufen sie zum Schutz des Menschen und der Umwelt eine Risikobewertung. Dazu werden jährlich Tausende von Tierversuchen durchgeführt. Forschende der Eawag konnten nun zeigen, dass auch eine Kiemenzelllinie der Regenbogenforelle die akute Toxizität von Chemikalien für Fische zuverlässig vorhersagen kann. Ein internationaler Ringtest ist nun der nächste Schritt auf dem Weg zu einer Zertifizierung.



Yang Yue

Abb. 1: Die aus den Kiemen der Regenbogenforelle gewonnene Zelllinie RTgill-W1 eignet sich für Toxizitätstests mit Chemikalien.

Auch wenn Chemikalien aufgrund ihrer Eigenschaften in unserem Alltag sehr nützlich sind, können sie für Mensch und Umwelt eine Gefahr darstellen. Deswegen werden sie in einem Zulassungsverfahren auf ihre chemisch-physikalischen und toxikologischen Eigenschaften überprüft. So fordert die Chemikalienrichtlinie «Registration, Evaluation und Autorisierung von Chemikalien» (Reach) der Europäischen Union, dass alle Industriechemikalien, die in Mengen von mehr als einer Tonne pro Jahr in den Verkehr gebracht werden, toxikologische Tests bestehen müssen. Mit solchen Tests verbundene Zulassungsverfahren gelten auch für Pflanzenschutzmittel, Biozide und Pharmazeutika.

Die Reach-Forderung bezieht sich auf alle neu zuzulassenden, aber auch auf alte, bisher nur ungenügend untersuchte Substanzen. Dies ist in jedem Fall ein wichtiger Schritt hin zu einem sichereren Umgang mit Chemikalien. Allerdings bringen die Testanforderungen vor allem für die toxikologische Prüfung eine Reihe kritischer Aspekte mit sich. Sie benötigen nicht nur Zeit und personellen Aufwand, sondern vor allem auch viele Tierversuche. Allein in der Schweiz wurden 2011 laut dem Bundesamt für Veterinärwesen rund 18'500 Fische für Versuche zum Schutz von Mensch, Tier und Umwelt eingesetzt; 2012 waren es knapp 5000 Fische (<http://tv-statistik.ch/de/statistik/index.php>). Daneben kommen toxikologische Untersuchungen an Tieren auch in anderen Bereichen wie der Grundlagenforschung oder Produktentwicklung zum Einsatz. Hochrechnungen zeigen, dass sich mit den gegenwärtig akzeptierten und regulatorisch geforderten Tierversuchen unmöglich alle Chemikalien prüfen lassen, die untersucht werden müssten [1].

Zuerst die relevanten Chemikalien identifizieren

Neue Teststrategien sind demnach dringend gefragt. Es muss darum gehen, Verfahren zu entwickeln, die eine effiziente Priorisierung von Chemikalien erlauben, um jene Kandidaten zu identifizieren, die dann tatsächlich noch in Tierversuchen überprüft werden müssen. Eine Kombination verschiedener Verfahren erscheint dabei am sinnvollsten. So könnte man zum Beispiel mathematische Simulationen mit biologisch-experimentellen Modellen kombinieren. Mit Ersteren lassen sich anhand der Eigenschaften der Chemikalien deren biologische Effekte oder deren Verteilung in den Geweben eines Organismus vorhersagen. Letztere ermöglichen Rückschlüsse auf toxikologisch relevante Effekte. Hierfür eignen sich Testsysteme, die auf Enzymen oder Zellen basieren, wenig Laborplatz benötigen, weniger giftigen Abfall verursachen und automatisierte Hochdurchsatzanalysen mit Robotern erlauben.

Aber auch Verfahren mit kleinen Organismen können hilfreich sein. So ist seit Herbst 2013 die neue Testrichtlinie OECD 236 der Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (OECD) in Kraft, welche die Quantifizierung der akuten Fischtoxizität anstatt mit juvenilen oder adulten Fischen mit Embryonen des Zebrafisches erlaubt. Zahlreiche Studien unter anderem von Forschenden der Eawag haben gezeigt, dass die Embryonen genauso empfindlich auf kurzfristige, hohe (also akute) Chemikalienexpositionen reagieren

Wussten Sie, dass

- Fische zu den am häufigsten eingesetzten Wirbeltieren für toxikologische Untersuchungen zum Schutz der Umwelt gehören?
- Chemikalien und Industrieabwässer mithilfe von Fischen auf ihre Toxizität untersucht werden?
- der akute Toxizitätstest der am häufigsten eingesetzte Test mit Fischen ist?



wie Fische älteren Stadiums [2,3, Video]. Zwar verläuft der Embryotest wie der traditionelle akute Fischtoxizitätstest (OECD 203) über vier Tage, weist aber ein wesentlich kleineres und flexibleres Format auf. Deshalb ist zu erwarten, dass Dossiers zu Chemikalienzulassungen aus der Industrie künftig vermehrt Daten aus dem Embryotest statt aus dem traditionellen akuten Fischtest beinhalten werden. Kommt hinzu, dass der Test mit Zebraquarienfisch-Embryonen nach den gegenwärtigen Bestimmungen nicht als Tierversuch gilt und ethisch weniger problematisch ist [4]. Der Embryotest erlaubt es zudem, auch komplexe Wirkungen, zum Beispiel auf die Organentwicklung oder auf das Verhalten, zu bestimmen. Und er lässt sich im Hochdurchsatzverfahren anwenden. Deshalb steht er mittlerweile sogar als Alternative für mehrwöchige Fischtests zur Diskussion [5].

Können Zelllinien Tests mit adulten Fischen ersetzen?

Wir sind der Frage nachgegangen, ob nicht auch Fischzellen die akute Toxizität auf Fische vorhersagen können. Dahinter steht folgende Überlegung: Mit dem akuten Fischtoxizitätstest untersucht man, wie oben erwähnt, wie hoch die Letalität der Fische ausfällt, wenn diese vier Tage hohen Chemikalienkonzentrationen ausgesetzt sind. Eine solch rasche und massive Belastung geht in den meisten Fällen mit einer starken Schädigung jener Zellen und Gewebe einher, die mit dem Wasser direkt in Kontakt stehen. Wegen ihrer grossen Oberfläche besonders exponiert sind die Kiemen. Eine Beeinträchtigung der Kiemenzellen bringt lebenswichtige Funktionen wie die Sauerstoffzufuhr und den Ionenaustausch zum Erliegen. Gelingt es demnach, eine solche Vitalitätsschädigung bei Zellkulturen zu quantifizieren, sollte es möglich sein, die letalen Chemikalienkonzentrationen für den Fisch vorherzusagen.

Aufgrund dieser Überlegungen entschieden wir uns für eine Zelllinie, die aus den Kiemen einer Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) gewonnen wurde. Diese Zelllinie trägt die Abkürzung RTgill-W1, was für «Rainbow trout gill – Waterloo 1» steht. Sie wurde an der Universität Waterloo in Kanada etabliert [6] (Abb. 1). Diese Zelllinie ist eine so genannte permanente oder unsterbliche Zelllinie, was bedeutet, dass man sie beliebig oft vermehren und kultivieren kann. Sie stellt also potenziell einen echten Ersatz für Tierversuche dar.

RTgill-W1-Zellen zeigen vergleichbare Resultate

Davon, wie sich eine Zelllinie gewinnen lässt, und von den anfänglichen Herausforderungen, das Testprotokoll mit der RTgill-W1-Zelllinie zu etablieren, berichteten wir ausführlich in der [Eawag News Nr. 68](#) vom Februar 2010. Die wichtigsten Schritte zur Entwicklung eines funktionierenden Protokolls waren: 1. der Einsatz eines Minimalmediums, das keine Moleküle enthält, welche die Zellen zusätzlich vor Chemikalien schützen könnten; 2. eine Art der Dosierung, die eine gleichmässige Exposition der Zellen über das Medium erlaubt; und 3. die Quantifizierung der tatsächlich im Medium vorliegenden Chemikalienkonzentration [7]. Damit haben wir die Expositionsbedingungen der RTgill-W1-Zellen so nah wie möglich an die der Kiemenzellen im Fisch während des akuten Fischtoxizitätstests angepasst.

Um analog zum akuten Fischttest die Konzentration zu bestimmen, die in der Zellpopulation eine Reduktion der Zellvitalität um 50 Prozent hervorruft (EC_{50}), erstellten wir Konzentrations-Wirkungs-Kurven für insgesamt 35 organische Chemikalien [8]. Die ausgewählten Chemikalien unterschieden sich vor allem in ihren toxischen Wirkmechanismen (zum Beispiel unspezifisch-basistoxisch, reaktiv, neurotoxisch), in ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften (etwa bezüglich Flüchtigkeit und Hydrophobie) und in ihrer Fischtoxizität (gering bis hoch). Damit sind sie repräsentativ für viele andere Substanzen.

Die EC_{50} -Werte korrelierten sehr gut mit den LC_{50} -Werten des akuten Fischttests (Abb. 2). Mit LC_{50} wird jene Chemikalienkonzentration bezeichnet, bei der 50 Prozent der Versuchstiere sterben. Tatsächlich unterschieden sich die beiden Effektkonzentrationen bei bis zu 73 Prozent der Chemikalien um weniger als den Faktor 5. Dies gilt sowohl für Substanzen mit einem breiten Spektrum an Wirkmechanismen, vielseitigen physikalisch-chemischen Eigenschaften als auch solchen mit niedriger bis hoher Toxizität. Die untersuchten reaktiven Chemikalien wie Dimethylbutadien und Hexachlorophen unterscheiden sich zum Beispiel über drei Zehnerpotenzen in ihrer Hydrophobie und in ihrer Toxizität. Trotzdem konnte der Zellinientest ihre akute Toxizität auf Fische gleichermassen gut vorhersagen. Lediglich bei fünf Stoffen wichen die Effektkonzentrationen der beiden Tests um mehr als das Zehnfache voneinander ab. Der Zelltest reagierte bei diesen Chemikalien gegenüber dem Fischttest weniger empfindlich. Drei dieser Chemikalien – die Insektizide Permethrin und Lindan sowie das Alkaloid Coffein – haben eine neurotoxische Wirkung und binden ganz spezifisch an Ionenkanäle im Nervensystem, die in der verwendeten Kiemenzelllinie nicht vorhanden sind.

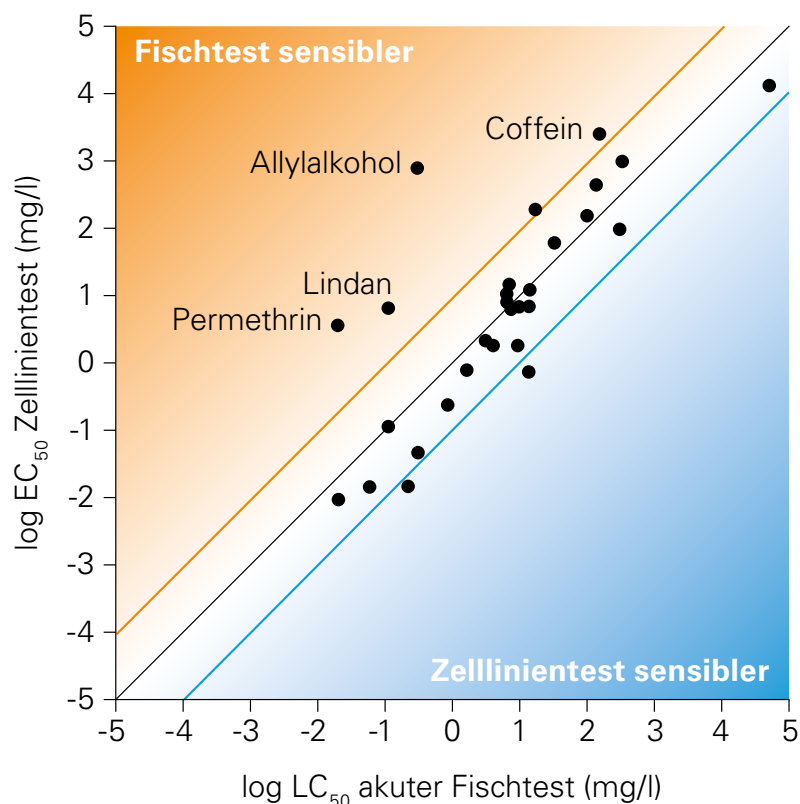


Abb. 2: Vergleich zwischen den Effektkonzentrationen des akuten Fischttests (LC_{50}) und des Zellinientests (EC_{50}). Die schwarze Linie markiert identische Effektkonzentrationen für beide Testsysteme. Die farbigen Linien markieren eine zehnfache Abweichung davon.

Der grösste Ausreisser war Allylalkohol. Hier sprach der Zelltest erst bei massiv höheren Konzentrationen an als der Fischttest. Von Säugetieren weiss man, dass das Enzym Alkoholdehyd

rogenase diese Substanz in das sehr giftige Acrolein umwandelt. Acrolein wirkte auch in den RTgill-W1-Zellen sehr giftig. Das legt die Vermutung nahe, dass die enzymatische Umwandlung des Allylalkohols in Acrolein in den RTgill-W1-Zellen nicht oder nur in geringem Mass abläuft. Dasselbe Bild ergab übrigens auch der oben erwähnte Test, der auf Embryonen des Zebra-bärblings basiert [3].

Auf dem Weg zur Zertifizierung

Mit dem Embryotest untersuchten wir zudem die gleichen Chemikalien wie mit den RTgill-W1-Zellen [3]. Dies erlaubte einen Vergleich der beiden Methoden. Auch hier korrelierten die Toxizitätswerte der Tests sehr gut miteinander. Nahezu alle Werte variierten weniger als das Zehnfache (Abb. 3). Dies gilt auch für Allylalkohol. Der grösste Unterschied ergab sich für Rotenon. Es ist bekannt, dass Rotenon sehr giftig für Fische ist. Im Zelltest erwies es sich als 780-fach wirksamer als im Embryo. Die Resultate machen deutlich, dass die RTgill-W1-Zelllinie ein ähnlich hohes Potenzial aufweist wie der Test mit Zebra-bärbling-Embryonen, um als Alternative zum traditionellen akuten Fischtest eingesetzt zu werden. Ein solches Testsystem erfordert keine Versuchstiere mehr.

Bis der Zellinientest jedoch internationale Anerkennung findet und sich breit einsetzen lässt, steht ihm noch ein weiter Weg bevor. Zunächst gilt es zu prüfen, ob Industrie- und andere Forschungslabors die Methode ebenfalls etablieren und wiederholbar gleiche Ergebnisse liefern können. Um dies herauszufinden, haben wir kürzlich einen internationalen Ringtest gestartet. Zeigt dieser, dass das Testprotokoll robust ist, streben wir eine Zertifizierung der OECD an, so wie dies für das Verfahren erfolgt ist, das auf Zebra-bärbling-Embryonen basiert. Allerdings benötigt eine solche Zertifizierung erheblich Zeit, da sie eine Harmonisierung der Vorschläge und Meinungen von Experten

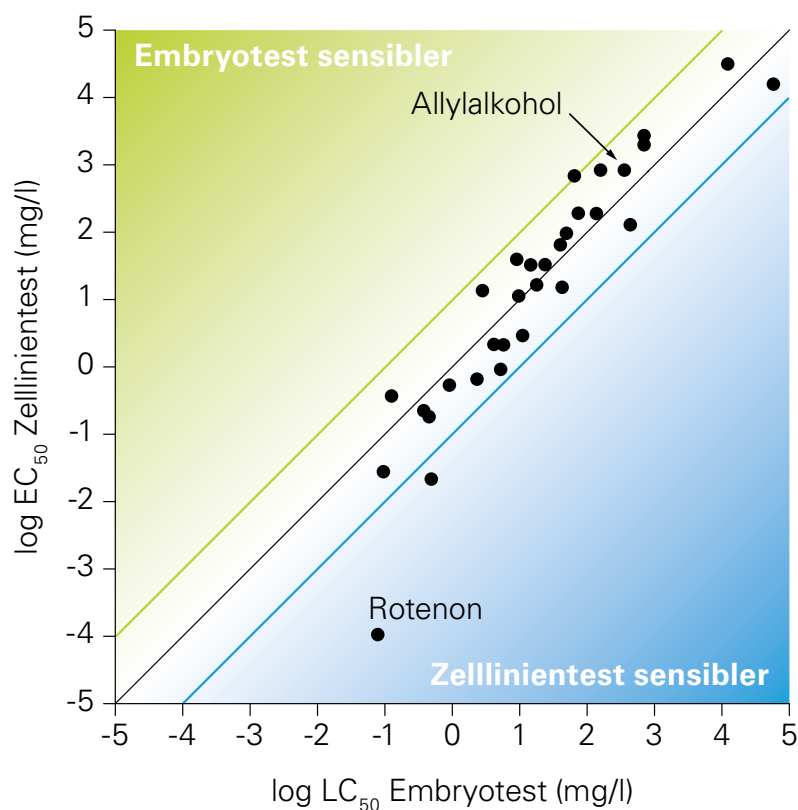


Abb. 3: Vergleich zwischen den Effektkonzentrationen des Embryotests (LC_{50}) und des Zellinientests (EC_{50}). Die schwarze Linie markiert identische Effektkonzentrationen für beide Testsysteme. Die farbigen Linien markieren eine zehnfache Abweichung davon.

aus vielen verschiedenen Vertreterländern beinhaltet. Beim Embryotest vergingen von der Einreichung des ersten Testprotokolls bis zur Genehmigung sieben Jahre – was vergleichsweise kurz ist.

Die Zertifizierung durch weltweit abgestützte Organisationen ist sehr wichtig, da sich nur so sicherstellen lässt, dass die Testergebnisse auch international anerkannt werden. Die OECD und andere beteiligte Organisationen wie das European Union Reference Laboratory for alternatives to animal testing bemühen sich, Zertifizierungen zu beschleunigen. Das ist dringend notwendig, um neue Methoden schnell für die Chemikalienbewertung zugänglich zu machen. Wir stellen das Protokoll des Zellinientests zudem auf Wunsch bereits jetzt zur Verfügung. Denn dieser könnte über die Chemikalienbeurteilung hinaus auch für die Produktentwicklung oder die Untersuchung von Kläranlagenausläufen von grossem Nutzen sein.

Die hier vorgestellten Forschungsarbeiten führten Forschende der Abteilung Umwelttoxikologie im Rahmen des Projektes CEllSens durch, das vom European Chemical Industry Council (CEFIC) und vom britischen Department for Environment Food and Rural Affairs gefördert wurde. Das CEFIC unterstützt zudem gemeinsam mit dem britischen National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research die gestartete Ringstudie.



Kristin Schirmer, Leiterin der Abteilung Umwelttoxikologie
Koautoren: Melanie Knöbel, Katrin Tanneberger
kristin.schirmer@eawag.ch

[1] Hartung T., Rovida C. (2009): Chemical regulators have overreached. *Nature* 460, 1080–1081
<http://www.nature.com/nature/journal/v460/n7259/full/4601080a.html>

[2] Belanger S.E., Rawlings J.M., Carr G.J. (2013): Use of fish embryo toxicity tests for the prediction of acute fish toxicity to chemicals. *Environmental Toxicology and Chemistry* 32(8), 1768–1783
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/etc.2244/abstract>

[3] Knöbel M., Busser F.J.M., Rico-Rico A., Kramer N.I., Hermens J.L.M., Hafner C., Tanneberger K., Schirmer K., Scholz S. (2012): Predicting adult fish acute lethality with the zebrafish embryo: Relevance of test duration, endpoints, compound properties, and exposure concentration analysis. *Environmental Science & Technology* 46(17), 9690–9700
<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es301729q>

[4] Halder M., Léonard M., Iguchi T., Oris J.T., Ryder K., Belanger S.E., Braunbeck T.A., Embry M.R., Whale G., Norberg-King T., Lillicrap A. (2010): Regulatory aspects on the use of fish embryos in environmental toxicology. *Integrated Environmental Assessment and Management* 6, 484–491 <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ieam.48/abstract>

[5] Volz D.C., Belanger S., Embry M., Padilla S., Sanderson H., Schirmer K., Scholz S., Villeneuve D. (2011): Adverse outcome pathways during early fish development – A conceptual framework for identification of chemical screening and prioritization strategies. *Toxicological Science* 123(2), 349–358 <http://toxsci.oxfordjournals.org/content/123/2/349.abstract>

[6] Bols N.C., Barlian A., Chirinotrejo M., Caldwell S.J., Goegan P., Lee L.E.J. (1994): Development of a cell-line from primary cultures of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), Gills. *Journal of Fish Diseases* 17, 601–611
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2761.1994.tb00258.x/abstract>

[7] Tanneberger K., Knöbel M., Busser F.J.M., Sinnige T.L., Hermens J.L.M., Schirmer K. (2013): Predicting fish acute toxicity using a fish gill cell line-based toxicity assay. *Environmental Science & Technology* 47(2), 1110–1119
<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es303505z>

[8] Tanneberger K., Rico-Rico A., Kramer N.I., Busser F.J.M., Hermens J.L.M., Schirmer K. (2010): Effects of solvents and dosing procedure on chemical toxicity in cell-based in vitro assays. *Environmental Science & Technology* 44(12), 4775–4781
<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es100045y>