



Auf der Suche nach in vitro-Modellen für die Neuroteratologie

Christoph A. Reinhardt

Schweizerisches Institut für Alternativen zu Tierversuchen SIAT
Zell-Labor, Turnerstrasse 1, CH-8006 Zürich

Zusammenfassung

Die bestehenden in vitro-Modelle zur Abschätzung einer neuroteratologischen Wirkung werden kurz vorgestellt mit Betonung auf embryonale Hirnzellen in vitro (Flach- und Aggregat-Kulturen unter dauernder Schüttelbewegung). Ein neues in vitro-Modell zur Erkennung potentieller Schadwirkungen, basierend auf durchmischten embryonalen Hirnzellen aus dem Hühnerei (7 Tage bebrütet) wird beschrieben. Flach- und Aggregat-Kulturen werden aus derselben Zellpopulation angesetzt und nach verschiedenen Behandlungszeiten mit und ohne Testsubstanz ausgewertet. Die Zellentwicklung und -differenzierung der verschiedenen Zelltypen wird mittels qualitativer PAP-Färbung mit spezifischen Antikörpern gegen Astrozyten (Glia-fibrilläres Protein GFAP) und Nervenzellen (68kD Neurofilament und Tyrosinhydroxylase), sowie mit quantitativem ELISA zur Bestimmung der Zytotoxizität (Neutralrot-Aufnahme) untersucht und gemessen.

Arzneimittel und andere Chemikalien sind auf Grund ihrer bekannten Wirkung auf das Verhalten und das dopaminerge System ausgewählt worden (neurotoxische und neuromodulierende Substanzen). Damit soll die Brauchbarkeit eines stabilen und voll ausdifferenzierenden in vitro-Modells für das Screening einer neuroteratogenen Wirkung untersucht werden.

Summary: In search of an in vitro model for neuroteratology

In vitro models for neuroteratology are briefly reviewed with emphasis on embryonic brain cells in vitro (in Petri dishes and as aggregate cultures under constant gyratory movement). A new model on randomly aggregated cells from embryonic chick brain (embryonic day 7) to detect potential toxic insults is presented. The same cell population is observed on Petri dishes and as aggregate cultures under various treatment schedules. Cell development and differentiation of the various cell types are monitored by qualitative PAP-staining of specific antibodies against glial fibrillary acidic protein (GFAP, marking type-2 astrocytes), 68kD-neurofilament (marking nerve cells) and tyrosine hydroxylase, as well as quantitative ELISA using cytotoxicity endpoints (neutral red uptake).



Drugs and other chemicals are selected on the basis of their known interference with behavior and with the dopaminergic system (neurotoxic and neuromodulatory drugs) in order to evaluate the usefulness of a stable and fully differentiating brain tissue model for screening a neuroteratogenic activity.

Einleitung

Neuroteratologie ist eine Sprachschöpfung, zusammengesetzt aus Neurotoxikologie und Teratologie, d.h. die Wissenschaft über unerwünschte Giftwirkungen von Chemikalien und Arzneimitteln auf das Nervensystem im sich entwickelnden Lebewesen (Embryo und Foetus). Es mag vermessen klingen, dass der Titel dieser Arbeit impliziert, zur Abschätzung dieser weitgefächerten Giftwirkungen könnten *in vitro*-Modelle anstelle von ganzen Tieren eingesetzt werden. Es ist aber zu bedenken, dass ein Grossteil der teratogen wirkenden Substanzen gerade auf das Nervensystem einen verheerenden Einfluss hat. Gerade das berühmt-berüchtigte Thalidomid kam in den USA beispielsweise nicht zu einer allgemeinen Anwendung als Tranquilizer, weil neurotoxische Nebeneffekte wie Neuropathien bekannt waren. Wenn wir nun mit *in vitro*-Screeningtests jegliches schädigende Potential auf das Nervengewebe erfassen könnten, wären wir einen grossen Schritt in der gesamten Teratologie, aber auch in der Neurotoxikologie weiter.

Als Beitrag zu einem Überblick der Möglichkeiten und Anwendungen von Alternativen zu Tierversuchen soll in einem ersten Teil zusammengefasst werden, was bereits an stabilen *in vitro*-Modellen entwickelt wurde. Stabile *in vitro*-Modelle werden hier diejenigen Kulturen genannt, welche einerseits langfristig haltbar sind und andererseits in ihrer Zusammensetzung ähnlich aufgebaut sind wie das Ursprungsgewebe. Damit ist eine Einschränkung auf Organ-Kulturen, Frischschnitt-Kulturen und dreidimensionale Kulturen gemacht, welche in der Anwendung (Abschätzung von weitgefächerten Giftwirkungen) für die Neuroteratologie begründet ist. Auf Zell-Linien und andere zweidimensionale Kulturen von frisch isolierten neuronalen Zellen wird nur kurz eingegangen.

In einem zweiten Teil wird ein neues *in vitro*-Modell mit embryonalen Hirnzellen vorgestellt. Im Gegensatz zu den *in vitro*-Modellen aus embryonalen



Säugerzellen wird bei diesem Modell ein sieben Tage bebrütetes Hühnerei verwendet. Damit wird die Tötung von Muttertieren vermieden.

1. Überblick über *in vitro*-Modelle in der Neuroteratologie

Unsterbliche Zell-Linien wurden bereits seit mehr als zehn Jahren als Testmodelle für die Teratologie vorgeschlagen; bei der praktischen Anwendung unter Routinebedingungen und in der Industrie haben sie sich jedoch nicht durchgesetzt. Die beobachteten Zellveränderungen (Wachstum, Differenzierung, Anhaftvermögen, etc.) lassen sich nämlich kaum auf die Situation im intakten Gewebe übertragen, geschweige denn auf einen ganzen Organismus (Brown & Freeman 1984, Schmid 1985). Im weiten Bereich der Neurotoxikologie werden speziell selektionierte Zell-Linien für die Abklärung von Detailfragen verwendet. So wurden z.B. die PC12-Zellen aus einem Nebennierentumor der Ratte isoliert (Green & Tischler 1976) und als erstaunlich stabile Nervenzelle charakterisiert. So sind gewisse noradrenerge und dopaminerge Funktionen vorhanden, die Zelle reagiert auch auf *nerve growth factor* mit Nervenauwüchsen (Walum et al. 1990).

Frisch isolierte embryonale Hirnzellen werden hingegen mit Erfolg als Modelle zum Screening neuroteratologischer Effekte eingesetzt. So werden Massenzell-Kulturen von 14 Tage alten Rattenembryonen (*Micromass cultures* nach der Methode von Flint, 1987) in mehreren Industriebetrieben in England und den USA (Bristol Myers, ICI, Glaxo Group, Unilever, u.a.) routinemässig verwendet. Der Test befindet sich in einer fortgeschrittenen Phase der Validierung und wird bereits - wohl etwas verfrüht - als *predictive short-term assay for in vivo toxic hazard*, also als voraussagekräftiger Kurzzeittest für eine *in vivo*-Vergiftungsgefahr bezeichnet (Parsons et al. 1990). Dabei werden Hirn- und Extremitätengewebe von 14 Tage alten Rattenembryonen separat in Einzelzellen zerlegt und *in vitro* dicht ausgesät. Nach fünf Tagen Kulturdauer mit und ohne Chemikalienbehandlung wird die Differenzierung anhand der Nervenzell-Differenzierung ("*Foci*") oder der Knorpelbildung (bei den Extremitätenzellen) automatisch ausgewertet und mit der allgemeinen Vitalität der Zellen verglichen.



Ähnlich erfolgreich, obwohl noch nicht so weit validiert wie die obige *micromass* Methode, scheint ein Modell mit Flachzell-Kulturen aus leicht älteren Rattenembryonen (19 Tage) zu sein (Khera & Whalen 1988). Von 109 Chemikalien wurden relativ gute Übereinstimmungen zwischen der in vivo-Neuroteratogenität (tierexperimentelle Resultate und einzelne Humanangaben) und der in vitro-Nervenzellschädigung beobachtet. Einschränkend ist hier zu sagen, dass die meisten dieser Chemikalien in irgend einer Spezies als teratogen erkannt wurden, also eine einseitige Auswahl von Testsubstanzen angenommen werden muss. Ausserdem wurden die Zellkulturen auf einer besonders starken Schicht von Polylysin angesetzt, was eine Selektion der Zelltypen (keine Astrozyten) zur Folge hat.

Hirnschnitt-Kulturen, auch als *organotypische Kulturen* bezeichnet, werden schon seit einigen Jahrzehnten für kurzfristige elektrophysiologische Untersuchungen verwendet (vergl. Olpe & Haas 1985). Langfristige Kulturen solcher Schnitte sind wie andere Organ-Kulturen technisch sehr anspruchsvoll und haben deshalb als toxikologisches Testsystem keine grosse Verbreitung gefunden. Hingegen sind sie wegen der guten Beobachtungsmöglichkeit von einzelnen Zellen im ursprünglichen Zellverband für Einzelzelleitungen speziell günstig. Zweidimensional verästelte Nervenzellen können über ihre ganze Zellaktivität zusammen mit vielen ihrer Nachbarzellen hin studiert werden (Gähwiler 1988). Speziell empfindliche Nervenzellen in bestimmten Hirnregionen können z.B. mit diesen Kulturen erkannt werden.

Aggregat-Kulturen

Aus frisch isolierten Einzelzellen bilden sich unter bestimmten Schüttelbewegungen (Rundschütteln, bzw. *gyratory movement*) sogenannte Zellaggregate aus Hunderten von Einzelzellen, welche sich spontan zu dreidimensionalen, Gewebe-ähnlichen Strukturen zusammenfinden (vergl. Reinhardt 1988). Sie wurden schon in den Fünfzigerjahren erstmals beobachtet, da sie relativ einfach hergestellt werden können. Sie sind ausserordentlich lange in Kultur haltbar, und die Differenzierungsleistungen von embryonalem zu adultem Gewebe sind verblüffend (Moscona 1961, Seeds 1971).

Erst in den letzten Jahren wurde das Potential von Aggregat-Kulturen für die Toxikologie wieder entdeckt. Dank vereinfachter Zellpräparation und verbesserten Kulturmedien können aus embryonalen Hirnzellen reproduzierbare



Kulturen hergestellt werden (Honegger 1985). Sie wurden von einigen Arbeitsgruppen genau charakterisiert. So wurden verschiedene Neurotransmittersysteme während der Kulturdauer auf Differenzierung und Expression hin untersucht. Acetylcholin, Norepinephrin, GABA und Dopamin werden im Verlauf von rund drei Wochen bis zu einem stabilen Plateau synthetisiert, und die sich entwickelnden Nervenzellen können diese Transmitter aufnehmen und kontrolliert abgeben (Majocha et al. 1981, Segal & Fedoroff 1989). Neben den Transmittern wurden auch die wichtigsten Schlüsselenzyme (wie Tyrosinhydroxylase und Neuron-spezifische Enolase; Monnet-Tschudi & Honegger 1989) und verschiedene Rezeptoren untersucht (wie *mu*, *delta* and *kappa opoid* Rezeptoren; Barg et al. 1989). Zellbewegungen zur Schichtenbildung, elektrophysiologische Spontantätigkeit, Synaptogenese und Myelinisierung lassen im weiteren darauf schliessen, dass in diesen Aggregaten alle wichtigen Hirnfunktionen angelegt sind.

Die meisten toxikologischen Arbeiten an Aggregat-Kulturen werden mit Hirnzellen aus 14-17 Tage alten Rattenembryonen durchgeführt (Atterwill 1989; Tottmar et al 1989, Kerlero de Rosbo et al. 1990). Kürzlich wurde das Modell auch zum Screening für potentielle Teratogene vorgeschlagen (Honegger & Werffeli 1988). Eine erste Validierungstudie im Vergleich mit Embryo-Kulturen von Ratte und Huhn (Cicurel & Schmid 1988; Kucera & Burnand 1988) steht kurz vor ihrem Abschluss.

2. Flach-und Aggregat-Kulturen aus dem Hühnerembryo

Warum das Huhn als Spezies?

1. Die heute noch verwendeten Tier-Modelle (Maus, Ratte, Kaninchen, Hund etc.) zur Abschätzung einer neuroteratogenen Wirkung von Arzneimitteln und Chemikalien sind offensichtlich unzuverlässig (Khera & Whalen 1988). Diese Arbeit enthält eine reiche Quelle von in vivo-Daten, welche belegen, wie die verschiedenen Tierarten unter sich auf dieselben Chemikalien reagieren können: von deutlich positiv bis klar negativ.
2. Aus der Literatur ist eine reichhaltige Sammlung von Angaben über das Hühnerei als teratologisches Testmodell vorhanden. Vor mehr als 20 Jahren wurde von der WHO (1967) zwar ein kritischer Bericht zur Verwendung von Hühnerembryonen als Testsystem für teratogene Effekte publi-



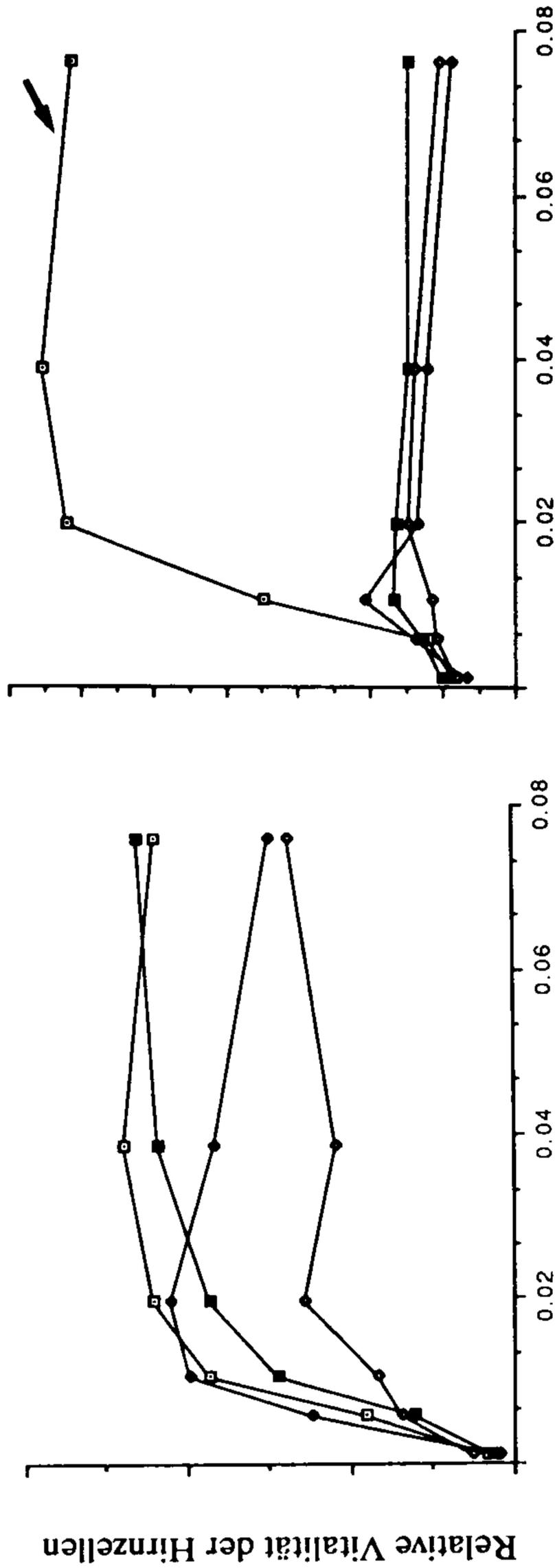
- ziert. Ein Hinterfragen dieses Berichts im Zusammenhang mit besseren Behandlungsmethoden (Jelinek et al. 1985) wäre heute wieder angebracht.
3. Die Zellen werden direkt aus dem bebrüteten Hühnerei entnommen, um das Töten von Muttertieren zu vermeiden.
 4. Neben den vorhandenen *in vitro*-Modellen mit Nagerzellen sollte eine weitere Tierart miteinbezogen werden. Gerade weil sich der Hühnerembryo unabhängig von einem mütterlichen Organismus entwickelt, kann das schädigende Potential auf Hirnzellen direkter mit *in vivo*-Wirkungen korreliert werden.

Im Huhn ist das dopaminerge System im Vorderhirn, Tegmentum und vor allem im Hirnstamm entwickelt (Parent et al. 1984). In Neuronen aus acht Tage alten Hühnerembryonen bildet sich bereits das dafür notwendige Enzym Tyrosinhydroxylase (Louis et al. 1981). Es ist auch bekannt, dass die Gliazellen unter Kulturbedingungen eine regulierende Funktion haben, d.h. in Abwesenheit von Astrozyten wird das Enzym Tyrosinhydroxylase überproduziert (Ebel et al. 1974).

Entwicklung des in vitro-Modells

Bei der Entwicklung unseres Modells haben wir deshalb darauf geachtet, dass alle Zelltypen *in vitro* erhalten bleiben. In Aggregat-Kulturen ist diese Voraussetzung gegeben, da alle Zellen spontan aneinander haften und sich selbst reorganisieren. In Flach-Kulturen muss dies durch eine spezielle Petrischalen-Behandlung (Kollagen und Polylysin) simuliert werden. Die Astrozyten unter den Gliazellen werden speziell durch Polylysin in ihrer Wachstumsgeschwindigkeit gebremst (Fig. 1). Die Nervenzellen sind aber für eine volle Entwicklung vom Vorhandensein der Astrozyten abhängig. Bei der Wahl des optimalen "Ausgangsmaterials", d.h. des Stadiums des Embryos, ist der bereits vorhandene Entwicklungsstand der Zellen von ausschlaggebender Bedeutung: Zum Zeitpunkt der Gewebedissoziation zur Gewinnung der Hirnzellen sind in unserem Fall noch kaum Nervenfortsätze ausgebildet. Im Zellkulturmedium müssen ausserdem die zur weiteren Differenzierung notwendigen Wachstumsfaktoren vorhanden sein.

Käufliche Standard-Kulturmedien (MEM : MCDB 201 = 1:1) wurden im wesentlichen mit drei Hormonen (Progesteron, T3, Putrescin) und 5% foeta-



Beschichtungs-Konzentration von Collagen (in %)

Fig. 1. Zur Entwicklung von optimalen Flachkulturen sind die Anhaftfaktoren Polylysin und Collagen auf den Petrischalenboden aufgeschichtet worden. Gemessen wurde die Menge der lebenden Zellen nach 2 Tagen (links) und 6 Tagen (rechts) Kulturdauer der embryonalen Hirnzellen aus dem Hühnerrei. Die aussergewöhnlich starke Zunahme der Zellmenge nach 6 Tagen ohne Polylysin-Beschichtung (Pfeil) beruht auf einem überproportionierten Wachstum der Gliazellen.

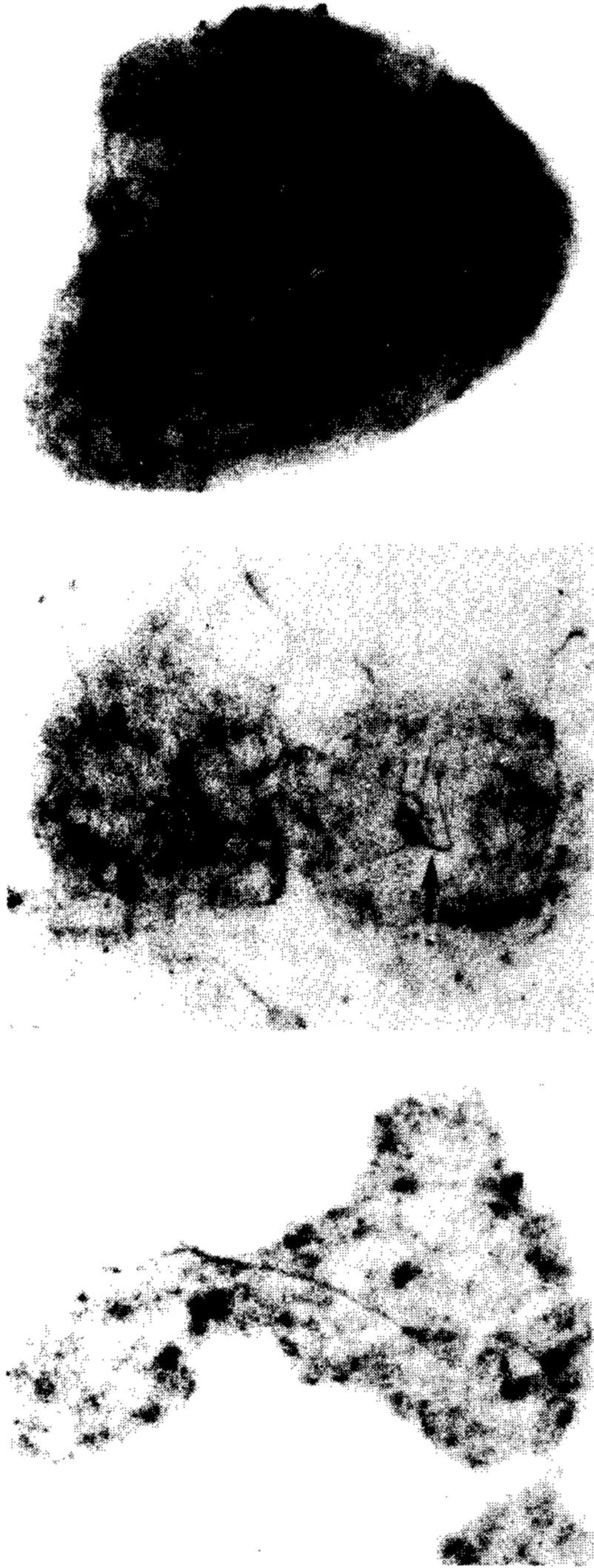
Beschichtungs-Konzentration von Polylysin: (●) 0.05, (■) 0.1, (▲) 0.2 mg/ml. (▲) = Kontrolle ohne Polylysin.

lem Kälberserum ergänzt. Die Hirnzellen wurden aus dem ganzen Gehirn von 168 Stunden lang bebrüteten Hühnereiern (37.2°C) gewonnen. Durch mechanische Dissoziation und Filtrierung erhält man in diesem Stadium eine Zellsuspension mit hoher Vitalität. Flach-Kulturen wurden in einer Dichte von 300'000 Zellen/cm² angesetzt und erst bei Beginn der Behandlung (am 3. Tag) mit neuem Medium plus Testsubstanz versetzt. Am 6.Tag in vitro wurden neben einer morphologisch-qualitativen Auswertung die Vitalität (Neutralrot-Aufnahme, Borenfreund & Puerner 1985) und der Proteingehalt (Biorad Kit) spektrophotometrisch auf 96er-Mikrotiterplatten bestimmt. Für die Aggregat-Kulturen wurden sechs Millionen Zellen mit 3 ml Medium in 25 ml Erlenmeyer-Flaschen gegeben und unter dauernder Schüttelbewegung (70-82 U/min steigend, ab 8. Tag 82 U/min) kultiviert. Für die immunocytochemische Färbung wurden die Aggregate auf beschichteten Deckgläsern 24 Stunden anhaften gelassen und dann mit der Antikörper-PAP-Methode nach Sternberger (1986) gefärbt (Wyle & Reinhardt 1991).

Erste Resultate

Flach- und Aggregat-Kulturen wurden, neben optischer Beobachtung der Zelltypen, spezifischen Zellmarkern für differenzierte Astrozyten (Gliafibrilläres saures Protein, GFAP) und Nervenzellen (68kD Neurofilament) im Verlaufe der Kultur untersucht. Generell ist beobachtet worden, dass speziell in den Flach-Kulturen diese Zellmarker schneller erscheinen als im intakten Embryo (Wyle & Reinhardt 1991). Aggregat-Kulturen aus sieben Tage alten Hühnerembryonen entwickeln und differenzieren sich im Kulturmedium im Verlauf von zwei Wochen in vitro. In Figur 2 wird durch eine Antikörper-Färbung das Marker-Protein Neurofilament (68kD) angezeigt. Die Neurofilamente sitzen in Nervenzellen und zeigen vor allem in den älteren Kulturen lange Nervenfortsätze an (Pfeile). In Figur 3 ist eine analoge Färbung für Glia-fibrilläres Protein (GFAP) dargestellt. GFAP sitzt im Strukturgerüst der Astrozyten-Glia, welche sich in diesem in vitro-Modell nach 2 Wochen Kulturdauer aussergewöhnlich exprimiert (Pfeil).

Als Voraussetzung detaillierter neuroteratologischer Studien am dopaminergen System unserer in vitro-Modelle sind die generell zytotoxischen Effekte der zu untersuchenden Chemikalien festzustellen. In Tabelle 1 sind erste Resultate nach Behandlung von zehn Chemikalien und Arzneimitteln, inklusive Neuroleptika, dargestellt. Als Vergleich zu den Flach-Kulturen aus dem



2 Wochen in vitro

1 Woche in vitro

2 Tage in vitro

Figur 2: Aggregat-Kulturen nach 2, 7 und 15 Tagen in vitro, Nervenzellen (Neurofilament) sind angefärbt (Siehe Text).

embryonalen Hirn sind ebenfalls Kulturen aus der Retina derselben Hühnerembryonen angesetzt worden. Dabei können organspezifische Unterschiede erkannt werden, wenn nämlich die Empfindlichkeiten (also hier die NR-50, die mittlere Konzentration, welche die Vitalität der Zellen schädigt) und spezifische Effekte auf einzelne Zelltypen verglichen werden.

Auf die biochemische Zusammensetzung der Eiweisse in den Aggregat-Kulturen wurde in einer vorläufigen Untersuchung näher eingegangen. Damit sollte abgeklärt werden, ob durch eine Substanz nur einzelne Proteine verändert werden, oder ob generelle Einflüsse auf die Proteinsyntheseraten ablaufen. Mehrere Proteine scheinen im Falle von Cadmium entweder stärker oder dann deutlich schwächer synthetisiert zu werden, wenn eine Konzentration von Cadmium zugegeben wird, welche rund zehnfach unter der zytotoxischen Konzentration (NR-50) liegt (Reinhardt et al. 1991). Für weitere Chemikalien muss dies noch untersucht werden.

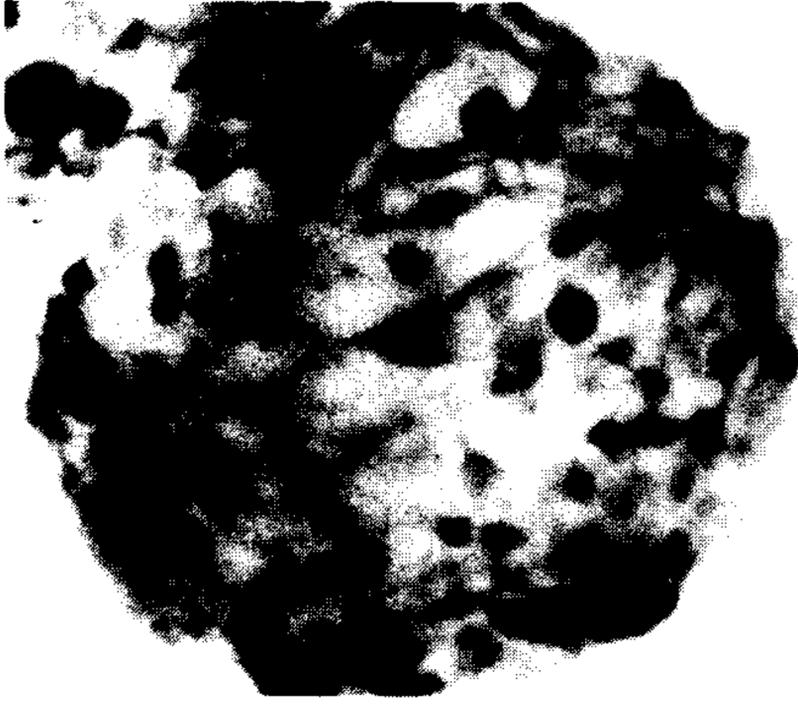
Tabelle 1

Zytotoxischer Effekt (in mM) verschiedener Chemikalien auf embryonale Hühnerzellen aus Hirn und Retina (7 Tage bebrütet, 6 Tage kultiviert)

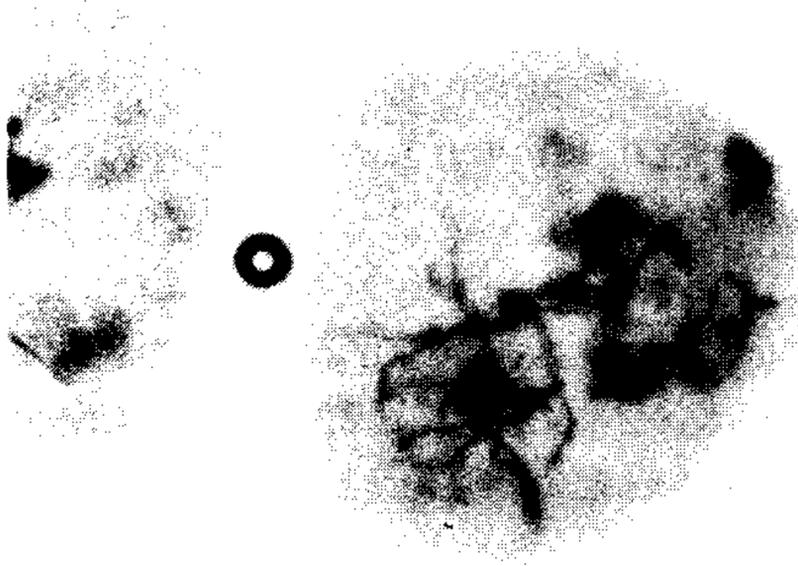
	Hirnzellen		Retinazellen	
	NR-50^a	Glia^b	NR-50^a	Sehzellen^b
Acetylsalicylsäure (Analgetikum)	3.0	0.3	1.0	0.1
Arsensäure	0.3	0.3	0.3	0.1
Cadmiumchlorid	0.005	0.003	0.003	0.001
Diphenylhydantoin (Antiepileptikum)	0.1	0.03	0.3	0.1
Koffein	0.6	0.03	0.6	0.03
Meprobamat (Tranquilizer)	1.0	0.3	1.0	0.03
Penicillin	>1.0	1.0	1.0	0.3
Saccharin	>3.0	1.0	>1.0	1.0
Theophyllin	0.7	0.3	1.0	0.3
2,3,4-T (Herbizid)	0.5	0.3	0.5	0.1

^a) Die Zytotoxizität entspricht einer 50%igen Schadwirkung, gemessen mit dem Neutralrot-Aufnahmetest nach Borenfreund & Puerner (1985)

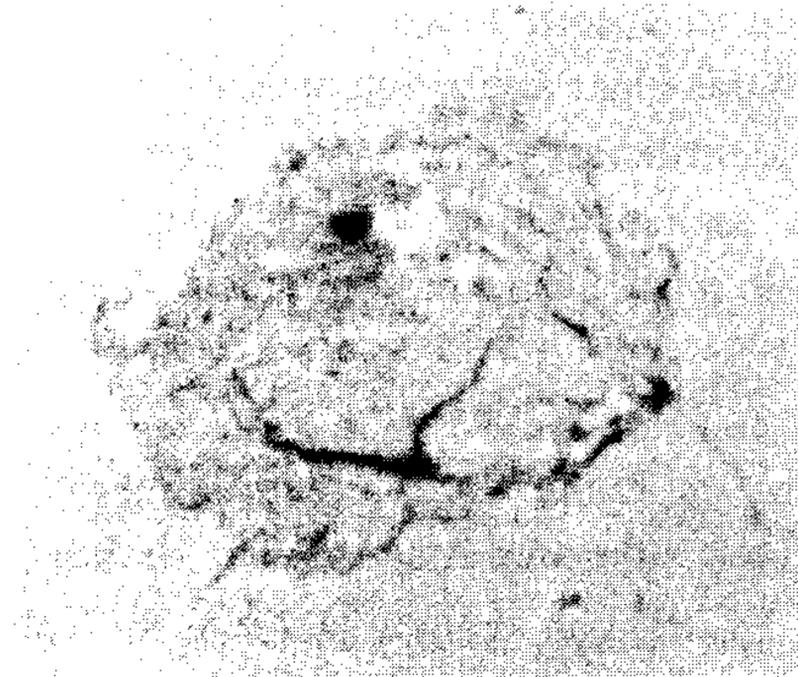
^b) Niedrigste Konzentration mit morphologischem Effekt auf Glia, bzw. Sehzellen



2 Wochen in vitro



1 Woche in vitro



2 Tage in vitro

Figur 3: Aggregat-Kulturen nach 2, 7 und 15 Tagen in vitro, Gliazellen (GFAP-positive Astrozyten) sind angefärbt (Siehe Text).



Neuroteratologische Relevanz

Die hier dargestellten Untersuchungen lassen einen ersten Eindruck über die Dynamik und Reproduzierbarkeit des *in vitro*-Modells zu. Der Vergleich mit bekannten Wirkungen auf das Nervensystem lässt sich in der Beeinflussung der Gliazellen führen. Dabei ist im besonderen bekannt, dass die Astrozyten mit ihrem Zellmarker GFAP von verschiedensten Neurotoxinen und Teratogenen zu einem erhöhten Wachstum induziert werden. Diese Vermehrung von Astrozyten-Glia scheint eine Art Regenerationseffekt nach Schädigungen und Verletzungen zu sein (O'Callaghan 1988). In Flach-Kulturen findet diese relativ unspezifische Reaktion unter den gewählten, standardisierten Bedingungen von Wachstumshormonen im Kulturmedium und Beschichtung bereits statt. Sie kann jedoch durch stark toxische Einflüsse weiter verstärkt werden und dient damit als Indikator für potentielle Schädigungen. Unter den viel stabileren Bedingungen der Aggregat-Kulturen ist ebenfalls eine im Vergleich zur *in vivo*-Entwicklung beschleunigte Bildung der Astrozyten festgestellt worden. Wenn aber die Aggregate einmal ausgebildet sind, können toxische Einflüsse nicht so rasch wie in Flach-Kulturen wirken, da die Einzelzellen durch die dreidimensionale Anordnung und die Vielschichtigkeit in diesem Modell geschützt sind. Umsomehr ist zu erwarten, dass bei den Aggregat-Kulturen nur Schädigungen feststellbar sein werden, welche mit hoher Wahrscheinlichkeit auch bei einer Vergiftung im Organismus auch auftreten können.

Ausserdem müssen die funktionellen Veränderungen an Nervenzellen verfolgt werden. Nach einigen Tagen können in unsern Flach- und Aggregat-Kulturen vereinzelte dopaminerge Zellen anhand einer spezifischen Antikörper-Färbung für das Enzym Tyrosinhydroxylase identifiziert werden. Vor allem 1-2 Wochen alte Aggregat-Kulturen enthalten stark positive Zellen, welche ein fein verzweigtes dendritisches Netzwerk mit Synapsen-ähnlichen Verdickungen aufweisen (Reinhardt et al. 1991).

Das dopaminerge Überträgersystem im Gehirn kann beim Menschen durch Neurotoxine geschädigt werden und führt zu der schwer behandelbaren chronischen Parkinson-Krankheit. Es ist vor einigen Jahren in Kalifornien bekannt geworden, dass ein bestimmtes Rauschgift (MPTP) schwere Parkinson-Symptome auslöst, indem es die dopaminergen Zellen gezielt ausschaltet



(Kopin & Markey 1988). Andere Rauschgifte und die meisten Neuroleptika haben ebenfalls eine deutliche Wirkung auf die Regulierung von Dopamin (Snyder 1990). Amphetamine zeigen eine besonders gut bekannte Wirkung auf das dopaminerge System (Cho 1990). In dieser Gruppe von hochaktiven Pharmaka sind spiegelbildlich identische Moleküle mit einer stereoselektiven Wirkung bekannt, welche als Testchemikalien zur Prüfung der Relevanz eines in vitro-Modells zugezogen werden sollten.

Ausblick

Neuroteratogenes Potential wurde nach bisherigen toxikologischen Prinzipien mit einer empfindlichen Tierart abgeschätzt. Es ist heutzutage sehr fraglich, ob ein solches Modell noch akzeptabel ist, da ja zuerst diese Tierart für jede Testsubstanz von neuem gefunden werden muss. Hier sind deshalb in vitro-Modelle einsetzbar. Im Verlauf einer Validierung solcher in vitro-Modelle muss vor allem nachgewiesen werden, dass sie empfindlich reagieren um **eine potentielle Schädigung** zu erkennen, dass sie **nur relevante Schädigungen** zeigen, aber auch dass sie **unabhängig von der Spezies**, von der die Zellen gewonnen werden, auf Neuroteratogene ansprechen. Da sich diese Anforderungen teilweise ausschliessen, sind mehrere in vitro-Modelle anzustreben, welche sich zu einer Batterie ergänzen.

Verdankungen

Die vorliegende Arbeit wurde von der Stiftung *Fonds für versuchstierfreie Forschung* (Zürich), durch *Pro Tier* (Zürich) und vom *Schweiz. Nationalfonds* grosszügig unterstützt. Im besonderen möchte ich Frau Theres Romano-Diethelm und Frau Gabriella Wyle-Gyurech für ihre wertvolle Mitarbeit danken.

Literatur

- Atterwill CK: *Molec. Toxicol.* 1, 489-502 (1989)
- Barg J, Levy R & Simantov R: *J. Neurosci. Res.* 22, 322 (1989)
- Borenfreund E & Puerner JA: *Toxicol. Lett.* 24, 119 (1985)
- Brown NA & Freeman SJ: , *ATLA* 12, 7-23 (1984)
- Cho AK: *Science* 249, 631 (1990)
- Cicurel L. & Schmid B: *Experientia* 44, 833-840 (1988)
- Ebel A, Masdsarelli R, Sensenbrenner M & Mandel P: *Brain Res.* 76, 461-472 (1974)
- Flint OP: In *In vitro methods in toxicology* by Atterwill & Steele (eds), 339-363 (1987)
- Gähwiler BH: *Trends Neuroscience* 11, 484-489 (1988)
- Green LA & Tischler AS: *PNAS* 73, 2424-2428 (1976)



- Honegger P: In "Cell Culture in the Neurosciences" (JE Bottenstein & G Sato, eds.)
Plenum Publ. New York, p. 223 (1985)
- Honegger P & Werffeli P: *Experientia* 44, 817 (1988)
- Jelinek R, Peterka M & Rychter Z: *Ind. J. Exp. Biol.* 23, 588-595 (1985)
- Kerlero de Rosbo N, Honegger P, Lassmann H & Matthieu JM: *J. Neurochem.* 55, 583
(1990)
- Khera KS & Whalen C: *Toxicol. in Vitro* 4, 257 (1988)
- Kopin IJ & Markey SP: *Ann. Rev. Neurosci* 11, 81 (1988)
- Kucera P & Burnand MB: *Experientia* 44, 827-833 (1988)
- Louis JC, Pettmann B, Courgeot J, Rumigny, Mandel & Sensenbrenner: *Exp. Brain Res.*
42, 63-72 (1981)
- Majocha RE et al. : *Brain Res.* 230, 235-252 (1981)
- Monnet-Tschudi F & Honegger P: *Develop. Neurosci.* 11, 30 (1989)
- Moscona AA: *Sci Amer.* 205, 142-162 (1961)
- O'Callaghan P: *Neurotox. Teratol* 10, 445 (1988)
- Olpe HR & Haas H: *Alternativen Tierexp.* 2, 5-14 (1985)
- Parent A, Poitras D & Dubé L: In "Handbook of Chemical Neuroanatomy Vol 2. Classical
Transmitters in the CNS part 1" (A Björklund & T Hökfelt, ed) Elsevier Sci. Publ. p.
409 (1984)
- Parsons JF, Rockley J & Richold: *Toxic in Vitro* 4, 609-611 (1990)
- Reinhardt CA: *Alternativen Tierexp.* 8, 5-14 (1988)
- Reinhardt CA, Bienz A, Roman-Diethelm T & Wyle-Gyurech GG: *In vitro differentiation
of embryonic chick brain cell: Development of a neuroteratology test system.* *Experientia*
47, A5/27 (1991)
- Schmid B: *Alternativen Tierexp.* 3, 59-65 (1985)
- Segal LM & Fedoroff S: *Toxic. in vitro* 2, 111-122 (1989)
- Seeds NW: *Proc. Nat. Acad. Sci U.S.A.* 68, 1858-1861 (1991)
- Snyder SH: *Nature* 347, 121 (1990)
- Sonderegger P, Lemkin PF, Lipkin LE & Nelson PG: *EMBO J.* 4, 1395 (1985)
- Sternberger LA: *Immunocytochemistry.* J. Wiley, New York. S. 90-200.
- Tottmar O, Söderbäck M & Asperg A: *ATLA* 16, 281 (1989)
- WHO, World Health Organisation: *Principles for the testing of drugs for teratogenicity.*
Techn. Rep. Ser., Nr. 364, 18 (1967)
- Walum E: *ATLA* 18, 153-179 (1990)
- Wyle GG & Reinhardt CA: *Toxic. in Vitro* (in press) (1991)