



## IN VITRO TESTS ZUR ERFASSUNG VON TERATOGENEN EFFEKTEN.

Beat P. Schmid.

Zyma SA, In Vitro Toxikologie (MIT), 1260 Nyon.

### ZUSAMMENFASSUNG.

Die zur Zeit gängigen und akzeptierten Tests in der Teratologie beinhalten die Verabreichung von Substanzen an trüchtige Nagetiere und Kaninchen. Diese Versuche sind tier- und zeitaufwendig. Seit den 80-iger Jahren sind Bemühungen im Gange, in vitro Alternativmethoden zu entwickeln und anzuwenden. In dieser relativ kurzen Zeitperiode ist eine grosse Anzahl von in vitro Techniken entwickelt, und zum Testen angewendet worden. Diese Techniken umfassen das Kultivieren von niedrigen Organismen, Zelllinien, primären Zellen, bis hin zur Kultur von ganzen Embryonen. Der folgende Artikel soll einen generellen Ueberblick über die bereits verwendeten Testsysteme geben und im speziellen über unsere Erfahrung mit der Kultur von Rattenembryonen berichten. Erste Resultate mit dieser Technik haben nämlich gezeigt, dass sich damit spezifische Missbildungen in vitro erfassen lassen, und eine sehr gute Korrelation zwischen den in vitro erhaltenen Resultaten und den in der Literatur zitierten in vivo Daten besteht.

### EINLEITUNG.

Um das Risiko eines eventuellen Einflusses von Chemikalien auf die Entwicklung von Embryonen besser abschätzen zu können, werden Medikamente und Umwelts-Chemikalien an trüchtige Säugetiere, meist Ratten und Kaninchen, verabreicht. In den meisten Ländern lehnt sich die Form der Durchführung eines solchen Versuches an die von der "Food and Drug Administration" in den Vereinigten Staaten im Jahre 1966 veröffentlichten Richtlinien. Die Testsubstanz wird an trüchtige Weibchen zweier Tierspezies während der Organbildung verabreicht. Die Tiere werden kurz vor Erreichen des Geburtstermines getötet und die Nachkommen auf äussere Missbildungen und Skelettveränderungen untersucht. Diese klassische Form der Untersuchungsmethode hat sich in den letzten 19 Jahren kaum verändert.

Weil die Entwicklung eines Embryos und Mutter/Foetus/Plazenta-Beziehungen enorm komplex sind, ist relativ wenig über Wirkungsmechanismen in der Teratologie bekannt. Es kann deshalb für die gegenwärtige Situation nicht erwartet werden, dass ein in vitro Teratologiesystem die herkömmlichen Tests ersetzt.



Es ist jedoch klar, dass in näherer Zukunft eine enorme Einsparung von Tieren gemacht werden könnte, wenn die konventionellen Tierversuche nur für eine reduzierte Zahl von Chemikalien Anwendung fänden; eine Auswahl der in vivo zu testenden Moleküle sollte durch alternative Techniken möglich sein.

Da, wie schon erwähnt, Mechanismen, die zu Missbildungen führen können, in den meisten Fällen unbekannt sind, gibt es in der Teratologie zur Zeit keine Basis für ein Konzept für ein alternatives in vitro System. Einige grundlegende Faktoren sollten dennoch berücksichtigt werden: der Test sollte praktikabel sein, relevante und reproduzierbare Daten liefern, und die Resultate sollten im Einklang mit Resultaten von in vivo Studien sein. Einige solche Systeme sollen hier beschrieben werden.

#### ALTERNATIVE IN VITRO METHODEN.

##### I. SYSTEME, DIE KEINE SAUGETIERE VERWENDEN.

Obschon Nicht-Säuger in der Evolution weit vom Säugetier entfernt sind, lässt sich der Ablauf gewisser Prozesse vergleichen, und diese Prozesse können ebenfalls von Chemikalien beeinflusst werden (1). Zur Zeit sind die folgenden Techniken zum Erfassen von teratogenen Effekten entwickelt worden.

a) **Drosophila Test** (1). Trächtige Drosophilafliegen geben ihre Eier in ein Medium ab, das mit der zu testenden Substanz vorbehandelt wurde. Die adult gewordenen Fliegen werden nach Durchlaufen von mehreren Entwicklungsstadien betäubt, und anschliessend unter dem Mikroskop auf äusserliche Veränderungen untersucht. Obschon einige Chemikalien spezifische Veränderungen induzieren konnten, ist die Aussagekraft dieses Testes mit zusätzlichen Substanzen zu erforschen.

Zellkulturen von Drosophilaembryonen sind gleichfalls zum Testen von Teratogenen und Nicht-Teratogenen eingesetzt worden (2), doch scheint es schwierig mit diesem Test spezifische Effekte von generell toxischen Effekten zu unterscheiden.

b) **Planaria** (3). Die zu testende Substanz wird in diesem Falle direkt ins Wasser zugegeben, und deren Einfluss auf das Regenerationsvermögen untersucht. Abwesende, unvollständige, oder abnormale Regeneration von Fragmenten oder intakten Tieren, werden als Indikation für toxische Effekte gedeutet. Auch bei diesem Test sind zusätzliche Untersuchungen mit Substanzen erforderlich.



c) **Hydra** (4). Dieser Test beinhaltet zwei wesentliche Komponenten. Einmal wird der adulte Polyp verschiedenen Konzentrationen einer Substanz ausgesetzt, und die kleinste Konzentration die einen degenerativen Effekt erzielt ermittelt (A). Ferner werden durch Auseinanderlösen eines adulten Polypen künstliche "Embryonen" geschaffen, die die Fähigkeit besitzen, sich von Neuem zu einem adulten Polypen zurückzubilden; hier wird die kleinste Konzentration einer Substanz ermittelt, die diesen Prozess beeinflusst (B). Das Verhältnis von A zu B gibt Auskunft über die toxische Gefährlichkeit einer Substanz. Um 30 Substanzen sind bis heute mit diesem System getestet worden, und die Korrelation zu in vivo Daten scheint gut, obschon auch widersprüchliche Resultate erzielt wurden (5).

d) **Amphibien und Fischembryos**. Diese Spezies sind ausführlich in Embryologiestudien untersucht worden, doch sind sie nur wenig zum Testen in der Teratologie verwendet worden. Kürzlich jedoch ist von Dumont und Mitarbeitern (6-8) ein Test mit Froschembryonen vorgestellt worden, der, nach Austesten mit ca. 40 Substanzen, eine gute Korrelation mit in vivo Daten von Säugetieren ergab. In diesem Test werden mittlere und späte Blastulastadien von Fröschen verschiedenen Konzentrationen einer Substanz während 4 Tagen ausgesetzt. Die Embryonen werden anschliessend auf Wachstum, Differenzierung, und Missbildungen untersucht.

e) **Hühnchen**. Ein Uebersichtsartikel der WHO (9) beschrieb das Hühnchenembryo für Teratologiestudien als ungeeignet. Zahlreiche Verbesserungen in den letzten Jahren haben jedoch zu Resultaten geführt, die ein Ueberdenken dieses Konzeptes nötig machen (10). Zur Zeit ein gewichtiger Nachteil ist, dass der Grossteil der getesteten Substanzen bekannte in vivo Teratogene sind, und somit nur wenig Information über den Einfluss von Nicht-Teratogenen auf die Entwicklung des Hühnerembryos erhältlich ist.

## II. ZELLKULTURTECHNIKEN.

a) **In vitro Kulturen mit etablierten Zelllinien**. Diese Systeme besitzen einen praktischen Vorteil gegenüber Primärkulturen, bei denen für jedes Experiment frisches Gewebe von Tieren gewonnen und verarbeitet werden muss. Einer dieser Zelllinien- Tests benutzt fibroblastenähnliche Zelltypen eines menschlichen Abortus als Indikatoren zur Erfassung von teratogenen Effekten (11). Zellen werden in Kultur gesetzt, während 72h behandelt und anschliessend ausgezählt.



Dieses System, wie auch zahlreiche andere einfache Zellkultursysteme dieses Typs, nehmen somit die Zellteilungsrate als Endpunkt; es ist deshalb fraglich, ob ein solches Testsystem spezifische teratogene Effekte von generell zytotoxischen Effekten unterscheiden kann.

#### **b) in vitro Kulturen mit frisch isolierten Zellen.**

**1. Loslösen von Tumorzellen (12).** Das Grundkonzept dieses Tests beruht auf der Ueberlegung, dass die Zellkontakte während der Embryonalentwicklung eine besonders wichtige Rolle spielen. Mausaszites-Tumorzellen werden in der Peritonealhöhle von Mäusen vermehrt und gleichzeitig radioaktiv markiert. Nach Zurückgewinnung dieser Zellen werden diese während 30 Minuten der zu testenden Substanz ausgesetzt. Anschliessend werden die Zellen auf speziell vorbehandelte Kulturschalen gegeben, und die sich anhaftenden Zellen ausgezählt. Als "teratogen-positiv" gilt eine Substanz, wenn sie in relativ niedrigen Konzentrationsbereichen 50% der Tumorzellanhaftung hemmt. Erste Vergleiche von Daten dieses in vitro Testes mit in vivo Daten ergaben eine relativ gute Uebereinstimmung (13); mit anderen Substanzklassen durchgeführte Experimente zeigten hingegen eine schlechte in vitro-in vivo Uebereinstimmung (14).

**2. "Micromass" Zellkulturen.** Das Prinzip von "Micromass"-Zellkulturen beruht auf einer lokalen Anreicherung von Zellpopulationen von speziell hoher Dichte. Diese Technik kann beliebig für sich teilende Zellpopulationen verwendet werden. Zu Testzwecken wurden hauptsächlich embryonale Extremitäten-, Lungen-, und Hirnzellen von Nagetieren und dem Hühnchen verwendet. Als Endpunkte können Zellzahl, Zahl der gebildeten Mikrokolonien, oder spezifische Syntheseleistungen der kultivierten Zellen dienen. Am ausführlichsten ist die "Micromass"-Kultur mit Extremitäten- und Mittelhirnzellen von 13-tägigen Rattenembryonen beschrieben und ausgetestet worden (15). Um das Problem der Unterscheidung von spezifischen teratogenen Effekten von unspezifischer Toxizität lösen zu können, musste dieser Assay jedoch erst kürzlich modifiziert werden (16).



### c) **In vitro Kulturen mit Organen von Embryonen.**

Zahlreiche embryonale und foetale Organe können in vitro gehalten werden, und somit direkt Einflüsse von Substanzen untersucht werden. Häufig wird zum Beispiel die Kultur von Mäuseextremitäten zu Mechanismusstudien eingesetzt (17). Bei dieser Technik werden Extremitäten von Embryos mit 40-Somiten abgetrennt und in definiertem Medium während 6 Tagen kultiviert. Chemische Beeinflussung von Knorpel- (18) und Knochenbildung (19) können so in vitro exakt überprüft werden. Verschiedene einzelne Substanzen wurden mit dieser Technik geprüft, doch eine eigentliche Validation unter einheitlichen Standardbedingungen ist bis anhin ausstehend.

### d) **Kultur von Embryonen.**

Verschiedene Techniken erlauben die Kultur von Säugetierembryonen während den frühen Stadien der Organbildung (19). In diesem System werden die Embryonen aus dem mütterlichen Gewebe herauspräpariert und in rotierenden Fläschchen während 2 Tagen kultiviert. Während dieser kurzen Zeitspanne entwickeln sich Organe wie Herz, Extremitäten, Gehör, usw.. Das System erlaubt als einziges in vitro System mehrere wichtige morphogenetische Prozesse gleichzeitig zu überwachen. Das Wachstum und der Differenzierungsgrad der in vitro kultivierten Embryonen sind zudem vergleichbar zu in vivo belassenen Embryonen (20, 21). Eine kürzlich in unserem Labor durchgeführte Arbeit mit 40 Substanzen zeigte, dass sich mit in vitro kultivierten Embryonen spezifische teratogene Effekte erfassen lassen und der Vergleich zwischen in vitro und in vivo Daten sehr gut ist (22). Zur weiteren Validierung des Systemes ist, gestützt durch den Schweizerischen Nationalfonds, das Testen von 30 zusätzlichen Substanzen lanciert worden. Im Gegensatz zur in vivo Methode kann hier jeder Embryo einzeln behandelt werden; für statistische Berechnungen kann somit gegenüber herkömmlichen Rattenteratologiestudien die Zahl der zu verwendenden Muttertiere um 60-90% reduziert werden. Die Behandlung von trächtigen Tieren mit chemischen Substanzen kann zudem vermieden werden.



### ABSCHLIESSENDE BEMERKUNGEN.

Wie aus der dargestellten Uebersicht hervorgeht, ist das Spektrum von vorhandenen alternativen *in vitro* Teratologiesystemen gross; die Möglichkeiten reichen von einfachsten Zellkulturen bis hin zu Kulturen von ganzen Embryonen. Obschon einige Systeme einer systematischen Validierung unterzogen wurden, bleibt der Grossteil der erwähnten Techniken diesem Prozedere noch zu unterziehen. Es ist jedoch vorauszusehen, dass die einzelnen Systeme je nach Problem- oder Fragestellung einzusetzen sind und kein universelles Testsystem zur Verfügung stehen wird.

### LITERATUR.

1. BEST, J.B. (1983). Transphyletic Animal Similarities and Predictive Toxicology. In: Old and New Questions in Physics, Cosmology, Philosophy and Theoretical Biology (ed. A. Van der Marwe), pp. 549-591. New York Plenum Press.
2. BOURNIAS-VARDIABASIS, N. & TEPLITZ, R.L. (1982). Use of drosophila embryo cell cultures as an *in vitro* teratogen assay. *Terat. Carc. and Mut.* 2, 333-341.
3. BEST, J.B., MORITA, M. & ABBOTTS, B. (1981). Acute toxic responses of the freshwater planarian, *Dugesia dorotocephala*, to chlordane. *Bull. of Env. Cont. and Toxicol.* 26, 502-507.
4. JOHNSON, E.M. (1980). A sub-vertebrate system for rapid determination of potential teratogenic hazards. *J. of Env. Path. and Toxicol.* 4, 153-156.
5. JOHNSON, E.M. & GABEL, B.E.G. (1983). An artificial "embryo" for detection of abnormal developmental biology. *Fund. and Appl. Toxicol.* 3, 243-249.
6. DUMONT, J.N. SCHULTZ, T.W. & NEWMAN, S.M. (1982). A frog embryo teratogenesis assay: *Xenopus* (FETAX)-a model for teratogen screening. *Teratology* 25, 37A.
7. DUMONT, J.N., SCHULTZ, T.W. & EPLER, R.G. (1983). The response of the FETAX model to mammalian teratogens. *Teratology* 27, 39A.
8. DUMONT, J.N., & EPLER, R.G. (1984). Validation studies of the FETAX teratogenesis assay (frog embryos). *Teratology* 29, 38A.
9. WHO (1967). Principles for the testing of drugs for teratogenicity. Technical Reports Series 364 Geneva, WHO.



10. JELINEK, R. (1982). Use of chick embryo in screening for embryotoxicity. *Terat. Carc. and Mut.* 2, 255-261.
11. PRATT, R.M., GROVE, R.I. & WILLIS, W.D. (1982). Prescreening for environmental teratogens using cultured mesenchymal cells from the human embryonic palate. *Terat. Carc. and Mut.* 2, 313-318.
12. BRAUN, A.G., EMERSON, D.J. & NICHINSON, B.B. (1979). Teratogenic drugs inhibit tumour cell attachment to lectin-coated surfaces. *Nature* 282, 507-509.
13. BRAUN, A.G., BRUCKNER, C.A., EMERSON, J.D. & NICHINSON, B.B. (1982). Quantitative correspondence between the in vivo and in vitro activity of teratogenic agents. *Proc. Nat. Acad. Sci., USA* 79, 2056-2060.
14. BRAUN, A.G. & HOROWITZ, P.B. (1983). Lectin-mediated attachment assay for teratogens: results with 32 pesticides. *J. of Toxicol and Env. Health* 11, 275-286.
15. FLINT, O.P. (1983). A micromass culture method for rat embryonic neural cells. *J. of Cell Sci.* 61, 247-262.
16. GIRLING, L. & FLINT, O.P. (1984). Inhibition of embryonic cell differentiation by teratogens in vitro: quantification using ELISA (enzyme linked immunoabsorbent assay). *Hum. Toxicol.* 3, 145-160.
17. KOCHHAR, D.M. (1982). Embryonic limb bud organ culture in assessment of teratogenicity of environmental agents. *Terat. Carc. and Mut.* 2, 303-312.
18. AYDELOTTE, M.B. & KOCHHAR, D.M. (1972). Development of mouse limb buds in organ culture: chondrogenesis in the presence of proline analog, L-azetidione-2-carboxylic acid. *Devel. Biol.* 28, 191-201.
19. NEUBERT, D., MERKER, H.J. & TAPKEN, S. (1974). Comparative studies on the prenatal development of mouse extrmities in vivo and in organ culture. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. of Pharmacol.* 286, 251-270.
20. SCHMID, B.P. (1985). Teratogenicity of new drugs with the postimplantation embryo culture system. In: *Concepts in Toxicology* (ed., F. Homburger) pp. 46-57. Karger Verlag, Basel, Switzerland.
21. NEW, D.A.T., COPPOLA, P.T. & COCKROFT, D.L. (1976). Comparison of growth in vitro and in vivo of post-implantation rat embryos. *J. of Reprod. and Fertil.* 36, 133-144.
22. SCHMID, B.P. (1985). Xenobiotic influences on embryonic differentiation, growth and morphology in vitro. *Xenobiotica* 15, 719-726.