

FISCHHEPATOZYTENASSAY ZUR VORHERSAGE DER BIOAKKUMULATION VON CHEMIKALIEN

HEPATOCTE ASSAY TO PREDICT THE BIOACCUMULATION OF CHEMICALS IN FISH

Hintergrund und Ziele

Experimentell bestimmte Bioakkumulationsfaktoren stellen ein wichtiges Element bei der Sicherheitsbewertung von Chemikalien dar (z. B. REACH Regulation). Jedoch sind Studien, die zur Bestimmung des Akkumulationspotenzials in Fisch standardmäßig angewendet werden, technisch anspruchsvoll und mit enormen Kosten verbunden. Zudem ist die Anzahl notwendiger Versuchstiere hoch.

Aus diesen Gründen unterstützen Regulationsbehörden und die Hersteller von Chemikalien die Entwicklung und Validierung alternativer Methoden. Über Computer-gestützte Modelle kann das Akkumulationspotenzial von Substanzen über deren Lipophilie abgeschätzt werden. Allerdings wird in diesen Modellen eine mögliche Biotransformation von Stoffen nicht berücksichtigt und somit die Akkumulation leicht metabolisierbarer Substanzen schnell überschätzt.

Fischhepatozyten bieten eine praktische und kostengünstige Möglichkeit, Biotransformationsraten *in vitro* zu messen. Nach Extrapolation auf den Gesamtorganismus können die Raten als Input-Parameter zur Verbesserung etablierter Bioakkumulationsmodelle beitragen. Ein standardisiertes Protokoll zur Durchführung von Hepatozytenassays muss jedoch entwickelt werden, um den Weg für ein formales Validierungsverfahren zu ebnen und langfristig eine behördliche Anerkennung der Methode zu erreichen. Das Fraunhofer IME nahm in diesem Zusammenhang an einem Laborvergleichstest teil, der die Validierung eines standardisierten Protokolls zur Durchführung von *in-vitro*-Studien mit Forellenhepatozyten zum Ziel hatte.

Projektbeschreibung

In drei unabhängigen Laboren wurden Depletionsversuche mit Forellenhepatozyten und sechs Referenzsubstanzen (Benzo[a]pyren, 4-Nonylphenol, Di-tert-butyl-phenol, Fenthion, Methoxychlor und O-Terphenyl) durchgeführt, um deren intrinsische Ausscheidungsrate zu bestimmen. Die Testsubstanzen sind durch relativ lipophile Eigenschaften ($\log K_{ow}$ zwischen 4 und 6) gekennzeichnet, weshalb ohne Biotransformation

eine Akkumulation in Fisch zu erwarten wäre.

Die Studien wurden mit cryopräservierten Hepatozyten durchgeführt, um jedes Labor mit demselben qualitativ hochwertigen biologischen Material zu versorgen. Alle chemischen Analysen wurden zentral von einem Labor durchgeführt und ein standardisiertes Verfahren zur Zellzählung angewendet, um den Einfluss externer Variabilitätsquellen auf die Ergebnisse des Assays soweit wie möglich zu minimieren.

Ergebnisse

Für die gemessene intrinsische Ausscheidungsrate wurde eine Intra- und Interlaborvariabilität von kleiner als 30 bzw. 60 % erzielt. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass auf Basis des standardisierten Protokolls und mit cryopräservierten Forellenhepatozyten eine hochzuverlässige Abschätzung der intrinsischen Ausscheidungsrate möglich ist. Die gewonnenen Daten tragen somit unterstützend und wegweisend zu dem noch ausstehenden formalen Validierungsverfahren bei, durch welches das Ziel der behördlichen Anerkennung des Hepatozytenassays erreicht werden soll.

Fazit

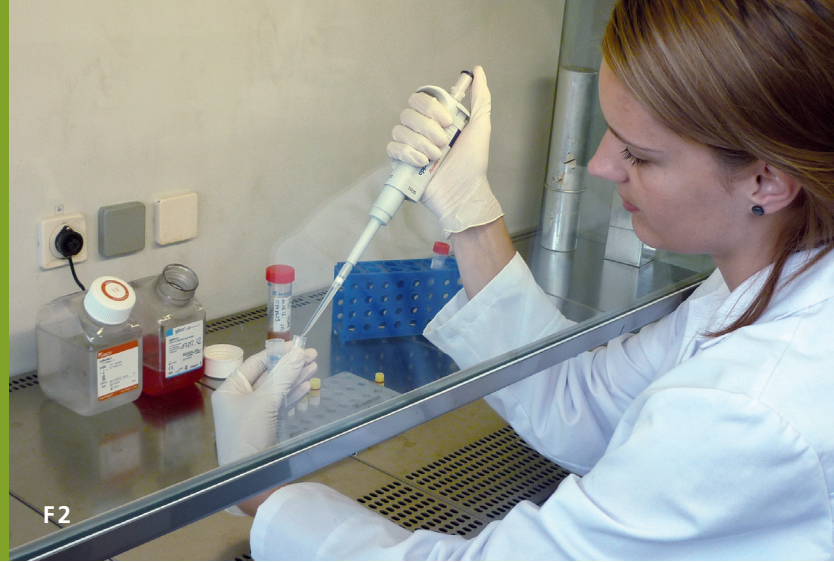
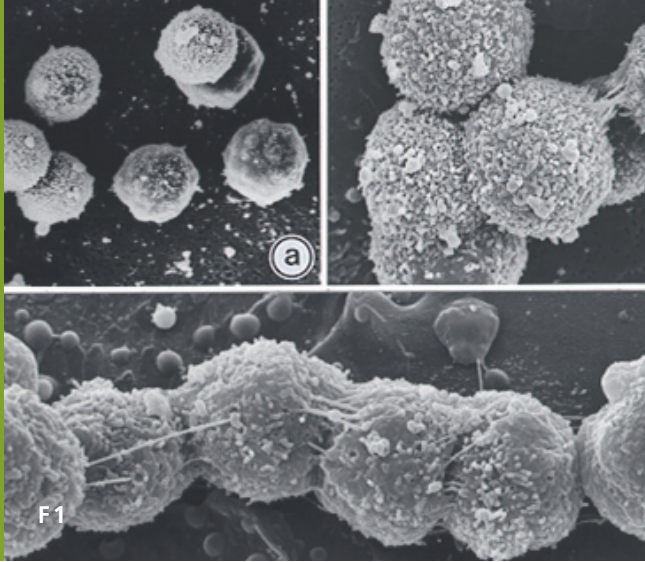
Mit dem Hepatozytenassay könnte in Zukunft eine alternative Testmethode zur Bestimmung des Bioakkumulationspotenzials von Chemikalien in Fischen zur Verfügung stehen, die helfen könnte, den Einsatz von Versuchstieren im Rahmen der Chemikalienbewertung zu reduzieren.

Auftraggeber / Sponsor

Die Studien wurden Fraunhofer-intern und durch das ILSI Health and Environmental Science Institute (HESI) finanziert.

Kooperationspartner / Cooperation partner

Prof. Dr. H. Segner, Universität Bern



Background and aims

Experimentally determined bioaccumulation factors in fish play an important role in the environmental safety assessment of chemicals (e.g. REACH). Standard testing methods are used to assess the accumulation of chemicals in fish, but such tests are expensive, time consuming and require the use of many animals.

The regulatory authorities and chemical industry therefore support the development and validation of alternative test methods.

Computer models based on lipophilicity can predict the potential of chemicals to bioaccumulate, but for substances that are readily biotransformed such models may substantially overestimate bioaccumulation.

In vitro methods based on isolated fish hepatocytes provide a convenient and cost-effective experimental system to measure biotransformation rates, which in turn can be scaled up to the whole-animal level and used to improve established bioaccumulation models.

Fraunhofer IME has joined a collaborative study to determine the intra-laboratory and inter-laboratory variability of the hepatocyte assay. The goal is to develop a standardized protocol for the hepatocyte assay that will be accepted by the regulatory authorities after additional formal validation.

Project description

Three separate laboratories used cryopreserved trout hepatocytes in substrate-depletion experiments to measure the intrinsic clearance of six reference compounds: benzo[a]pyrene, 4-nonylphenol, 2,6-di-tert-butylphenol, fenthion, methoxychlor and o-terphenyl. The selected compounds are relatively lipophilic ($\log K_{ow}$ of 4-6) and would therefore be expected to accumulate in fish, in the absence of biotransformation.

Several steps were taken to minimize potential sources of variability in the study. Cryopreserved hepatocytes were prepared from a single source and shipped in liquid nitrogen to provide each laboratory with identical, high-quality biological material.

Individual laboratory analysis procedures were carried out for each compound, and standardized cell-counting procedures were used.

Results

Intra-laboratory variability was < 30 % and inter-laboratory variability was < 60 %. These results suggest that cryopreserved trout hepatocytes shipped and tested using a standardized protocol can provide reliable estimates of *in vitro* intrinsic clearance, which is a key input parameter for bioaccumulation prediction models. As such, our data provide support and guidance for the formal validation of the method with the aim of achieving regulatory acceptance (e.g. as an OECD Test Guideline).

Conclusion

The *in vitro* hepatocyte assay offers a non-animal alternative for the prediction of potential bioaccumulation in fish, and will help to reduce the number of experimental animals required for fish bioaccumulation studies carried out as part of the environmental safety assessment.

Contact / Ansprechpartner

Ina Goeritz

Tel: +49 2972 302-441

ina.goeritz@ime.fraunhofer.de

Prof. Dr. Christian Schlechtriem

Tel: +49 2972 302-186

christian.slechtriem@ime.fraunhofer.de

Figure 1: Microscope images of carp hepatocytes.

Figure 2: Cryopreservation of isolated hepatocytes.