



## In-vitro-Biotransformationstests zur Vorhersage der Bioakkumulation von Chemikalien in Fisch

Ina Bischof ([ina.bischof@ime.fraunhofer.de](mailto:ina.bischof@ime.fraunhofer.de))<sup>1</sup>, Helmut Segner ([Helmut.Segner@itpa.unibe.ch](mailto:Helmut.Segner@itpa.unibe.ch))<sup>2</sup>,  
Christian Schlechtriem ([christian.schlechtriem@ime.fraunhofer.de](mailto:christian.schlechtriem@ime.fraunhofer.de))<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Fraunhofer-Institut für Molekularbiologie und Angewandte Ökologie IME, Schmallenberg

<sup>2</sup> Centre for Fish and Wildlife Health, Universität Bern, Schweiz

### Abstract

Für die Ermittlung des Bioakkumulationspotentials von Chemikalien in aquatischen Organismen im Rahmen der REACH-Regulation werden standardmäßig Biokonzentrationsstests mit Fischen nach OECD Richtlinie 305 durchgeführt. Dieser in-vivo-Test ist technisch recht aufwendig und erfordert in der Regel mehrwöchige Versuchszeiträume, sowie eine hohe Anzahl Versuchstiere. Die Integration von Daten aus in-vitro-Biotransformationstests mit Fischhepatozyten oder Leber-S9-Fractionen in bestehende Bioakkumulationsmodelle kann die Vorhersagegenauigkeit von alternativen in-silico-Methoden signifikant verbessern. Dies könnte in Zukunft dazu beitragen die Anzahl der geforderten in-vivo-Studien maßgeblich zu reduzieren. Derzeit wird intensiv an der Standardisierung (Entwicklung einer OECD Testrichtlinie) und Validierung der in-vitro-Testmethoden gearbeitet, um eine behördliche Anerkennung zu erreichen.

### Einleitung

Die Identifizierung von bioakkumulativen Eigenschaften ist weltweit ein zentrales Element in der behördlichen Risikobewertung von Chemikalien. Das maßgebliche Kriterium für die Bestimmung des aquatischen Bioakkumulationspotentials im Rahmen der europäischen Pflanzenschutzmittelregulation und Chemikaliengesetzgebung REACH ist der Biokonzentrationsfaktor (BCF), der die Aufnahme einer Substanz aus dem umgebenden Medium (Wasser) reflektiert. BCF-Werte werden standardmäßig anhand von Durchflussstudien mit Fischen nach OECD 305 (2012) bestimmt. Diese Biokonzentrationsstests sind sehr zeitaufwendig, teuer, und vor allem aus ethischer Sicht problematisch wegen der hohen Anzahl benötigter Versuchstiere (>100 Fische pro Test). Im Zuge der REACH-Regulation werden für mehr als 3000 Chemikalien Bioakkumulationsdaten zu liefern sein (Weisbrod et al., 2009). Die vollständige Generierung dieser Daten über den in-vivo-BCF-Test nach OECD 305 wäre mit enormen Kosten und einer theoretischen Versuchstierzahl von 300.000 verbunden. Die Entwicklung alternativer Methodengemäß dem 3R-Prinzip (reduce, refine, replace) ist demnach dringend erforderlich (Lombardo et al., 2014).

### Alternativmethoden zur Bestimmung des Bioakkumulationspotentials von Chemikalien in Fisch

Eine Alternative zum in-vivo-Fischttest stellen computer-gestützte (in silico) Methoden dar, bei denen die Vorhersage der Biokonzentration einer Chemikalie auf physikoche-

mischen Kenngrößen beruht. Es wurden zum Beispiel eine Reihe von quantitativen Struktur-Wirkungs-Beziehungs-Modellen (QSARs) entwickelt, die BCF-Werte auf der Basis des  $\log K_{ow}$  eines Stoffes vorhersagen (Nendza und Müller, 2007). Daneben gibt es Massenbilanz-Modelle, die BCF-Vorhersagen auf der Basis gemessener oder geschätzter Aufnahme- und Eliminationsprozesse treffen (Arnot und Gobas, 2006). Die größte Unsicherheit dieser Modelle besteht darin, dass eine mögliche Metabolisierung von Stoffen nicht oder nur unzureichend berücksichtigt wird. Die endogene Metabolisierung von Chemikalien im Organismus stellt jedoch einen wichtigen Eliminationsweg dar und hat somit entscheidenden Einfluss auf die Bioakkumulation (Nichols et al., 2007). Um die Vorhersagegenauigkeit bestehender Bioakkumulationsmodelle zu verbessern, werden demnach zuverlässige Methoden zur Ermittlung des metabolischen Potentials einer Chemikalie benötigt (Arnot, Mackay und Bonnell, 2008).

Die Leber ist das wichtigste Metabolisierungsorgan von Fischen. In-vitro-Präparationen der Leber, wie isolierte Fischhepatocyten oder subzelluläre Fraktionen (z.B. S9), sollten daher prinzipiell geeignet sein, Biotransformationsraten schnell und kostengünstig zu messen (Weisbrod et al., 2009). Die Integration von Biotransformationsraten aus in-vitro-Tests in bestehende in-silico-Modelle kann die Vorhersage des Bioakkumulationspotentials einer Chemikalie signifikant verbessern. So wurde in kürzlich veröffentlichten Studien gezeigt, dass modellierte BCF-Werte besser mit in-vivo-BCF-Werten übereinstimmen, wenn in-vitro-Metabolismusdaten mit einbezogen waren (Cowan-Ellsberry et al., 2008; Han et al., 2007; Nichols et al. 2013). Integrative Teststrategien wie diese, könnten in Zukunft dazu beitragen, die Anzahl der geforderten in-vivo-BCF-Tests maßgeblich zu reduzieren (Lombardo et al., 2014).

In Substratabbauversuchen mit primären Hepatocyten oder Leber-S9-Fractionen wird zunächst die intrinsische in-vitro-Metabolismusrate ( $C_{Lint, in vitro}$ ) eines Stoffes bestimmt. Über physiologische Modelle (Cowan-Ellsberry et al., 2008; Nichols, Schultz, und Fitzsimmons, 2006) können die Ergebnisse aus den in-vitro-Versuchen auf die Gesamtleber und anschließend auf den Gesamtfisch extrapoliert werden. Die so erhaltene in-vivo-Metabolismusrate (kM) kann schließlich in Massenbilanzmodellen zur Berechnung des BCF verwendet werden (Arnot und Gobas, 2004).

In den letzten Jahren wurde die Weiterentwicklung vorhandener Bioakkumulationsmodelle (Nichols et al., 2013), sowie die Optimierung von Protokollen für in-vitro-Biotransformationstests mit Fischhepatocyten und Leber-S9-Fractionen entscheidend vorangetrieben (Fay et al., 2014a; Han et al., 2007; Johanning et al., 2012). Ein zentraler Fortschritt hierbei war insbesondere die Einführung der Cryopreservationstechnik für primäre Fischhepatocyten (Mingoia et al., 2010). Durch diese Technologie können charakterisierte Pools an Hepatocyten weltweit verfügbar gemacht werden und so die Variabilität der metabolischen Kapazitäten unterschiedlicher Zellisolate erheblich reduziert werden.

Trotz des großen Potentials integrierter Teststrategien für die Bioakkumulationsbewertung und dem enormen Bedarf an in-vivo-Alternativen, haben in-vitro-Methoden in der regulatorischen Praxis bislang keine Bedeutung. Um die behördliche Anerkennung zu erreichen, bedarf es vor allem standardisierter Protokolle zur Testdurchführung und dem Nachweis der Reproduzierbarkeit des in-vitro-Testverfahrens. Darüber hinaus muss die derzeitige Datenlage noch erweitert werden, um die Qualität der BCF-Vorhersage abschließend beurteilen zu können (Nichols et al., 2009). Ein weiterer Schwachpunkt des in-vitro-Ansatzes ist, dass die derzeit verfügbaren in-vitro-Protokolle ausschließlich für Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) entwickelt wurden. Für die regulatorische Akzeptanz ist es jedoch essentiell, dass die in-vitro-Methoden nicht auf eine Fischart limitiert sind. Es ist daher nachzuweisen, dass die verfügbaren in-vitro-Verfahren auf andere OECD 305 Spezies wie den Karpfen (*Common carp*) übertragen werden können.

## Stand der Forschung und aktuelle Entwicklungen

Mit der Durchführung eines ersten Interlaborvergleichs im Jahr 2013 mit cryopreservierten Hepatocyten aus Forellen konnten standardisierte Protokolle entwickelt, sowie eine gute Inter- und Intralabor-Reproduzierbarkeit der in-vitro-Testergebnisse gezeigt werden (Fay et al., 2014b). Koordiniert durch das ILSI Health and Environmental Sciences Institute (HESI) findet aktuell ein weiterer Ringtest mit sechs internationalen Laboren aus Industrie und Forschung, darunter das Fraunhofer IME, statt. Neben dem Vergleich der metabolischen Kapazität der beiden am weitesten entwickelten in-vitro-Systeme, cryopreservierte Hepatocyten und Leber-S9-Fractionen aus Forelle, soll die Übertragbarkeit und Reproduzierbarkeit der erzielten Ergebnisse überprüft werden. Nach erfolgreicher Validierung der Testmethoden soll eine OECD Testrichtlinie zur Bestimmung der Biotransformationsrate von Chemikalien in in-vitro-Fischlebersystemen (OECD Projekt 3.13) entwickelt werden.

Von entscheidender Bedeutung für die behördliche Akzeptanz der in-vitro-Methoden wird es sein, ob sie für ein breites Spektrum an Chemikalien mit unterschiedlichen Eigenschaften anwendbar sind. Bisher wurde die Eignung der Testsysteme nur für relativ unproblematische Stoffe mit moderater Lipophilie ( $\log K_{ow}$  4-6) und geringer Volatilität gezeigt. Für stark volatile oder hochlipophile Substanzen müssen die

bestehenden in-vitro-Testsysteme möglicherweise modifiziert werden, um qualitativ hochwertige Ergebnisse zu erzielen. Die Verwendung biologischer Materialien unterschiedlicher Herkunft kann zu hoher Variabilität der in-vitro-Testergebnisse führen. Der Einsatz von Benchmark-Substanzen zur Charakterisierung der metabolischen Kapazität wurde daher vorgeschlagen (Weisbrod et al., 2009). Die Klärung der Frage, wie Benchmark-Daten zur Normierung der Transformationsraten von Stoffen mit unterschiedlichen Metabolisierungspfaden genutzt werden können, steht jedoch noch aus.

In einem weiteren Forschungsprojekt wird derzeit am Fraunhofer IME die Übertragbarkeit der zuvor beschriebenen in-vitro-Methoden auf Karpfen untersucht. Hierfür wurden Protokolle zur Isolierung primärer Hepatocyten aus Karpfenleber entwickelt und anschließend Vergleichsstudien mit zwei Modellsubstanzen zum Substratabbau in Karpfen und Forelle durchgeführt. Die Ergebnisse aus dieser Studie zeigen, dass der Hepatocyten-Test prinzipiell auch auf andere Fischarten übertragbar ist (Bischof et al., 2015).

## Schlussfolgerung und Ausblick

Die Forschungsarbeit der letzten Jahre hat die Entwicklung eines in-vitro-Fischtests zur Bestimmung metabolischer Transformationsraten von Chemikalien in der regulatorischen Bioakkumulationsbewertung stark vorangetrieben. Die verfügbaren in-vitro-Protokolle wurden standardisiert und erste Ergebnisse aus Ringversuchen lassen auf eine gute Reproduzierbarkeit der in-vitro-Testergebnisse schließen. In-vitro-Systeme als Teil integrierter Teststrategien haben demnach durchaus Potential, den in-vivo-Bioakkumulationstest mit Fischen zukünftig zu reduzieren oder längerfristig eventuell sogar zu ersetzen.

Für die spätere Akzeptanz der in Entwicklung befindlichen OECD Testrichtlinie muss jedoch noch bewiesen werden, dass sich die entwickelten und validierten in-vitro-Methoden für die Testung eines breiten Chemikalienspektrums eignen. Wenn dies gelingt, sollten die Voraussetzungen geschaffen sein, dass der in-vitro-Test durch die Behörden anerkannt und für die regulatorische Praxis zugelassen wird.

## Literatur

- Arnot, J. A. and F. A. P. C. Gobas (2004).** "A food web bioaccumulation model for organic chemicals in aquatic ecosystems." *Environ Toxicol Chem* 23(10): 2343-2355.
- Arnot, J. A. and F. A. P. C. Gobas (2006).** "A review of bioconcentration factor (BCF) and bioaccumulation factor (BAF) assessments for organic chemicals in aquatic organisms." *Environ Rev* 14(4): 257-297.
- Arnot, J. A., D. Mackay and M. Bonnell (2008).** "Estimating metabolic biotransformation rates in fish from laboratory data." *Environ Toxicol Chem* 27(2): 341-351
- Bischof, I., R. Böhm, M. Hüben, H. Jüring, C. Schlechtriem, H. Segner (2015).** "Comparative Assessment of Xenobiotic Clearance in Primary Hepatocytes from Cold- and Warm

Water Fish Species, Rainbow Trout and Common Carp." Poster presentation at SETAC Europe in Barcelona.

**Cowan-Ellsberry, C. E., S. D. Dyer, S. Erhardt, M. J. Bernhard, A. L. Roe, M. E. Dowty and A. V. Weisbrod (2008).** "Approach for extrapolating in vitro metabolism data to refine bioconcentration factor estimates." *Chemosphere* 70(10): 1804-1817.

**Fay, K. A., P. N. Fitzsimmons, A. D. Hoffman and J. W. Nichols (2014a).** "Optimizing the use of rainbow trout hepatocytes for bioaccumulation assessments with fish." *Xenobiotica* 44(4): 345-351.

**Fay, K. A., R. T. Mingoia, I. Goeritz, D. L. Nabb, A. D. Hoffman, B. D. Ferrell, H. M. Peterson, J. W. Nichols, H. Segner and X. Han (2014b).** "Intra- and interlaboratory reliability of a cryopreserved trout hepatocyte assay for the prediction of chemical bioaccumulation potential." *Environ Sci Technol* 48(14): 8170-8178.

**Han, X., D. L. Nabb, R. T. Mingoia and C. H. Yang (2007).** "Determination of xenobiotic intrinsic clearance in freshly isolated hepatocytes from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and rat and its application in bioaccumulation assessment." *Environ Sci Technol* 41(9): 3269-3276.

**Johanning, K., G. Hancock, B. Escher, A. Adekola, M. J. Bernhard, C. Cowan-Ellsberry, J. Domoradzki, S. Dyer, C. Eickhoff, M. Embry, S. Erhardt, P. Fitzsimmons, M. Halder, J. Hill, D. Holden, R. Johnson, S. Rutishauser, H. Segner, I. Schultz and J. Nichols (2012).** "Assessment of metabolic stability using the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver S9 fraction." *Curr Protoc Toxicol* Chapter 14: Unit 14 10 11-28.

**Lombardo, A., A. Roncaglioni, E. Benfentati, M. Nendza, H. Segner, A. Fernandez, R. Kuhne, A. Franco, E. Paune and G. Schuurmann (2014).** "Integrated testing strategy (ITS) for bioaccumulation assessment under REACH." *Environ Int* 69: 40-50.

**Mingoia, R. T., K. P. Glover, D. L. Nabb, C. H. Yang, S. I. Snajdr and X. Han (2010).** "Cryopreserved hepatocytes from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): a validation study to support their application in bioaccumulation assessment." *Environ Sci Technol* 44(8): 3052-3058.

**Nendza, M. and M. Müller, (2007).** "Einfluss von Lipophilie und Molekülgröße auf das Biokonzentrationspotential von Umweltchemikalien." *Mitteilungen der Fachgruppe Umweltchemie und Ökotoxikologie der Gesellschaft Deutscher Chemiker* 13 (3):68-71.

**Nichols, J., S. Erhardt, S. Dyer, M. James, M. Moore, K. Plotzke, H. Segner, I. Schultz, K. Thomas, L. Vasiluk and A. Weisbrod (2007).** "Use of in vitro absorption, distribution, metabolism, and excretion (ADME) data in bioaccumulation assessments for fish." *Hum Ecol Risk Assess* 13(6): 1164-1191.

**Nichols, J. W., M. Bonnell, S. D. Dimitrov, B. I. Escher, X. Han and N. I. Kramer (2009).** "Bioaccumulation assessment using predictive approaches."

*Integr Environ Assess Manage* 5(4): 577-597.

**Nichols, J. W., D. B. Huggett, J. A. Arnot, P. N. Fitzsimmons and C. E. Cowan-Ellsberry (2013).** "Toward improved models for predicting bioconcentration of well-metabolized compounds by rainbow trout using measured rates of in vitro intrinsic clearance." *Environ Toxicol Chem* 32(7): 1611-1622.

**Nichols, J. W., I. R. Schultz and P. N. Fitzsimmons (2006).** "In vitro-in vivo extrapolation of quantitative hepatic biotransformation data for fish. I. A review of methods, and strategies for incorporating intrinsic clearance estimates into chemical kinetic models." *Aquat Toxicol* 78(1): 74-90.

**OECD(2012).** Test No. 305: Bioaccumulation in Fish: Aqueous and Dietary Exposure, OECD Publishing.

**Weisbrod, A. V., J. Sahi, H. Segner, M. O. James, J. Nichols, I. Schultz, S. Erhardt, C. Cowan-Ellsberry, M. Bonnell and B. Hoeger (2009).** "The state of in vitro science for use in bioaccumulation assessments for fish." *Environ Toxicol Chem* 28(1): 86-96.

## Korrespondenzadresse

Ina Bischof  
Fraunhofer-Institut für Molekularbiologie  
und Angewandte Ökologie (Fraunhofer IME)  
Auf dem Aberg 1  
D-57392 Schmallenberg  
Tel.: +49(0)2972 302 441  
E-Mail: [ina.bischof@ime.fraunhofer.de](mailto:ina.bischof@ime.fraunhofer.de)