

6 ZUSAMMENFASSUNG

Zur toxikologischen Charakterisierung von Substanzen werden unter Vermeidung von Tierversuchen zunehmend in-vitro-Testsysteme verwendet. In dieser Arbeit wurde die Eignung unterschiedlicher in-vitro-Testsysteme für das Screening von chemischen Substanzen untersucht. Dabei wurden drei Zellsysteme verwendet, darunter zwei Zelllinien (Balb/c 3T3-Zellen und FMH- Δ 202-Zellen) und primäre Herzzellen von der Ratte. Die Toxizität wurde bei den Zelllinien mit dem Tetrazoliumsalz-Spaltungstest (MTT-Test) und dem Neutralrot -Test (NR-Test), und bei den primären Zellen mit dem MTT-Test und der morphologischen Beurteilung der Zellen überprüft. Die Prüfsubstanzen wurden in unterschiedlichen Konzentrationen mit den Zelllinien bis zu 96 Stunden und mit den primären Zellen bis zu 48 Stunden inkubiert. So konnten für alle Prüfsubstanzen mehrere Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen ermittelt werden.

Der Vergleich der verwendeten Zellsysteme und Vitalitätstests erfolgte mit den aus den Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen berechneten IC50-Werten. Ebenso wurde pro Inkubationszeit ein IC50-Wert berechnet, und anhand dieser Werte der Einfluß der Inkubationszeit auf die IC50-Werte beurteilt. Um herauszufinden, inwieweit die Verwendung verschiedener Zellsysteme oder Vitalitätstests die Rangfolge der IC50-Werte der einzelnen Prüfsubstanzen beeinflusst, wurden die Prüfsubstanzen aufgrund der Höhe ihrer IC50-Werte (nach 48 h Inkubationszeit) geordnet. Anschließend wurde beispielhaft die Zytotoxizitätsreihenfolge mit den IC25-, IC50- und IC75-Werten, die mit Hilfe des MTT-Tests und der morphologischen Beurteilung an den Herzzellen ermittelt wurde, dargestellt. Damit sollte festgestellt werden, ob durch die Verwendung der IC25- und IC75-Werte zusätzliche Information im Vergleich zur alleinigen Betrachtung der IC50-Werte gewonnen werden kann. Außerdem wurden die in dieser Arbeit erhobenen Daten mit IC50- und LD50-Werten aus der Literatur verglichen.

Bei einigen Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen fiel die Kurve von einer bestimmten Konzentration an steil ab. Bei anderen wurde ein sigmoider oder auch ein biphasischer Verlauf gefunden. Außerdem gab es Fälle, in denen die Substanzen keinen oder nur bei relativ hohen Konzentrationen einen Einfluß auf die Zellzahl hatten.

Beim Vergleich der Zellsysteme wurde nur bei neun von 16 Prüfsubstanzen ein signifikanter Unterschied zwischen den in den drei verschiedenen Zellsystemen erhobe-

nen Daten gefunden. Dabei war in sechs von neun Fällen die Zytotoxizität der Prüfsubstanzen bei den Herzzellen am stärksten ausgeprägt.

Die mit den verschiedenen Vitalitätstests ermittelten IC₅₀-Werte waren nur zum Teil signifikant unterschiedlich. Insgesamt betrachtet war aber bei den Herzzellen die morphologische Beurteilung und bei den Zelllinien der NR-Test im Vergleich zum MTT-Test empfindlicher.

Die Verlängerung der Inkubationszeit hatte in einem großen Teil der Versuche eine Senkung der IC₅₀-Werte zur Folge.

Die Rangfolge der Substanzen wurde mit den verschiedenen Zellsystemen unterschiedlich bewertet, wobei die größten Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien und den primären Zellen zu erkennen waren. Ebenso wurden beim Rangfolgenvergleich der Substanzen anhand ihrer IC₂₅-, IC₅₀- und IC₇₅-Werte, der nur bei den Herzzellen durchgeführt wurde, nicht bei allen Substanzen Übereinstimmungen gefunden.

Beim Vergleich von IC₅₀-Literaturwerten untereinander, und mit den in dieser Arbeit erhobenen Daten, wird deutlich, daß IC₅₀-Daten je nach Untersucher und Testprotokoll stark differieren, wodurch die Einschätzung der absoluten Toxizität von Substanzen mit Hilfe von in-vitro-Daten nicht möglich ist. Die Einschätzung der relativen Toxizität mit den in dieser Arbeit beschriebenen Tests ist ebenfalls nicht direkt auf in-vivo-Daten übertragbar. Abschließend ist festzuhalten, daß weiterführende Untersuchungen bezüglich der Charakterisierung der Zellen durchgeführt werden sollten. Außerdem müßte das Testprotokoll besser standardisiert werden, auch wenn in der Literatur beschriebene Bedingungen keine bessere Standardisierung erkennen lassen, als die in dieser Arbeit angewendete. Die geprüften in-vitro-Testsysteme wären dann möglicherweise als in-vitro-Screeningtest zu verwenden.

7 SUMMARY

Gerlinde Fettweis

Suitability of in vitro test systems for the toxicological characterisation of chemical substances

In vitro test systems are gaining importance for the toxicological characterisation of chemical substances, by this means animal experiments are being avoided. In this dissertation the suitability of different in vitro test systems for the toxicological screening of chemical substances was examined. Three cell systems, two different cell lines (Balb/c 3T3 cells and FMH- Δ 202-cells) and primary heart cells from the rat, were used. To obtain information on the cytotoxicity of the test substances the tetrazolium cleavage assay (MTT-assay) and the neutral red assay (NR-assay) were performed with the cell lines, and the MTT-assay and a morphological evaluation were performed with the primary cells. The test substances were incubated with the different cell systems in various concentrations. Incubation times up to 48 h were applied with the primary cells and up to 96 h with the cell lines. Several concentration response curves could be determined by this procedure.

IC₅₀ values were calculated from the concentration response curves and with these values the employed cell systems and viability assays were compared. To ascertain the influence of the incubation time, IC₅₀ values were calculated for each incubation period. The test substances were ranked according to the height of their IC₅₀ value (after 48 h incubation time). The influence of the different cell systems and viability assays on the ranking order of the substances was assessed. To examine, if additional information could be obtained by making use of IC₂₅ and IC₇₅ values in comparison to only employing IC₅₀ values the substances were ranked according to their IC₂₅, IC₅₀, and IC₇₅ values estimated with the help of the MTT assay and the morphological evaluation with the heart cells by example. Additionally, data obtained in this study were compared to IC₅₀ and LD₅₀ literature values.

The concentration response curves could be divided into groups with different characteristics. One group showed a rapid decrease at specific concentrations. The curves in

other groups took a sigmoidal or biphasal course. There also were groups, where substances had no influence on the number of cells, or an influence could be seen only at high substance concentrations.

Data from nine of the 16 test substances showed a significant difference between the three different cell systems. In six of the nine cases the cytotoxicity of the test substances was most pronounced with the heart cells.

Only in part there was a significant difference between the viability assays. All together the lowest IC₅₀ values were found by applying the morphological evaluation with the heart cells and the NR assay with the cell lines in comparison to applying the MTT assay.

For the most part, IC₅₀ values were lower, when longer incubation periods were employed.

The ranking order of the test substances varied, when assessed with the different cell systems. The largest difference was seen between the two cell lines and the primary cells. The comparison of the ranking orders of the test substances on the basis of their IC₂₅, IC₅₀, and IC₇₅ values was only done with the heart cells. For most of the substances they were not in accordance with one another. When comparing IC₅₀ literature values among themselves and with data from this study, it becomes clear, that IC₅₀ values vary depending on investigator and test protocol. This shows, that the estimation of absolute toxicity with the help of *in vitro* data is not possible. Estimation of relative toxicity with the tests, which are described in this study can also not be transferred directly to *in vivo* data.

In conclusion it can be noticed, that the cells have to be characterized further. Additionally, the test protocol should be better standardized, although conditions described in the literature show no better standardization than conditions employed in this study. The *in vitro* test systems investigated in this study could then perhaps be applied as *in vitro* screening tests.