Optimierte Dosierung von Chemikalien in Hochdurchsatz in vitro Testsystemen

Fabian C. Fischer (fabian.fischer@ufz.de), Beate I. Escher (beate.escher@ufz.de)

Zusammenfassung

Die Anwendung von Hochdurchsatz-Bioassays mit in vitro Säugetier-Zelllinien in der Risikobewertung von Chemikalien bedarf einer genauen Expositionskontrolle. Modelle zur Berechnung von frei gelösten Konzentrationen im Medium (Cfrei) von in vitro Bioassays erfordern zahlreiche physikalisch-chemische und systemische Parameter. Hier zeigen wir, wie proteinreiches Serum im Medium zur Kontrolle und Quantifizierung von Cfrei verwendet werden kann, um komplexere Modellierung zu vermeiden. Aufbauend auf experimentellen und modellierten Daten zu depletiven Prozessen im Testsystem präsentieren wir eine vereinfachte Massenbilanzgleichung basierend auf open-access System- und Chemikalienparametern. Die Methode kann experimentelle Artefakte im Zusammenhang mit Lösemitteln und Sättigungseffekten verhindern und ermöglicht die Herleitung von frei gelöste Effektkonzentrationen (ECfrei), die direkt mit frei gelösten Konzentrationen in Humanblut zur Risikobewertung von Umweltchemikalien verglichen werden können.

Hintergrund

Miniaturisierte in vitro Bioassays mit Humanzellen werden zunehmend in der Risikobewertung von Chemikalien angewandt und ihre Implementierung im Hochdurchsatzformat (HTS) kann den hohen Bedarf an Effektdaten für Pharmazeutika, Pestiziden, Körperpflegeprodukten und anderen Chamikalien decken. Die Anwendung von in vitro Bioassays in 384- und 1536-Well Mikrotestplattenformat ermöglicht die Effektcharakterisierung einer hohen Anzahl an Chemikalien und deren Mischungen. Die Messung von Exposition in miniaturisierten Testsystemen ist schwer durchzuführen, so dass in vitro Effekte maßgeblich in nominalen Konzentrationen angegeben sind (Cnom, Stoffmenge pro Volumeneinheit Medium) (Shukla et al. 2012). Die Dosierung von Chemikalien in in vitro Bioassays fasst sowohl den Transfer von Chemikalien in das in vitro Medium als auch die Verteilung der Chemikalien zwischen einzelnen Kompartimenten und die daraus resultierenden bioaktiven Konzentrationen zusammen. Cnom kann jedoch stark von der bioverfügbaren Konzentration im Medium (Cfrei) durch Bindung an Kolloide im Nährmedium (Fötales Kälberserum, FBS), Chemikalienaufnahme durch Zellen und Metabolisierung, Evaporation, und Sorption an Testgefäßen abweichen. Die Anwendung von nominalen Effektkonzentrationen und somit Vernachlässigung von Bioverfügbarkeit kann die wahre Potenz einer Chemikalie verschleiern. Für eine repräsentative Anwendung müssen konstante und quantifizierbare Expositionsbedingungen hergestellt werden, die direkt mit equivalenten Konzentrationen in vivo verglichen werden können. Eine Alternative zur komplexen experimentellen Bestimmung von Cfrei in HTS Bioassays ist die Anwendung von Massenbilanzmodellen, mit derer die Konzentration in einzelnen

Phasen des Testsystems berechnet wird (Armitage et al. 2014, Fischer et al. 2017). Die Basis dieser Modelle ist der Verteilungskoeffizient einer Chemikalie zwischen zwei Phasen 1 und 2 ($K_{1/2}$) nach der Formel

$$K_{1/2} = \frac{C_1}{C_2}$$
(1)

C1 und C2 sind die Konzentrationen der Testchemikalie in Phase 1 und 2. Massenbilanzmodelle setzen Gleichgewicht zwischen allen Phasen des Testsystems voraus und beschreiben die Verteilung der Testchemikalie über Phasenvolumina und entsprechenden Verteilungskoeffizienten. Zur Vereinfachung werden komplexe Phasen wie die Proteine und Lipide im Medium über Surrogate wie Bovines Serumalbumin (BSA) und Liposomen (lip) zusammengefasst und die Sorption von Chemikalien über die jeweiligen Verteilungskoeffizienten (KBSA/w und Klip/w) beschrieben (Fischer et al. 2017). Zuletzt wurden Massenbilanzmodelle in kinetischen Modellen weiter aufgelöst (Fischer et al. 2018b, Fisher et al. 2019), jedoch erschwert diese zunehmende Komplexität die Anwendung der Modelle in der alltäglichen Risikobewertung. In diesem Beitrag stellen wir zunächst die maßgeblichen Prozesse vor, die die Bioverfügbarkeit in in vitro Bioassays beeinflussen. Hinsichtlich ihrer Relevanz diskutieren wir, ob komplexere Modelle notwendig sind oder ob die Chemikalienverteilung und die Berechnung von Cfrei vereinfacht werden kann.

Chemikalienverteilung im Medium

Zunächst wurde mittels Massenbilanzmodellierung die Verteilung von Chemikalien zwischen Proteinen, Lipiden und Wasser im *in vitro* Medium simuliert. Protein- und Lipidgehalt von Basismedium und FBS wurden photometrisch mittels Lowry Assay und Sulfophosphovanillin-Reaktion bestimmt. Verteilungskoeffizienten an BSA und lip für 100 neutralen, kationische, anionische, und multiprotische Modellchemikalien wurden mit PP-LFER und COSMOtherm Sorptionsmodellen vorhergesagt (Bittermann et al. 2014, Linden et al. 2017, Ulrich et al. 2017). System- und Chemikalienparameter wurden in das Massenbilanzmodell eingefügt, um die Fraktion von Chemikalien sorbiert an Proteinen und Lipiden und frei gelöst im Wasser zu berechnen (Fischer et al. 2017).

In einem standardisierten und häufig verwendeten *in vitro* Medium mit 10% FBS-Gehalt ist ein Großteil der Chemikalien an Proteine und/oder Lipide gebunden (Abb. 1), wohingegen lediglich 14 Chemikalien >70% im Medium frei verfügbar sind. Die Verteilung der Chemikalien verdeutlicht die hohe Sorptionskapazität der Proteine und Lipide im Nährmedium. Die heterogene Sorption der Modellchemikalien an Proteine und Lipide zeigt die Abhängigkeit der Bioverfügbarkeit von den physikochemischen Eigenschaften der Testchemikalie, was beim Vergleichen von Potenzen verschiedener Chemikalien beachtet werden muss. Die hohe Sorptionskapazität des FBS lässt vermuten, dass das Medium depletive Prozesse wie Zellaufnahme, Metabolisierung, Evaporation, und Sorption an Testgefäße kompensieren kann und somit die Mediumkonzentration sowie C_{frei} stabilisiert wird (Fischer et al. 2019).



Abb 1. Verteilung von neutralen, kationischen, anionischen, und multiprotischen Modellchemikalien zwischen Proteinen, Lipiden und Wasser in einem häufig verwendeten *in vitro* Medium. Adaptiert mit Erlaubnis von "Fischer FC, Henneberger L, König M, Bittermann K, Linden L, Goss K-U, et al. 2017. Modeling exposure in the tox21 *in vitro* bioassays. Chemical Research in Toxicology 30:1197-1208." Copyright 2017 American Chemical Society.

Chemikalienaufnahme in Zellen

Das Massenbilanzmodell in Fischer et al. 2017 kann die Aufnahme von Chemikalien in die Zellen und resultierende zelluläre Konzentrationen (Czelle) berechnen. Protein- und Lipidgehalte in fünf Zelllinien wurden bestimmt und BSA und lip wurden als Surrogate für Zellproteine und -lipide verwendet (Fischer et al. 2017). Bei Applikation von 0.5% FBS in einer 1536-Well Mikrotestplatte mit 6 µL Mediumvolumen depletierten die Zellen das Medium bis zu ~12%, wohingegen bei 10% FBS in einer 96-Well Mikrotestplatte mit 120 µL Mediumvolumen die Zellen lediglich maximal 2.5% des Mediums depletierten. Bei Anwendung eines höheren FBS-Gehalts im Medium sinkt zwar die Bioverfügbarkeit und die Sensitivität des Assays, jedoch bleibt die Bioverfügbarkeit im Medium konstant und wird nicht über die Zeit durch Zellaufnahme depletiert. Mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie wurden die Aufnahmekinetiken von autofluoreszierenden Chemikalien in drei verschiedene Zelllinien gemessen (Fischer et al. 2018a). Equivalent zu den Modellergebnissen wurden geringere Czelle bei höherem FBS-Gehalt im Medium beobachtet (Abb 2.). Interessanterweise beschleunigte ein höherer FBS-Gehalt im Medium die Aufnahme der Testchemikalien, wie am Beispiel Benzo(a)pyren gezeigt. 95% Gleichgewicht stellte sich in Zellen bereits nach 40 Minuten bei 10% FBS-Gehalt ein, wohingegen bei 0.5% 3.9 Stunden gemessen wurden. Ein höherer FBS-Gehalt im Medium stabilisiert nicht nur die Konzentration im Medium und damit die Bioverfügbarkeit, sondern führt auch zu einer schnelleren Gleichgewichtseinstellung zwischen Medium und

Zellen, was wiederum die Anwendung von Gleichgewichtsmodellen zur Berechnung von C_{Zelle} ermöglicht.



Abb. 2. Aufnahmekinetiken von Benzo(a)pyren in einer in vitro Nierenzelllinie (HEK293) bei verschiedener Anwendung von FBS im Nährmedium. Adaptiert mit Erlaubnis von "Fischer FC, Abele C, Droge STJ, Henneberger L, König M, Schlichting R, et al. 2018a. Cellular uptake kinetics of neutral and charged chemicals in in vitro assays measured by fluorescence microscopy. Chemical Research in Toxicology 31:646-657." Copyright 2018 American Chemical Society.

Diffusion in Mikrotestplatten

Polystyrol ist das standardmäßig verwendete Polymer in Mikrotestplatten, die für HTS Bioassays verwendet werden. Um die Sorption von Testchemikalien an das Material von Mikrotestplatten quantitativ zu beschreiben, wurden Verteilungs- und Diffusionskoeffizienten von neutralen Chemikalien in dünnen Polystyrol-Scheiben gemessen (Fischer et al. 2018b). Die Koeffizienten wurden als Basis für die Entwicklung eines numerischen Modells verwendet, das die Diffusion von Testchemikalien in Mikrotestplatten verschiedener Formate (96-, 384-, 1536-Platten) zeitaufgelöst simuliert. Neben in vitro Bioassays mit FBS im Medium wurde die Relevanz von Plastiksorption im kolloidfreien wässrigem Medium von Zebrafisch-Embryo Bioassays (ZEB) simuliert. Das kinetische Modell zeigte, dass das Medium im ZEB durch Plastiksorption stark depletiert werden kann (≥ 80% für stark hydrophobe Chemikalien), wohingegen die Depletion von in vitro Medien nicht signifkant war (< 5%), da die Desorption von FBS-gebundenen Chemikalien den Verlust an Chemikalien durch Plattendiffusion kompensiert. Die Modellergebnisse im ZEB und in den in vitro Bioassays konnten experimentell validiert werden. Die Studie zeigte erneut, dass die Anwendung eines hohen FBS-Gehalts die Bioverfügbarkeit im in vitro Medium konstant hält. Da die Sorption von Chemikalien an Mikrotestplatten ein kinetischlimitierter Diffusionsprozess ist, ermöglichst die Applikation eines hohen FBS-Gehalts die Nutzung von Gleichgewichtsmodellen, die Sorption an das Plastik vernachlässigen.

Serum-basiertes passives Dosieren (SBPD)

Wir haben theoretisch und experimentell gezeigt, dass (1) die Proteine und Lipide des FBS im *in vitro* Medium eine hohe Sorptionkapazität aufweisen und als Chemikalienreservoir dienen können; (2) bei hohem FBS-Gehalt die Mediumdepletion durch Zellaufnahme verringert und die Aufnahmekinetik beschleunigt wird; und (3) die Relevanz von Plattensorption durch Resorption von FBS-gebundenen Chemikalien

Originalbeiträge

im Medium stark verringert wird. Die Ergebnisse unterstreichen, dass die Mediumproteine und -lipide zur Expositionskontrolle verwendet werden können um die Bioverfügbarkeit konstant zu halten. Hinsichtlich der Parallele zu Passiven Dosieren mit Polymeren (bspw. Fischer et al. 2016) sprechen wir von Serum-mediiertem Passiven Dosieren (serum-mediated passive dosing, SMPD). Obwohl die Bioverfügbarkeit von Chemikalien bei höherem FBS-Gehalt verringert wird, verringert sich ebenfalls die Depletion des Mediums (und Cfrei) durch die kinetisch-limitierten Prozesse der Zellaufnahme, der Plastiksorption, sowie Evaporation (Escher et al. 2019). Darauf aufbauend kann durch die Anwendung eines hohen FBS-Gehalts die Mediumkonzentration konstant gehalten werden, was durch experimentelle Messungen im Testsystem validiert werden konnte (Fischer et al. 2018a, Fischer et al. 2018b, Henneberger et al. 2019). Für ein spezifisches Testsystem muss ein Mindestgehalt an FBS eingestellt werden, um die kumulate Depletion des Mediums durch Zellaufnahme und Plastiksorption ≤5% zu halten (Abb. 3).



Abb 3. Serum-basiertes passives Dosieren in verschiedenen *in vitro* Testformaten und benötigter FBS-Gehalt, um den Verlust von Chemikalien insignifikant zu halten (≤ 5% Depletion über 24 Stunden). Adaptiert mit Erlaubnis von "Fischer FC, Henneberger L, Schlichting R, Escher BI. 2019. How to improve the dosing of chemicals in high-throughput in vitro mammalian cell assays. Chemical Research in Toxicology 32:1462-1468." Copyright 2019 American Chemical Society.

Wenn das Medium nicht signifikant depletiert wird, kann *C*_{frei} robust über den Medium-Wasser Verteilungskoeffizienten (*K*_{Medium/w}) hergeleitet werden. *K*_{Medium/w} ist ein integrativer Verteilungskoeffizient, der sich anhand der Volumenfraktionen *VF* an Proteinen (*VF*_{Protein} = 4.6%), Lipiden (*VF*_{Lipid} = 0.15%) und Wasser (*VF*_{Wasser} = 95.25%) im FBS, dem FBS-Gehalt im Medium (β_{FBS}), und den jeweiligen Verteilungskoeffizienten an Proteine und Lipide (*K*_{BSA/w} und *K*_{iip/w}) berechnen läßt:

$$K_{\text{Medium/w}} = 0.046 \cdot \beta_{\text{FBS}} \cdot K_{\text{BSA/w}} + 0.0015 \cdot \beta_{\text{FBS}} \cdot K_{\text{lip/w}} + 0.9525 \cdot \beta_{\text{FBS}} + (1 - \beta_{\text{FBS}}) \quad (2)$$

Cfrei kann dann anhand K_{Medium/w} und C_{nom} berechnet werden:

$$C_{\rm frei} = \frac{C_{\rm nom}}{K_{\rm Medium/w}}$$
(3)

Quantitative in vitro – in vivo Extrapolation (QIVIVE) und optimale Dosierung

Mit der vereinfachten Massenbilanzgleichung können nominale 50% Effektkonzentration (EC50) in frei gelöste Konzentrationen (EC_{50,frei}) umgerechnet werden, um diese direkt mit freien Konzentrationen in Humanblut (Cfrei,Blut) zu vergleichen. Das Verhältnis Cfrei,Blut / EC50,frei kann zur Risikobewertung von Chemikalien für Humanexposition verwendet werden, da für beide Systeme (in vitro und in vivo) die Bioverfügbarkeit berücksichtigt wurde (Abb. 4) (Henneberger et al. 2021). Des Weiteren kann die Applikation von SBPD die Dosierung in in vitro Bioassays verbessern. Um falsch-negative Testergebnisse zu verhindern, empfehlen wir Effektquantifizierung bis zur maximalen Sättigung der Testchemikalie im Medium. Mittels Kmedium/w kann die maximale Mediumkonzentration vorhergesagt werden, da diese auf Grund von Proteinen und Lipiden in Medium häufig um Größenordnungen höher ist als die maximale Wasserkonzentration der Chemikalie.



Unsicherheitsfaktoren und routinemäßige Anwendung

Das SBPD zur Vorhersage von C_{frei} ist limitiert auf Chemikalien mit geringer Evaporation. Da es sich bei Mikrotestplatten um offene Systeme handelt, kann Evaporation von flüchtigen Chemikalien das Medium stark depletieren (Escher et al. 2019). Geschlossene Testsysteme sind hierbei nötig, in denen wiederum SBPD die Sorption an Testgefäße und die Zellaufnahme kompensieren kann. Metabolisierung von Testchemikalien durch die *in vitro* Zellen kann das Medium stark depletieren und zu verringerten C_{Zelle} führen. Wir empfehlen daher die metabolische Kapazität von in vitro Zellen zu parameterisieren, wenn die metabolische Aktivität nicht der biologische Endpunkt des Bioassays darstellt (Fischer et al. 2020).

Der hier gezeigte Framework zur einfachen Berechnung von (E)*C_{frei}* kann routinemäßig in HTS Bioassay-Laboratorien verwendet werden, da die System- und Chemikalienparameter frei verfügbar in Online-Datenbanken zu finden oder mit openaccess Vorhersagemodellen berechnet werden können. Diese Datenbanken und Vorhersagemodelle werden in Zukunft auf komplexere Chemikalien und weitere Testsysteme erweitert. Wir zeigen, dass mit geringem Aufwand die Qualität und Interpretation von Effekten in *in vitro* Bioassays maßgeblich verbessert werden kann, was die Applikation von HTS Bioassays in der Risikobewertung von Chemikalien vereinfacht und in Zukunft den Weg ebnen kann, HTS Bioassays in der Regulatorik zu verankern.

Referenzen

- Armitage JM, Wania F, Arnot JA. 2014. Application of mass balance models and the chemical activity concept to facilitate the use of in vitro toxicity data for risk assessment. Environmental Science & Technology 48:9770-9779.
- Bittermann K, Spycher S, Endo S, Pohler L, Huniar U, Goss K-U, et al. 2014. Prediction of phospholipid-water partition coefficients of ionic organic chemicals using the mechanistic model cosmomic.

Journal of Physical Chemistry B 118:14833-14842.

Escher BI, Glauch L, König M, Mayer P, Schlichting R. 2019. Baseline toxicity and volatility cutoff in reporter gene assays used for high-throughput screening.

Chemical Research in Toxicology 32:1646-1655.

Fischer F, Böhm L, Höss S, Möhlenkamp C, Claus E, Düring R-A, et al. 2016. Passive dosing in chronic toxicity tests with the nematode Caenorhabditis elegans.

Environmental Science & Technology 50:9708-9716.

- Fischer FC, Henneberger L, König M, Bittermann K, Linden L, Goss K-U, et al. 2017. Modeling exposure in the tox21 in vitro bioassays.
- Chemical Research in Toxicology 30:1197-1208. Fischer FC, Abele C, Droge STJ, Henneberger L, König M, Schlichting R, et al. 2018a. Cellular uptake kinetics of neutral and charged chemicals in in vitro assays measured by fluorescence microscopy.

Chemical Research in Toxicology 31:646-657.

Fischer FC, Cirpka OA, Goss KU, Henneberger L, Escher BI. 2018b. Application of experimental polystyrene partition constants and diffusion coefficients to predict the sorption of neutral organic chemicals to multiwell plates in in vivo and in vitro bioassays.

Environmental Science & Technology 52:13511-13522.

- Fischer FC, Henneberger L, Schlichting R, Escher BI. 2019. How to improve the dosing of chemicals in high-throughput in vitro mammalian cell assays. Chemical Research in Toxicology 32:1462-1468.
- Fischer FC, Abele C, Henneberger L, Kluver N, Konig M, Muhlenbrink M, et al. 2020. Cellular metabolism in highthroughput in vitro reporter gene assays and implications for the quantitative in vitro-in vivo extrapolation.

Chemical Research in Toxicology 33:1770-1779.

- Fisher C, Siméon S, Jamei M, Gardner I, Bois YF. 2019. Vivd: Virtual in vitro distribution model for the mechanistic prediction of intracellular concentrations of chemicals in in vitro toxicity assays. Toxicology in Vitro 58:42-50.
- Henneberger L, Muhlenbrink M, Konig M, Schlichting R, Fischer FC, Escher BI. 2019. Quantification of freely dissolved effect concentrations in in vitro cell-based bioassays. Archives of Toxicology 93:2295-2305.
- Henneberger L, Huchthausen J, Wojtysiak N, Escher BI. 2021. Quantitative in vitro-to-in vivo extrapolation: Nominal versus freely dissolved concentration.

Chemical Research in Toxicology 34:1175-1182.

- Linden L, Goss KU, Endo S. 2017. 3D-QSAR predictions for alpha-cyclodextrin binding constants using quantum mechanically based descriptors. Chemosphere 169:693-699.
- Shukla SJ, Huang RL, Sommons SO, Tice RR, Witt KL, van Leer D, et al. 2012. Profiling environmental chemicals for activity in the andioxidant response element signaling pathway using a high-throughput screening approach. Environment Health Perspectives 120:1150-1156.
- Ulrich N, Endo S, Brown TN, Watanabe N, Bronner G, Abraham MH, et al. 2017. UFZ-LSER database v 3.2: https://www.ufz.de/index.php?en=31698&contentonly=1&m =0&lserd_data[mvc]=Public/start

Korrespondenzadresse des Erstautors

Dr. Fabian C. Fischer

National Institute for Environmental Studies (NIES) Health and Environmental Risk Division Onogawa 16-2, 305-8506 Tsukuba, Ibaraki, Japan