

Linz 2000, 3. Teil

9. Österreichischer internationaler Kongress über Ersatz- und Ergänzungsmethoden zu Tierversuchen in der biomedizinischen Forschung

6. Jahrestagung der MEGAT – Mitteleuropäische Gesellschaft für Alternativmethoden zu Tierversuchen

Universität Linz, Österreich, 24.-26. September 2000

In vitro Methoden zur Prüfung von Arzneimitteln auf photogenotoxische/photokanzerogene Eigenschaften

Lutz Müller^{1*}, Susanne Brendler-Schwaab², Peter Kasper³ und Birgit Kersten^{4*}

^{1,3,4} Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte, D-Bonn, ²Bayer-AG, Toxikologie, D-Wuppertal

Zusammenfassung

Phototoxische Effekte sind ein bekanntes Phänomen für einige UV- und/oder sichtbares Licht-absorbierende Substanzen. Die Verwendung derartiger Substanzen kann problematisch sein, wenn sie z.B. in Arzneimitteln oder Kosmetika Verwendung finden. In letzter Zeit hat sich die Aufmerksamkeit wissenschaftlicher Fachkreise auch der Tatsache zugewandt, dass toxische Intermediate, die durch Photoaktivierung generiert werden, auch Schäden am genetischen Material verursachen können. Mutierte Zellen können den Ausgangspunkt für Tumore bilden, im Falle photochemischer Aktivierung für Tumore auf der Haut. Die Methode der Wahl für eine Prüfung von Substanzen auf photokanzerogene Wirkungen ist derzeit eine Studie über ein Jahr an haarlosen Mäusen, bei denen die Zeit für das Auftreten von benignen Papillomen auf der Haut als Hinweis auf eine Induktion von Hauttumoren bestimmt wird. Die Kontrollgruppen werden in solchen Studien UV-Dosen ausgesetzt, die bereits nach 20-30 Wochen bei 50% der Tiere zu Papillomen führen. Photokanzerogene Substanzen können eine Verkürzung der Latenzzeit zum Auftreten der Papillome bewirken. Für die Vorhersage photokanzerogener Wirkungen sollten sich auch *in vitro* Tests zur Photogenotoxizität eignen, ähnlich wie Genotoxizitätstests zur Vorhersage kanzerogener Wirkungen eingesetzt werden. In den letzten Jahren sind Evaluierungsuntersuchungen insbesondere für den

Photo-Mikrokerntest und den Photo-Comet Assay an einer Zelllinie des Chinesischen Hamsters (V79-Zellen) durchgeführt wurden. Für beide *in vitro* Systeme wurden Standardmethodenbeschreibungen erarbeitet, und eine Reihe von potentiell photogenotoxischen Testsubstanzen wurde untersucht. Die Daten lassen eine gute Sensitivität der Systeme erkennen, allerdings müssen die Testmethoden in weiteren kollaborativen Studien validiert werden. In den Entwürfen für Testrichtlinien zur Beurteilung der Photosicherheit von Arzneimitteln, die derzeit in der EU und in den USA erarbeitet werden, sollen diese *in vitro* Systeme einen Platz in der Testbatterie erhalten.

Summary: *In vitro* methods for phototoxicity and photocarcinogenicity testing of drugs

Phototoxicity is an acknowledged property of some UV and/or visible light absorbing substances some of which are used as pharmaceuticals or in cosmetic preparations. In recent years attention has been called upon the fact that toxic intermediates that are generated upon photoactivation of a substance can also lead to DNA damage. Such damage may lead to mutated/initiated skin cells which in turn can contribute to an elevated skin cancer risk. The method of choice to test for photo-related skin carcinogenesis is a 1-year study in genetically hairless mice in which the formation of skin papilloma and their latency time are assessed. Here, *in vitro* test approaches to test for photogenotoxicity can be used in a tiered assessment approach asking the use of *in vitro* genotoxicity tests for prediction of rodent/human carcinogenicity. In the past few

Gegenwärtige Adressen: ¹ Novartis Pharma AG, CH-Basel

^{4*} Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik, D-Berlin

years some effort has been put into the evaluation for such systems, in particular standard test protocols have been generated for the *in vitro* photo-micronucleus test and the *in vitro* photo-comet assay with Chinese hamster V79 cells. The data that have been produced so far show promising results regarding the implementation of these systems in a tiered

approach for photocarcinogenicity assessment of UV- and/or visible light absorbing substances but the systems will have to be validated in further collaborative studies.

Keywords: 3R, replacement, photogenotoxicity, *in vitro* methods, photocarcinogenicity

1 Einleitung

Erfahrungen aus der Anwendung am Menschen haben gezeigt, dass Arzneistoffe phototoxische Eigenschaften haben können. Im Zuge der Aktivierung von chemischen Stoffen durch UV oder sichtbares Licht können reaktive Produkte entstehen, die mit zellulären Makromolekülen reagieren können. Diese reaktiven Zwischenprodukte (z.B. aktive Sauerstoffspezies/Radikale) können auch mit der DNA reagieren und somit zu DNA-Schäden führen. Diese DNA-Schäden können in Mutationen umgesetzt werden, und solchermassen initiierte Zellen können den Ausgangspunkt für Tumore bilden, im Falle photochemischer Aktivierung für Tumore auf der Haut. Für die Kombination von Psoralenen mit UVA-Strahlung als therapeutisches Prinzip zur Behandlung der Psoriasis ist eine humantumorogene Wirkung inzwischen belegt (Stern and Laird, 1994; Stern et al., 1997). Für eine Reihe weiterer Arzneistoffe, wie z.B. die antibiotisch wirksamen Fluorochinolone sind aus Tierversuchen in Kombination mit UV-Strahlen tumorogene Wirkungen für die Haut nachgewiesen worden (Klecek et al., 1997). Wenn DNA-Schäden durch photoaktivierte Verbindungen als verantwortlich für die Entstehung von Hauttumoren angesehen werden können, so können Testsysteme zur Photogenotoxizität, ähnlich wie traditionelle Testsysteme in der genetischen Toxikologie, als Screening-Systeme zur Vorhersage photokanzerogener Wirkungen eingesetzt werden. Während die direkten Wirkungen von UV-Strahlen auf die DNA sehr gut beschrieben sind, liegen über das Zusammenwirken von UV-Strahlung oder sichtbarem Licht mit chemischen Substanzen auf das genetische Material von Zellen nur lückenhafte Kenntnisse vor.

2 Tierversuche zur Photokanzerogenität

Tierversuche zum Nachweis photokanzerogener Wirkungen werden in der Regel an genetisch haarlosen Mäusen (Stamm:

CrI:SKH1-*hr*BR) durchgeführt. Die Studien sind für die Tiere sehr belastend, da die Experimente im Regelfall in Kombination mit tumorigenen UV-Dosen durchgeführt werden. Nach Ablauf der Versuchsdauer von etwa 52 Wochen tragen die Mehrzahl der Tiere mehrere Papillome (Forbes, 1996). Die Prävalenz von Tieren mit mindestens 1mm grossen Papillomen liegt in der hochbestrahlten UV-Dosisgruppe nach etwa 20 Wochen bei 50%. Als Endpunkt der Untersuchung wird die Latenzzeit zum Auftreten der Hauttumore in den Tieren, die mit UV plus Substanz dermal oder oral behandelt werden, bestimmt und mit nur UV-bestrahlten Tieren verglichen. Der experimentelle Ansatz wird aus vielen Gründen kritisiert. Die deutliche tumorigene Wirkung der eingesetzten UV-Dosen, das Fehlen von histologischen Untersuchungen und die Heranziehung benignen Papillome für die Beurteilung eines kanzerogenen Potentials sind einige Gründe für diese Kritik. Die vorhandenen Literaturdaten sowie die für die Arzneimittellizenzierung eingereichten Tests wurden vor kurzem evaluiert (Jacobs et al., 1999). Die für diese Evaluierung herangezogenen experimentellen Daten zur Photokanzerogenität entstammen aus sehr unterschiedlichen Versuchsansätzen mit jeweils stark voneinander abweichenden Bestrahlungsbedingungen. Vehikeffekte, Substanzeffekte und pharmakologische Effekte, wie z.B. Immunsuppression, wurden nicht ausreichend differenziert. Die Aussagen zum Nutzen von Photokanzerogenitätsexperimenten am Tier bleiben daher umstritten.

3 Regulatorischer Hintergrund zur Prüfung auf Photogenotoxizität und Photokanzerogenität

Auf der regulatorischen Ebene sind schon frühzeitig für Kosmetika Empfehlungen hinsichtlich der Notwendigkeit von *in vitro* Tests zur Genotoxizitätstests unter Licht- und Substanzeinwirkung erarbeitet worden (Loprieno, 1991). Für Pharmaka findet sich in der ICH (*International Con-*

ference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use) Guidance "Need for Carcinogenicity Studies" unter anderem eine Aussage zur Notwendigkeit für Kanzerogenitätsstudien mit dermalen Anwendung, wenn Anhaltspunkte für ein photokanzerogenes Potential vorliegen (ICH S1A, www.ifpma.org/ich1.html). Im Zusammenhang mit der gestiegenen Aufmerksamkeit regulatorischer Stellen gegenüber der Photobiologie und der Interaktion von Arzneimitteln mit Licht verschiedener Wellenlängen erarbeiten zur Zeit die US-amerikanischen und die EU-Behörden Dokumente, die als Richtlinien zur Prüfung und Risikobeurteilung auf diesem Gebiet weiterentwickelt werden sollen. Die FDA hat im Januar 2000 einen Entwurf für eine "Guidance on Photosafety Testing" veröffentlicht (www.fda.gov/cder/guidance/index/htm), deren Zielrichtung Prüfungen zur Photosensitivität und zur Photokanzerogenität beinhaltet. *In vitro* Modelle zur Phototoxizität und Photogenotoxizität werden in diesem Entwurf als zusätzliche Informationsquelle für eine Beurteilung herangezogen. Photokanzerogenitätsprüfungen bzw. -Beurteilungen werden auch für nicht-photosensitivierende Substanzen gefordert. Im EU-Bereich hat das CPMP (*Committee on Proprietary Medicinal Products*) mit Datum vom 25.5.2000 ein „Concept Paper on the Development of a CPMP Note for Guidance on Photosafety Testing“ veröffentlicht (www.eudra.org/humandocs/PDFs/SWP/105300en.pdf). In diesem Dokument werden *in vitro* Alternativen ausdrücklich erwähnt und ihre Evaluierung für die Aufnahme in eine solche Guidance angekündigt.

4 *In vitro* Tests zum Nachweis von photogenotoxischen Wirkungen

Als Alternative für Tierversuche zur Photokanzerogenität sind *in vitro* Methoden zum Nachweis von Schäden an der DNA nach photochemischer Aktivierung entwickelt worden und befinden sich im Status der

Evaluierung und Validierung. Grundlegende Publikationen liegen vor: für den bakteriellen Rückmutationstest (Dean et al., 1991; Chetelat et al., 1993a), für Mutationsstests an Hefen (Averbeck und Moustacchi, 1979), für Chromosomenaberrationsuntersuchungen an Säugerzellen (Chetelat et al., 1993b; Gocke et al., 1998), für Mikrokernstests an Säugerzellen (Kersten et al., 1999; Snyder and Cooper 1999) und für den Nachweis von DNA-Einzelstrangbrüchen an Säugerzellen (Bulera et al., 1999; Chetelat et al., 1996), jeweils in Kombination von UV oder sichtbarem Licht mit Testsubstanzen. Eine internationale Arbeitsgruppe hat 1999 die vorhandenen Daten evaluiert und detaillierte Testempfehlungen zur *in vitro* Prüfung auf photogenotoxische Eigenschaften erarbeitet (Gocke et al., 2000).

Es ist zu erwarten, dass Verbindungen mit photochemischer Reaktivität vorwiegend Chromosomenschäden induzieren (Gocke et al., 2000). Dies ist zum Teil darin begründet, dass vielfach reaktive Sauerstoffspezies nach photochemischer Aktivierung entstehen, die in Systemen zum Nachweis von DNA-Strangbrüchen und Chromosomenbrüchen sensitiv erkannt werden können. Systematische Untersuchungen zum photogenotoxischen Potential von Substanzen aus den verschiedensten chemischen Gruppen in Säugerzellen waren bisher nicht genügend verfügbar. In einer Forschungsoperation zwischen dem Bundesinstitut für Arzneimittel (D-Bonn) und der Fa. Bayer AG (D-Wuppertal) ist deshalb dieser Aspekt genauer untersucht worden. In diesem Vorhaben haben sich der Mikrokerntest und die Einzelzellgelelektrophorese zum Nachweis von DNA-Einzelstrangbrüchen (sogenannter Comet-Test), durchgeführt an einer Zelllinie des chinesischen Hamsters (V79-Zellen), als schnelle und geeignete Methoden zum Nachweis photochemisch induzierter DNA-Schäden herausgestellt. In beiden Tests wurden inzwischen mehr als zwanzig potentiell photoreaktive Stoffe untersucht (Kersten et al., 1999; Brendler-Schwaab et al., unveröffentlicht). Im weiteren wurde der Einfluss methodischer Parameter (UV-Dosis, Bestrahlungsspektrum, Behandlungsdauer, zeitlicher Abstand zur UV-Bestrahlung, etc.) untersucht. Die Resultate beider Tests stimmen mit den Erwartungen aus der Kenntnis der photochemischen Aktivierung gut überein. In Tabelle 1 sind die publizierten Daten aus dem Photo-Mikrokerntest aufgeführt. Nach bisherigen Er-

kenntnissen sind Stoffe ohne phototoxische Eigenschaften in entsprechenden *in vitro* und *in vivo* Systemen auch nicht photogenotoxisch; umgekehrt aber zeigen phototoxische Stoffe nicht zwangsläufig auch photogenotoxische Eigenschaften. Für die beiden Testsysteme wurden Standardmethodenbeschreibungen erarbeitet, auf deren Basis umfangreichere Ringversuche geplant sind. In einer Fortführung dieser Forschungsaktivität mit einer größeren Anzahl an Laboren sollen die erstellten Standardprotokolle mit mehreren phototoxischen und nicht-phototoxischen Stoffen weiter evaluiert werden.

5 Entscheidungsbaum zur Prüfung auf potentielle photokanzerogene Wirkungen

Grundsätzlich sollten Kombinationswirkungen von Licht (UV und sichtbares Licht)

und chemischen Substanzen gut in *in vitro* Systemen analysierbar sein. Im Gegensatz zu vielen anderen Prozessen, die zu Toxizität führen, scheinen bei photochemischen Reaktionen enzymatische Metabolisierungsumsetzungen keine bedeutende Rolle zu spielen. Daher können Zelllinien zur Prüfung phototoxischer und photogenotoxischer Effekte eingesetzt werden, die ansonsten aufgrund unvollständiger und *in vivo*-ferner Metabolisierungskapazitäten nur begrenzte Aussagen liefern. In Kombination mit dem *in vitro* 3T3 NRU Test zur Phototoxizität, für den bereits eine EU-Methodenbeschreibung vorliegt (Anon, 2000), sollten diese Tests Tiermodelle zur Photokanzerogenität weitgehend ersetzen bzw. überflüssig machen. Tierversuche zur Photogenotoxizität oder Photokanzerogenität wären dann speziellen Situationen vorbehalten, z.B. wenn sich Anhaltspunkte für artifizielle,

Tab. 1: Ergebnisse des Photo-Mikrokerntests an V79-Zellen mit verschiedenen potentiell phototoxischen Substanzen

Testsubstanz	Zelltyp	Resultat	Zitat
Furocoumarine			
8-Methoxypsoralen	V79	+	Kersten et al., 1999
Anthrachinone			
Hypericin	V79	+ schwach	Kersten et al., 1999
Emodin	V79	-	Kersten et al., 1999
Fluorochinolone			
Bay Y 3118	V79	+	Kersten et al., 1999
Ciprofloxacin	V79	+	Snyder and Cooper, 1999
Clinafloxacin	V79	+	Snyder and Cooper, 1999
Enoxacin	V79	+ schwach	Snyder and Cooper, 1999
Grepafloxacin	V79	+	Kersten et al., 1999
Lomefloxacin	V79	+	Kersten et al., 1999
Nalidixinsäure	V79	+	Snyder and Cooper, 1999
Norfloxacin	V79	+ schwach	Snyder and Cooper, 1999
Sparfloxacin	V79	+	Snyder and Cooper, 1999
Ofloxacin	V79	+ schwach	Snyder and Cooper, 1999
Trovafoxacin	V79	+ schwach	Snyder and Cooper, 1999
Phenothiazine			
2-Chlorphenotiazin	V79	+	Kersten et al., 1999
Chlorpromazin	V79	+	Kersten et al., 1999
Triflupromazin	V79	-	Kersten et al., 1999
Tetrazykline			
Doxzyklin	V79	-	Kersten et al., 1999
Oxytetrazyklin	V79	-	Kersten et al., 1999
Andere			
Griseofulvin	V79	-	Kersten et al., 1999
Metronidazol	V70	-	Kersten et al., 1999

+: positives Testresultat, -: negatives Testresultat

biologisch nicht-relevante *in vitro* Befunde ergeben, oder wenn Verdachtsmomente für eine photokanzerogene Wirkung aus anderen Bereichen, wie z.B. aus Erkenntnissen über immunsuppressive Wirkungen, vorliegen. Abbildung 1 zeigt die derzeitigen Vorstellungen über einen Entscheidungsablauf zur Prüfung von Pharmaka hinsichtlich eines photokanzerogenen Potentials.

Literatur

Anon, Test guideline B-41 "Phototoxicity - in vitro 3T3 NRU phototoxicity test"

of Annex V of the EU Directive 86/906/EEC for classification and labelling of hazardous chemicals, June 8 2000. *Official Journal of the European Communities*, L136, 98-107.

Averbeck, D. and Moustacchi, E. (1979). Genetic effects of 3-carboxymethylpsoralen, angelicin, psoralen and 8-methoxypsoralen plus 365 nm irradiation in *S. cerevisiae*. *Mutat. Res.* 68, 133-148.

Bulera, S. J., Theiss, J. C., Festerling, T. A. et al. (1999). In vitro photogenotoxic activity of ciprofloxacin: A paradigm predicting photocarcinogenicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 156, 222-30.

Chételat, A. A., Albertini, S., Dresch, J. H. et al. (1993a). Photomutagenesis test development: I. 8-Methoxypsoralen, chlorpromazine and sunscreen compounds in bacterial and yeast assays. *Mutat. Res.* 292, 241-250.

Chételat, A. A., Dresch, J. H. and Gocke, E. (1993b). Photomutagenesis test development: II. 8-Methoxypsoralen, chlorpromazine and sunscreen compounds in chromosomal aberration assays using CHO cells. *Mutat. Res.* 292, 251-258.

Chételat, A. A., Albertini, S. and Gocke, E. (1996). The photomutagenicity of fluoroquinolones in tests for gene mutation, chromosomal aberration, gene conversion and DNA breakage (Comet assay). *Mutagenesis* 11, 497-504.

CPMP Concept Paper on the Development of a CPMP Note for Guidance on Photosafety Testing. May 25, 2000. www.eudra.org/humandocs/PDFs/SWP/105300en.pdf

Dean, S. W., Lane, M., Dunmore, R. H. et al. (1991). Development of assays for the detection of photomutagenicity of chemicals during exposure to UV light. I. Assay development. *Mutagenesis* 6, 335-341.

FDA Draft Guidance on Photosafety Testing. January 2000. www.fda.gov/cder/guidance/index/htm

Forbes, P. D. (1996). Relevance of animal models of photocarcinogenesis to humans. *Photochem. Photobiol.* 63, 357-362.

Gocke, E., Albertini, S., Chételat, A. A. et al. (1998). The photomutagenicity of fluoroquinolones and other drugs. *Toxicol. Lett.* 102-103, 375-381.

Gocke, E., Müller, L., Guzzie, P. J. et al. (2000). Considerations on photochemical genotoxicity: Report of the IWGTP working group. *Environ. Molec. Mutagen.* 35, 173-184.

Jacobs, A., Avalos, J., Brown, P. et al. (1999). Does Photosensitivity predict photocarcinogenicity? *Int. J. Toxicol.* 18, 191-198.

Kersten, B., Zhang, J., Brendler-Schwaab, S. Y. et al. (1999). The application of the in vitro micronucleus test in Chinese hamster V79 cells to detect drug-induced photogenotoxicity. *Mutat. Res.* 445, 55-71.

Klecak, G., Urbach, F. and Urwyler, H. (1997). Fluoroquinolone antibacterials

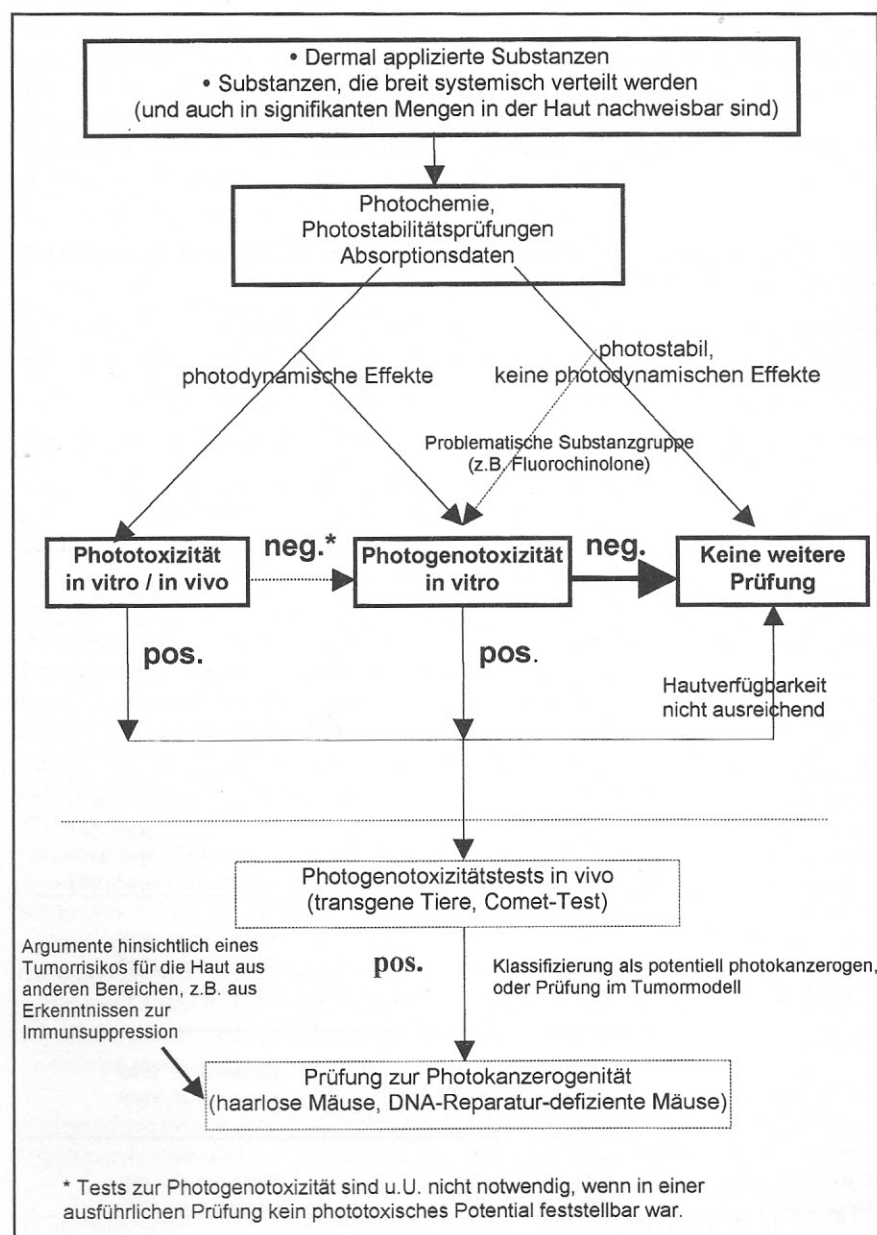


Abb. 1: Entscheidungsbaum zur Prüfung auf potentielle photokanzerogene Wirkungen

- enhance UVA-induced skin tumors. *J. Photochem. Photobiol. B: Biology*, 37, 174-181.
- Loprieno, N. (1991). PREAMBLE In vitro assay systems for testing photomutagenic chemicals. *Mutagenesis* 6, 331-333, with reference to: SCC Guideline CSC/803-5/90 Commission of the European Communities Scientific Committee for Cosmetology. Guidelines for assessing the potential for toxicity of compounds used as sunscreen agents in cosmetics.
- Snyder, R. D. and Cooper, C. S. (1999). Photogenotoxicity of fluoroquinolones in Chinese hamster V79 cells: dependency on active topoisomerase II. *Photochem. Photobiol.* 69, 288-293.
- Stern, R. S. and Laird, N. (1994). The carcinogenic risk of treatment for severe Psoriasis. *Cancer* 73, 2759-2764.
- Stern, R. S., Nichols, K. T. and Väkevä, L. H. (1997). Malignant melanoma in patients treated for psoriasis with methoxsalen (psoralen) and ultraviolet A radiation (PUVA). *New Eng. J. Med.* 336, 1041-1045.

Korrespondenzadresse

Dr. Lutz Müller
Novartis Pharma AG
WSH 2881.228
CH-4002 Basel
Tel. +41 61 32 41 797



Poster

A New Transgenic Embryonic Stem Cell Clone with Endodermal GFP Expression as Part of a Reporter Gene Test Battery for Embryotoxicity

Martin Paparella and Susanne Bremer

ECVAM, Institute for Health and Consumer Protection, European Commission, Joint Research Centre, I-Ispra

E-mail: martin.paparella@jrc.it

The capability of pluripotent embryonic stem cells (ESC) to differentiate *in vitro* into different tissues provides an opportunity to develop an *in vitro* assay for screening chemicals for their embryotoxic potential. Several groups

have reported attempts to identify the most suitable toxicological endpoints. (1991, 5, 57-64, Laschinsky et al., 1991, *Reproductive Toxicology*, 5, 57-64; Spielmann et al., 1997, *In Vitro Toxicology*, 10, 119-126; Bremer et al., 1999,

ATLA, 27, 471-484). ESC based reporter gene assays are currently being developed. They should allow quantification of the effects of chemicals on the development of germ layers and main target tissues. In this study we describe the establishment of an ESC clone transfected with the GFP reporter gene under the control of alpha fetoprotein (AFP) regulatory regions. AFP is used as a marker for visceral and definitive endodermal *in vitro* differentiation. GFP expressing cells were characterised and chemical effects on the ESC differentiation into endodermal cells were analysed. The relevance of the new clone for *in vitro* embryotoxicity testing is discussed.

Poster

Comparison of Cytotoxic Effects of Ochratoxin A and B on Human, Rat and Porcine Renal Cells

Alexandra Heussner¹, Michael Stack², Klaus Hochberg³ and Daniel R. Dietrich¹

¹Environmental Toxicology, University of D-Konstanz, ²Food and Drug Administration, USA-Washington D.C., ³Urology, Klinikum Konstanz, D-Konstanz

E-mail: Daniel.Dietrich@uni-konstanz.de

Chronic ingestion of the ubiquitous mycotoxin ochratoxin A (OTA) via contaminated food (bread, beer, coffee, wine, meat) has been associated with increased incidences of urothelial tumors and nephropathy in humans (e.g. Balkan Endemic Nephropathy, BEN). It has also been demonstrated to cause nephropathies in pigs and to be carcinogenic in rodents. Susceptibility to OTA toxicity displays large species- and sex-differences, the cause(s) of which are unknown but could

relate to differences in cytotoxic responses. This study investigated the cytotoxic effects of OTA and its less toxic structural analogue OTB on primary renal cortex cells from humans (biopsy material), both sexes of F344 rats, and from improved German hybrid pigs and a porcine renal cell line, LLC-PK1, in an attempt to characterise the observed *in vivo* differences using *in vitro* test systems. Cells were exposed to OTA and OTB at concentrations ranging from 1 nM to 100 µM for

24 to 96 hours. Following incubation several standard cytotoxicity endpoints were assessed: Neutral red uptake, MTT reduction and cell number analyses (Coulter counter) to show differences in proliferation. Supravital fluorescent staining techniques as well as electron microscopy were employed to detect toxin-induced morphological changes. A range of fluorescent labeled antibodies to cytoskeletal proteins (e.g. vimentin, cytokeratins, actin, talin, tubulin) were used to demonstrate OTA- and OTB-induced morphological changes. Although all cells showed similar toxin-induced alterations, distinct species-differences were observed with respect to their relative sensitivities: porcine kidney cells > human kidney cells > rat kidney cells/LLCPK-1. Therefore some of the observed species-differences in sensitivity to OTA (and OTB) toxicity *in vivo* can be demonstrated using *in vitro* models.