

12. Sitzung der BfR-Kommission Bf3R

Ergebnisprotokoll vom 24.11.2023

Die Bf3R-Kommission berät als ehrenamtliches und unabhängiges Sachverständigen-Gremium das Deutsche Zentrum zum Schutz von Versuchstieren (Bf3R) am Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) in seinen wissenschaftlichen Aktivitäten, Aufgaben und Zielen in Fragen des Schutzes von Versuchstieren. Mit ihrer wissenschaftlichen Expertise berät die Kommission das Bf3R. Die Kommission besteht aus 14 Mitgliedern, die für einen Turnus von vier Jahren über ein offenes Ausschreibungs- und Bewerbungsverfahren berufen wurden und sich durch wissenschaftliche Expertise auf ihrem jeweiligen Fachgebiet auszeichnen. Die Kommissionmitglieder sind zur Verschwiegenheit gegenüber Dritten und zur unparteilichen Erfüllung ihrer Aufgabe verpflichtet. Eventuelle Interessenkonflikte zu einzelnen in der Sitzung behandelten Tagesordnungspunkten (TOPs) werden transparent abgefragt und offengelegt. Aus dem vorliegenden Ergebnisprotokoll geht die wissenschaftliche Meinung der Bf3R-Kommission hervor. Die Empfehlungen der Kommission haben allein beratenden Charakter. Die Kommission selbst gibt keine Anordnungen und keine Gutachten heraus und ist dem BfR /Bf3R gegenüber auch nicht weisungsbefugt (und umgekehrt) oder in dessen Risikobewertungen involviert.

TOP 1 Begrüßung

In Abwesenheit der Vorsitzenden und stellvertretenden Vorsitzenden (stellv. V.) der Bf3R-Kommission eröffnet der Leiter des Bf3R die 12. Sitzung der Bf3R-Kommission als Hybridveranstaltung und begrüßt die Teilnehmenden.

TOP 2 Annahme der Tagesordnung und Abfrage von Interessenkonflikten

Die Geschäftsführende der Bf3R-Kommission fragt nach Änderungswünschen zur Tagesordnung. Alle Punkte der Tagesordnung werden ohne Änderungen angenommen. Die Beschlussfähigkeit der Kommission wird festgestellt.

Die Geschäftsführende der Bf3R-Kommission fragt mündlich, ob Interessenkonflikte zu einzelnen TOPs oder speziellen Themen bestehen. Es liegen keine Interessenskonflikte vor.

TOP 3 Aktueller Sachstand der bisher vorgestellten Projekte

- a. Kombination von Knochen-Organoiden und einem mikrophysiologischen "Chip"-System zur Untersuchung der desmalen Ossifikation

Die Vortragende stellt die Ergebnisse der Entwicklung einer tierversuchsfreien Methode zur Untersuchung der menschlichen Knochenphysiologie vor. Ziel ist es, die Reifungsstadien der desmalen

Namentlich gekennzeichnete Beiträge der Kommissionmitglieder geben die Meinung der jeweiligen Autorin/des Autors und nicht die Meinung des Bundesinstituts für Risikobewertung wieder.

Ossifikation und der Differenzierung von Osteoblasten zu Osteozyten zu modellieren, indem für die Knochenbildung relevante physiologische Parameter, wie mechanische Stimulation und lokale Sauerstoffspannung, einbezogen werden.

Mit Hilfe von trägerfreien und trägerbasierten Ansätzen wurden verschiedene menschliche knochenähnliche Organoiden aus primären Osteoblasten hergestellt. Die desmale Ossifikation wird durch die Fähigkeit der Zellen sich selbst zu größeren Agglomeraten und Pellets zusammenzufügen simuliert, um Verknöcherungszentren zu bilden. Um die Mineralisierung der Knochenmatrix nachzuahmen, wurden zellbeladene Typ-I-Kollagengerüste genutzt. Mit Hilfe eines bio-gedruckten Zell-Hydrogel wurde die Reifung von Osteoblasten zu Osteozyten untersucht.

Diese knochenähnlichen Organoiden wurden über sieben Tage in einer selbst entworfenen "Chip"-Plattform kultiviert und die Reaktion der Zellen auf eine permanente Perfusion, mechanische Stimulation und Anpassung der Sauerstoffspannung an einen für Knochen physiologischen Bereich (7 % bis 12 %) untersucht.

Die Zellen sind unter allen getesteten Kulturbedingungen lebensfähig, wobei ihre allgemeinen Stoffwechselfaktoren durch Sauerstoff und mechanische Belastung unterschiedlich beeinflusst werden. Osteogene Parameter wie die Aktivität der alkalischen Phosphatase und die Freisetzung von ProstaglandinE2 und Stickstoffmonoxid wurden ebenfalls untersucht. Auch die Verkalkung der Knochenmatrix und die Bildung von Osteozyten-typischen verlängerten zellulären Fortsätzen wurden bewertet. Die Ergebnisse legen nahe, dass knochenähnlichen Organoiden und ihre Kombination mit "Chip"-Plattform und Sensortechnologie das Potenzial haben, Tierversuche zur Knochenbiologie in der Grundlagen- und angewandten Forschung zu ersetzen.

Auf die Frage, ob tierische Bestandteile, z. B. Kälberserum, in den Modellen verwendet werden antwortet die Vortragende, dass das Kulturmedium noch fetales Kälberserum enthält und es zum Zeitpunkt der Arbeiten noch nicht möglich war, mit tierfreien Tinten im 3D-Druckmodell zu arbeiten. Es wurden Gelatine als Trägermittel in den 3D-gedruckten Organoiden und „Kollagenschwämme“ eines kommerziellen Anbieters verwendet. Die Frage nach den genauen Kosten der Experimente kann nicht mit konkreten Zahlen beantwortet werden. Der Chip als Einwegware wurde mehrfach verwendet, um Materialkosten zu sparen. Diesbezüglich sind Trägermodelle teurer als das trägerfreie Modell, welches jedoch zeitintensiver ist. Die Kommission empfiehlt, eine Kostenkalkulation pro Organoid(modell) zu entwerfen, inklusive Material- und Personalkosten, damit das oft genannte Argument, ein Tierversuch sei preiswerter, ggf. entkräftet werden kann.

Ferner wird diskutiert, dass die primären Spenderzellen sich bereits bei der Isolation als sehr heterogen darstellten, weshalb z. Z. eine Auswertung der Patientenakten vorgenommen wird. Es sollen Zellen von wenigstens vier Spendern eingeplant werden um robuste Daten zu erzeugen. Eine genauere statistische Planung ist bereits angedacht. Um die Gefahr von Kontaminationen einzuschränken wurde unter einer speziellen Sterilbank gearbeitet. Kritischer Moment für Kontaminationen ist der Schlauchwechsel an den Apparaturen. Für eine verbesserte Nährstoffversorgung der Organoiden ist angedacht, auch Endothelzellen aus den mesenchymalen Vorläuferzellen des Spendermaterials in die Kultur einzubringen. Um den Einfluss von Sauerstoffpartialdruck und im speziellen auch Hypoxie in Zukunft genauer untersuchen zu können, ist neben den Spenderzelllinien zukünftig die Etablierung einer standardisierten Zelllinie sinnvoll.

- b. Welche Chemikalien beeinflussen das Schilddrüsenhormon-System? - Methoden zur tierversuchsfreien Identifizierung von potentiellen Endokrinen Disruptoren der Schilddrüsen-Achse

Der Vortrag gibt einen Überblick über die aktuell in der FG93 laufenden Projekte mit Bezug zur Schilddrüsenachse. Vertiefend wird auf die Beiträge zu internationalen (Pre-) Validierungsbemühungen eingegangen (European Union Network of Laboratories for the Validation of Alternative Methods - EU-NETVAL¹, OECD Expertengruppe (EG), Public-private Platform for the Pre-validation of testing methods on endocrine disruptors - PEPPER²). FG93 ist vielfältig in diese Projekte eingebunden, wobei im Rahmen von NETVAL und der OECD EG insbesondere in der Rolle des Entwicklers und Experten konstruktive Beiträge zum Natrium-Iodid-Symporter Assay, dem Thyreoperoxidase - Assay, dem MCT8- Hormontransporter-Assay sowie zum Deiodase 1 Assay geleistet werden. Letzterer wurde gemeinsam mit BASF SE erfolgreich bei PEPPER zur Validierung und eingereicht.

Im zweiten Teil des Vortrags wird auf die verschiedenen, in Partnerschaft unterstützten EU-Projekte eingegangen, die in ausgewählten Assays die Wirkung von Chemikalien-Mixturen (PANORAMIX³), die Eigenschaften von per- und polyfluorierte Alkylsubstanzen - PFAS (SCENARIOS⁴) und die allgemeine Optimierung der Assaybedingungen (ATHENA⁵) bearbeiten und untersuchen. Zum Abschluss werden laufende Arbeiten im PARC Projekt vorgestellt, in deren Rahmen porcine Schilddrüsenfollikel aus Schlachtmaterial als komplexes, integratives Testsystem etabliert, optimiert und zur Anwendung gebracht werden sollen.

Die Anwesenden diskutieren das Problem der Spezifität vieler Assays für endokrine Disruptoren, die insbesondere bei Hochdurchsatz-Methoden eine hohe Zahl von positiv getesteten Substanzen erzeugen können. Diese Substanzen müssten dann entsprechend vorhandener OECD Prüfrichtlinien im Tier getestet werden. Auf die Frage nach Verhaltenstest im Zusammenhang mit dem Projekt porcine Schilddrüsenfollikel antwortet der Vortragende, dass Auswirkungen auf das Verhalten im Zusammenhang mit der Schilddrüsen-Achse nach derzeitigem Kenntnisstand nicht zu erwarten sind. Auf weitere Fragen zum Projekt porcine Schilddrüsenfollikel wird erläutert, dass die gemessene hohe Sekretionsrate von Schilddrüsenhormonen (T4 und T3) mit der im Tier gemessenen Serumkonzentrationen nicht direkt vergleichbar sind, da hier auch molekulare Stabilität und unterschiedliche Halbwertszeiten eine dominante Rolle spielen. Eine Übertragung des Modells auf humane Zellen soll erst versucht werden, wenn das porcine Modell hinreichend etabliert ist und auch ggf. nur als Verifizierungswerkzeug dienen. Dies ist nicht zuletzt der Verfügbarkeit von humanen Schilddrüsenfollikeln geschuldet, die im Gegensatz zu Schlachtabfällen vom Schwein wesentlich aufwendiger in ihrer Beschaffung sind, wodurch eine breite Testung mit humanem Material unrealistisch erscheint. Auch der Einsatz humaner induzierter pluripotenter Stammzellen (iPSC) in den

¹ https://joint-research-centre.ec.europa.eu/eu-reference-laboratory-alternatives-animal-testing-eurl-ecvam/alternative-methods-toxicity-testing/european-union-network-laboratories-validation-alternative-methods-eu-netval_en

² <https://ed-pepper.eu/en/>

³ <https://panoramix-h2020.eu/>

⁴ <https://scenarios-project.eu/>

⁵ <http://athenaedctestmethods.net/>

Assay insbesondere die Differenzierung von Follikelzellen aus iPSC ist komplex und die Etablierung der Methodik wird einige Zeit in Anspruch nehmen.

TOP 4 Neue Projekte am Bf3R

a. Organoide - Ein wichtiger Beitrag auf dem Weg zur Reduzierung von Tierversuchen

Organioide sind *in vitro* wachsende Zellgruppierungen, die in einer dreidimensionalen Matrix selbst-organisiert und in Form von komplexen Strukturen wachsen, und dabei Eigenschaften des Ursprungsorgans repräsentieren. Sie werden können aus isolierten somatischen Stammzellen, Gewebsfragmenten, aber auch über spezielle Differenzierungsprotokolle aus induzierten pluripotenten Stammzellen erzeugt werden. Organioide sind ein vielseitig einsetzbares *in vivo*-nahes Modellsystem mit einem breiten Anwendungsspektrum. Sie können als Krankheitsmodell, als Modell für Infektionen und zur Analyse von Geweben und Mikrobiom-Interaktion, sowie für die Wirkstofftestung verwendet werden. Die Ähnlichkeit zum lebenden Organ offeriert den Einsatz der Organioide als alternative Methode zum Tierversuch. Die bestehenden Organoid-Systeme limitieren jedoch diesen Schritt, da sie ein hohes Maß an Reproduzierbarkeit und Robustheit vermissen lassen und die zellulären Eigenschaften eines Organs nicht immer hinreichend widerspiegeln. Aus diesem Grund sollen neue Organoid-Systeme geschaffen werden, die über eine frei zugängliche apikale Zelloberfläche und eine funktionale Barriere-Funktion verfügen sowie in Größe und Quantität skalierbar sind. Des Weiteren soll die Komplexität durch Einbringen weiterer Zelltypen erhöht werden. Etabliert auf Basis humaner Zellen wird dieses Modell prospektiv die Option bieten, in toxikologischen und Wirksamkeits-Tests von Medikamenten sowie in Barriere- und Infektionsanalysen angewendet zu werden. Es kann dadurch beitragen Tierversuche zu reduzieren.

Der Vortragende beantwortet eine Reihe von Fragen zu Kulturbedingungen und Zellidentitäten und klärt Fragen zur Zellisolierung und zum Ansatz eines Organoid-Systems, das ohne die Basal-Membran-Matrix tierischen Ursprungs funktioniert sowie zur Etablierung komplexer Organoid-Systeme mit Immunzellen.

b. Entwicklung eines humanen Leberzellmodells mit Hilfe pluripotenter Stammzellen zur Beurteilung der Sicherheit von Substanzen

Humane induzierte pluripotente Stammzellen (hiPSCs) sind aufgrund ihres Differenzierungspotenzials und ihrer Proliferationsfähigkeit eine unschätzbare Quelle für Arzneimittelscreenings und Toxizitätstests. Jüngste Fortschritte in der Genomeditierung und Organoidkulturtechnologie ermöglichen vielversprechende Anwendungen von hiPSC-abgeleiteten Zellmodellen in verschiedenen biomedizinischen Tests, einschließlich der toxikologischer Bewertung. Die etablierte hiPSC-Linie CYP1A1 exprimiert mCherry-markiertes Cytochrom P450 1A1 und differenziert sich in funktionelle Hepatozyten, die für das In-vitro-Screening von Aryl-Kohlenwasserstoff-Rezeptor (AHR)-Modulatoren verwendet werden können. In differenzierten Hepatozyten-ähnlichen Zellen (HLCs) wurde die mCherry-Expression deutlich erhöht und durch AHR-spezifische Agonisten und Antagonisten reguliert. Die Verwendung von CYP1A1-mCherry-hiPSC-abgeleiteten HLCs als

Lebendzell-Screeningsystem ermöglicht es, AHR-selektive Liganden und Inhibitoren von unbekanntem chemischen Verbindungen zu unterscheiden. Darüber hinaus wurde mit Hilfe von Organoid-Kulturtechniken ein von hiPSC abgeleitetes 3D-Leberzellmodell mit hoher Metabolisierungskapazität entwickelt. Dazu wurde ein zweistufiges Protokoll etabliert, das aus hiPSC gewonnene Leberorganoide (hHOs) für die langfristige In-vitro-Expansion und Bewertung der stoffinduzierten Hepatotoxizität geeignet macht. Vollständig differenzierte hHOs waren multizellulär zusammengesetzt, zeigten zelluläre Polarität und hepatobiliäre Strukturen. Zudem zeigten hHOs bemerkenswerte CYP450-Aktivität und rekapitulierten die metabolische Clearance und den CYP450-vermittelten Stoffwechsel der Testsubstanz. Zusammengefasst stellt das etablierte hPSC-basierte Leberzellmodell eine fortschrittliche In-vitro-Methode für die toxikologische Bewertung dar.

Der Vortragende erörtert auf Nachfrage die Problematik der Lebertoxizität: Der Hauptgrund für Leberversagen ist Arzneimittel- bzw. generell Substanz-induzierte Toxizität auf Leberzellen. Toxizitätstests im Tierversuch und in der Primärkultur von humanen Leberzellen liefern häufig keine verlässlichen Daten für die Wirkung auf die menschliche Leber. Um die komplexe Struktur und Zonen der Leber in das Organoid einzubeziehen, wird derzeit bereits ein Protokoll zur Integration von differenzierten Ito-Zellen entwickelt.

TOP 5 Aktuelle Themen des Bf3R

- a. Versuchstiermeldung - Prüfung der Daten am Bf3R und aktueller Stand der Jahres- und 5-Jahres-Meldung 2022

Das Bf3R koordiniert seit dem Berichtsjahr 2020 die bundesdeutsche Versuchstiermeldung. Dabei prüft das Bf3R die Daten, die von den zuständigen Behörden der Länder eingehen und stellt diese für eine Berichterstattung an die Europäische Kommission zusammen. Anschließend bereitet das Bf3R die deutsche Versuchstiermeldung für die Bürgerinnen und Bürger zur Veröffentlichung auf der Webseite des Bf3R⁶ vor. Zusätzlich zur jährlichen Meldung der in Deutschland durchgeführten Tierversuche wurden für das Berichtsjahr weitere Daten erhoben. Diese umfassen die Tötung von Tieren zur wissenschaftlichen Verwendung ihrer Organe und Gewebe sowie die Tötung von Versuchstieren, die zwar für wissenschaftliche Zwecke gezüchtet, aber nicht für diese Zwecke verwendet wurden. Darüber hinaus werden Daten zu durchgeführten Genotypisierungsmethoden erfasst. Diese zusätzlichen Daten werden alle fünf Jahre ebenfalls an die Europäische Kommission übermittelt; das Berichtsjahr 2022 ist ein Jahr für eine solche 5-Jahres-Meldung.

Im Rahmen des Vortrages werden die Rechtsgrundlagen, der Ablauf sowie der Stand der Versuchstiermeldung insbesondere für das Berichtsjahr 2022 skizziert. Eine kurze Präsentation der Versuchstierzahlen 2021 wird gegeben. Die Datenauswertung für das Meldejahr 2022 ist zum gegebenen Zeitpunkt noch nicht abgeschlossen.

Auf Nachfrage erklärt der Vortragende, dass das Bf3R keine Akteneinsicht in die Tierversuchsanträge hat und die Datensätze aus den Bundesländern über die jeweils zuständigen Behörden gesammelt und anonymisiert weitergeleitet werden. Auch die Zahlen von Tieren, die in Versuchen am Bf3R eingesetzt wurden, gehen in die Statistik ein und werden an die zuständige Behörde, in diesem Fall

⁶ https://www.bf3r.de/de/erfassung_von_versuchstierzahlen_in_deutschland-310435.html

das Landesamt für Gesundheit und Soziales in Berlin, übermittelt. Ein Kommissionsmitglied gibt zu bedenken, dass die Versuchstiermeldung inzwischen einen Grad von Komplexität erreicht hat, der für die meisten Bürgerinnen und Bürger kaum noch nachvollziehbar sein kann. Der Vortragende antwortet, dass die Kritik nachvollziehbar ist, das Bf3R jedoch auf gesetzlichen Auftrag unter Berücksichtigung der EU-rechtlichen Vorgaben arbeitet, wobei sich nur begrenzter Interpretationsspielraum bietet.

b. Einblick in die Entwicklung der 3R Strategie in der Industrie - Fokus auf Refinement

Das Bf3R hatte im Vorlauf der Sitzung die Mitglieder der Bf3R-Kommission um einen Beitrag über Anwendung und Forschung zu Refinement in der industriellen Forschung und Toxikologie gebeten. Hintergrund ist die mangelnde Verfügbarkeit von Daten über den Einsatz von Refinement in diesem Zweig der Forschung.

Ein Mitglied der Bf3R-Kommission gibt einen Einblick in die Vorgehensweise einer großen Deutschen Firma mit Forschungssektor. Das Thema Tierschutz wird von der Firma sehr ernst genommen. Ohne firmenübergreifende oder gar globale Vorgaben zum Refinement, hat die Firma seit 25 Jahren ein internes Budget für 3R-Maßnahmen und -Forschung eingerichtet. Neben der Entwicklung von tierfreien Testmethoden (Replace) und der Optimierung bestehender Protokolle (Reduce), setzt die Firma auch auf Refinementmaßnahmen, die insbesondere die Studienqualität, die Handhabung von Versuchstieren, Haltungsbedingungen, sowie Aus- und Weiterbildung von Personal, das mit Versuchstieren arbeitet, beinhaltet.

Um einen möglichst hohen Schutz der Versuchstiere zu gewährleisten, werden die an Tierversuchen beteiligten Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler wöchentlich zu einer Sitzung einberufen, in welcher alle anstehenden Studien besprochen, Abbruchkriterien von Fall zu Fall abgeglichen und die Wahl der einzusetzenden Dosis ausgiebig besprochen werden. Auf eine gemeinsame Entscheidung aller Prüfleiter wird großen Wert gelegt. Zudem ist der Tierschutzausschuss dieser Firma sehr divers besetzt. Der Tierschutz wird im Rahmen des Arbeitsschutzes von der AAALAC regelmäßig akkreditiert. Die Erprobung neuer Refinement-Maßnahmen werden u.a. als betreute Projekte von Studierenden in Praktika im Masterstudiengang Toxikologie bei der Firma durchgeführt.

Der Einsatz von Refinementmaßnahmen stößt in der Praxis an ihre Grenzen, wenn beispielsweise der langfristig metabolisch/toxikologische Einfluss von Materialien, aus denen die Beschäftigungsutensilien für Versuchstiere bestehen, nicht klar ist. Dies gewinnt zunehmend an Bedeutung da immer mehr Polymere und Nanomaterialien zukünftig getestet werden sollen. Zudem sind besonders die Versuchsbedingungen in der toxikologischen Forschung und Bewertung von Stoffen im Detail von internationalen Vorgaben abhängig.

In der anschließenden Diskussion wurden folgende Themen tiefer beleuchtet:

- 1) Automatisierte Heimatkäfige mit Frühwarnsystemen finden noch keine weite Anwendung. Dafür wird im Unternehmen großer Wert auf geschulte Mitarbeiter gelegt, die während



engmaschiger Kontrollen von Tieren im Versuch rechtzeitig Auffälligkeiten erkennen und je nach Studie anhand eines Prüfplans (Score-Sheet) entsprechende Maßnahmen ergreifen.

- 2) Die sogenannten „frühen humanen Endpunkte“ für Tierversuche stehen den Vorgaben der OECD-Testrichtlinien und den regulatorischen Behörden oftmals entgegen. Behörden sogar die Wiederholung von Testreihen verlangen, wenn die Aussagekraft der Versuchsergebnisse durch frühe Abbruchkriterien beeinträchtigt werden.
- 3) Es gibt wenig Informationen zum Einfluss von Refinement auf experimentelle Daten in der Toxikologie. Ein Mitglied der Kommission weist darauf hin, dass auch der Umkehrschluss dieser Aussage zutreffen kann: Eine nicht optimierte Belastung kann Einfluss auf den Readout eines Versuches nehmen. In der Toxikologie könnten z.B. unspezifische (toxische) Wirkungen spezifisch aussehende Effekte indizieren, die ggf. zu Fehlinterpretationen führen könnten.

TOP 6 Verschiedenes

Eine Mitarbeiterin des Bf3R gibt bekannt, dass das SMAFIRA (‘SMARt Feature basiertes Interaktives RAnking’)-Tool jetzt online verfügbar ist⁷. Die Suchmaschine SMAFIRA soll Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler bei der Suche nach Alternativmethoden zu Tierversuchen unterstützen.

Die Geschäftsführerin der Bf3R-Kommission kündigt an, die Termine für folgende Sitzungen zukünftig bereits auf den Sitzungen zu besprechen, um lange Verzögerungen im Abstimmungsprozess vorzubeugen. Der nächste Sitzungstermin steht bereits fest: Die 13. Sitzung der Bf3R-Kommission findet am 22. März 2024 statt.

Es werden Themenwünsche der Kommissionsmitglieder für die kommenden Sitzungen erfragt. Zu den Vorschlägen gehören: die Funktion der/des Tierschutzbeauftragten (Nationaler Ausschuss); Publikationen des Nationalen Expertenpool; Ausführungen zum Tierarzneimittelgesetz (für mehr Rechtssicherheit). Außerdem besteht der Wunsch, neben den interessanten Vorträgen die Tagesordnung durch eine Führung über den Campus oder ähnlichen Aktionen zu bereichern.

Der Leiter des Bf3R bedankt sich für die Teilnahme aller und schließt die Sitzung.

⁷ <https://smafira.bf3r.de/>
