

### **3.9 Fachgruppe 91**

#### **Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch (ZEBET)**

- Erfassung, Dokumentation und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zu Tierversuchen mit dem Ziel, Tierversuche so weit wie möglich zu vermeiden und Wissenschaft und Forschung zum Einsatz tierversuchsfreier Methoden zu bewegen. Zu diesem Zweck wird eigene Forschung durchgeführt; und es werden Forschungsaufgaben an andere Institutionen vergeben.

- Spezielle Aufgaben des Tierschutzes in Haltung und Transport von Nutztieren-

##### **3.9.1 Detaillierte Aufgabenbeschreibung**

##### **3.9.2 Dokumentation und Information**

###### **3.9.2.1 Informationsdienst**

###### **3.9.2.2 ZEBET-Datenbank**

##### **3.9.3 Validierung und Behördliche Anerkennung**

###### **3.9.3.1 ECVAM (Europäische Validierungsbehörde) Projekt: "Validierungsstudie von drei In-vitro-Embryotoxizitätstests"**

###### **3.9.3.2 EU Kommission akzeptiert *in vitro* Phototoxizitätstest als erste experimentell validierte tierversuchsfreie Prüfmethode in der Sicherheitstoxikologie**

###### **3.9.3.3 Behördliche Anerkennung von zwei Alternativmethoden durch die OECD 2001**

##### **3.9.4 Forschung und Forschungsförderung**

###### **3.9.4.1 BMBF-Verbundprojekt: "Weiterentwicklung eines In-vitro-Embryotoxizitätstests mit embryonalen Stammzellen: Verwendung molekularer Marker zur Erfassung verschiedener Differenzierungsendpunkte - Teilprojekt 1"**

###### **3.9.4.2 BMBF-Projekt: "Primordiale Keimzellen der Maus als In-vitro-Modell zur Erfassung von Fertilitätsbeeinträchtigungen"**

###### **3.9.4.3 Vorbereitung einer Validierungsstudie in Zusammenarbeit mit dem Validierungszentrum der US-Bundesbehörden ICCVAM über In-vitro-Methoden zur Bewertung der akuten systemischen Toxizität**

###### **3.9.4.4 Forschungsförderung: Vergabe von Forschungsmitteln für die wissenschaftliche Erarbeitung von Tierversuchersatzmethoden**

##### **3.9.5 Mitarbeit in internationalen Gremien**

##### **3.9.6 Auszeichnungen**

##### **3.9.7 ZEBET-Kommission**

##### **3.9.8 Spezielle Fragen des Tierschutzes bei Haltung, Transport und Schlachtung**

###### **3.9.8.1 Detaillierte Aufgabenbeschreibung**

###### **3.9.8.1.1 Beratung von Bundesregierung, Länderbehörden, wissenschaftlichen Einrichtungen und von Fachgremien bei Vorbereitung und Vollzug von tierschutzrelevanten Rechtsvorschriften**

###### **3.9.8.1.2 Mitarbeit in nationalen und internationalen Gremien**

###### **3.9.8.1.3 Durchführung von wissenschaftlichen Forschungsvorhaben**

### 3.9.1 Detaillierte Aufgabenbeschreibung

Die 1989 gegründete "Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch" (ZEBET) im BgVV hat die behördliche Aufgabe, Ersatz- und Ergänzungsmethoden zu Tierversuchen zu erfassen, zu bewerten und ihre Anerkennung zu erreichen. Darüber hinaus ist ZEBET im Rahmen des Vollzuges des Tierschutzgesetzes (TSchG) für die zuständigen Behörden der Bundesländer als Auskunftsstelle für Ersatz- und Ergänzungsmethoden zu Tierversuchen tätig. Dazu wurde die ZEBET-Datenbank (AnimAlt-ZEBET) über Alternativmethoden etabliert, die seit Anfang des Jahres 2000 über DIMDI im Internet in englischer Sprache kostenlos abrufbar ist:

(<http://www.bgvv.de/index.htm?tierschutz/zebet/arbeitsgebiete/doku/datenbank/index.htm>).

Eine weitere Aufgabe ist die experimentelle Validierung tierversuchsfreier Methoden, um ihre Aufnahme in internationale behördliche, sicherheitstoxikologische Prüfrichtlinien zu erreichen. ZEBET nimmt als staatliche Einrichtung international eine Sonderstellung ein, da ähnliche Institutionen im Ausland über Spenden der Industrie finanziert werden. Seit 1994 wird die Arbeit der ZEBET von einer Kommission begleitet, deren Mitglieder vom BMVEL berufen werden. Die Kommission besteht aus Wissenschaftlern der chemisch-pharmazeutischen Industrie, Vertretern von Tierschutzorganisationen, einer Länderbehörde sowie der Bundesministerien BMVEL, BMG, BMBF und BMU.

Die Aufgabe von ZEBET umfaßt die drei Gebiete

- Dokumentation und Information,
- Bewertung/Validierung und
- Forschung/Forschungsförderung.

Diesen Funktionen entspricht die Gliederung in die Fachgebiete ZEBET 1, 2 und 3. Zusätzlich wurde 1995 das Fachgebiet 'Spezielle Fragen des Tierschutzes' (FG 911) der ZEBET zugeordnet.

Bei **ZEBET 1 (Dokumentation und Information)** werden Ersatz- und Ergänzungsmethoden zu Tierversuchen in der ZEBET Datenbank für Alternativmethoden zu Tierversuchen (AnimAlt-ZEBET) dokumentiert und auf ihre Eignung zur praktischen Anwendung bewertet. Für den Informationsdienst nutzt ZEBET die eigene ZEBET Datenbank für Alternativmethoden und führt über DIMDI Recherchen in internationalen Literatur- und Faktendatenbanken durch. Die ZEBET Datenbank wird seit Beginn des Jahres 2000 über DIMDI in englischer Sprache kostenlos im Internet angeboten (siehe oben).

**ZEBET 2 (Bewertung und Validierung)** ist gutachterlich tätig und hat die Aufgabe, experimentelle Validierungsstudien in Kooperation mit dem EU-Validierungszentrum ECVAM (European Centre for the Validation of Alternative Methods), dem BMBF-Schwerpunkt "Ersatzmethoden zum Tierversuch" und der deutschen Stiftung zum Ersatz von Tierversuchen (set) zu initiieren, zu koordinieren und sich auch experimentell zu beteiligen. International kooperiert ZEBET auf dem Gebiet der experimentellen Validierung von Alternativmethoden zu Tierversuchen eng mit dem EU-Validierungszentrum ECVAM in Ispra (Italien) sowie mit ICCVAM, dem Validierungszentrum der US-Bundesbehörden (US Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods), im NIEHS in Research Triangle Park (National Institute of Environmental Health Services, USA).

Bei **ZEBET 3 (Forschung und Forschungsförderung)** standen für die Vergabe von Forschungsmitteln zur wissenschaftlichen Erarbeitung von Ersatzmethoden zum Tierversuch seit 1990 etwa 350.000 € pro Jahr zur Verfügung. Im Labor von ZEBET 3 wird seit dem Jahr 2000 mit Unterstützung des BMBF in einem Kooperationsprojekt mit den Arzneimittelfirmen Bayer AG, Boehringer Ingelheim Pharma KG und Schering AG an der Verbesserung eines In-vitro-Embryotoxizitätstests gearbeitet, bei dem embryonale Stammzellen der Maus eingesetzt werden. Der embryonale Stammzelltest (EST) wurde bei ZEBET entwickelt und in ei-

nem EU-Projekt erfolgreich validiert. Ziel des BMBF-Projektes ist die Etablierung molekularer Endpunkte im EST.

### Internationale Kooperation

Der Leiter ZEBET vertritt Deutschland im Wissenschaftlichen Beirat der ECVAM.

Außerdem gehört ZEBET zu den Mitherausgebern zweier angesehenen wissenschaftlichen Zeitschriften für das Gebiet der Alternativmethoden zu Tierversuchen im englischen Sprachraum - ALTA (Alternatives to Laboratory Animals), die in Nottingham erscheint, und ALTEX (Alternativen zu Tierexperimenten), die in Zürich erscheint.

## 3.9.2 Dokumentation und Information

### 3.9.2.1 Informationsdienst

#### Aufgaben und Ziele des Informationsdienstes

Im Rahmen des Vollzuges des Tierschutzgesetzes in Deutschland fertigt ZEBET auf Anfragen von Länderbehörden zu Anträgen auf Genehmigung oder Anzeigen von Tierversuchsvorhaben auf dem Wege der Amtshilfe in strittigen Fällen Gutachten an und berät Behörden bei der Erfüllung tierschutzrechtlicher Vorschriften. Darüber hinaus beantwortet ZEBET Anfragen von Wissenschaftlern, Tierschutzbeauftragten und anderen Interessenten zur Anwendung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zu Tierversuchen. Außerdem ist ZEBET in die wissenschaftliche Begutachtung von nationalen und internationalen Forschungsprojekten und von Tierschutz-Forschungspreisen eingebunden, die die Entwicklung oder Validierung von Alternativmethoden zum Ziel haben.

Für die gutachterlichen Stellungnahmen benutzt ZEBET folgende Quellen:

- die eigene ZEBET-Datenbank über Ersatz- und Ergänzungsmethoden (siehe nächster Abschnitt);
- Berichte, Protokolle und Literatur, über die ZEBET aufgrund der Tätigkeit in nationalen und internationalen Validierungsprojekten, in Normenausschüssen und anderen Arbeitsgruppen verfügt;
- Recherchen in nationalen und internationalen biomedizinischen Literatur- und Faktendatenbanken über DIMDI.

#### Wer nutzt den ZEBET Informationsdienst?

**Abbildung 1** zeigt, dass von 1990 bis 2001 insgesamt 3068 Anfragen von ZEBET beantwortet wurden; 2001 insgesamt 455 Anfragen. Die prozentualen Anteile einzelner Institutionen an den Anfragen in 2001 werden in der **Abbildung 2** dargestellt. Die Hälfte der Anfragen stellten Wissenschaftler aus der Industrie, Universitäten und Forschungszentren im In- und Ausland, für die ZEBET inzwischen ein kompetenter Ansprechpartner ist. Die **Abbildung 3** zeigt die Verteilung der Anfragen auf das In- und Ausland für die Jahre 1996 bis 2001. Grundsätzlich stieg in den letzten Jahren die Anzahl der Anfragen zu In-vitro-Methoden von Laboratorien im In- und Ausland, die neue Methoden etablieren möchten. Diese Entwicklung beruht auf der zunehmenden Anerkennung sicherheitstoxikologischer In-vitro-Prüfmethoden, die von ZEBET international in enger Kooperation mit der EU und mit der chemisch-pharmazeutischen und kosmetischen Industrie validiert wurden.

#### Abbildung 1: Anfragen an den ZEBET-Informationsdienst

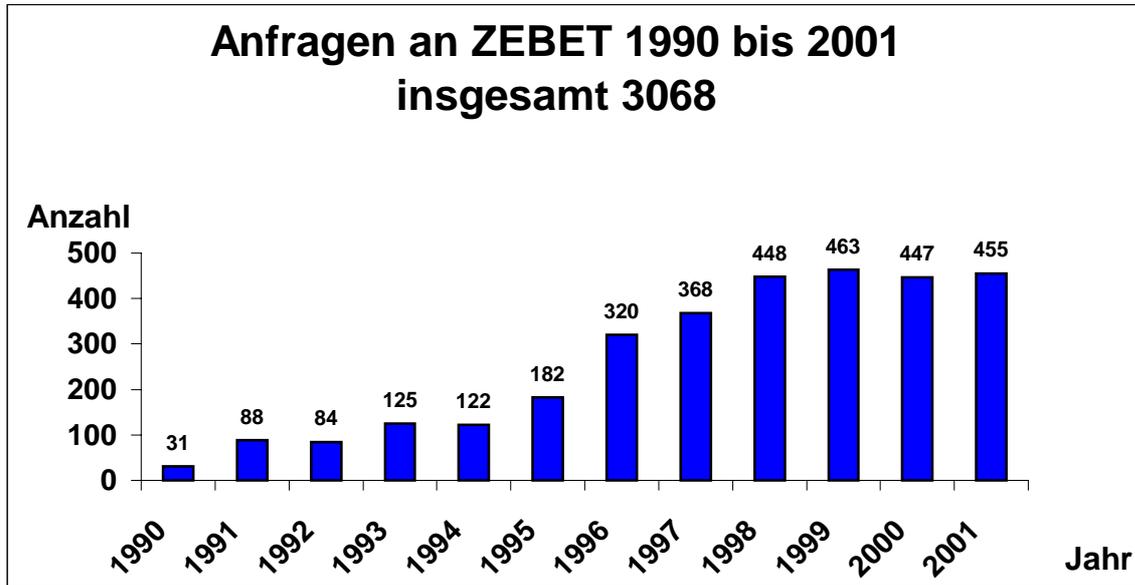
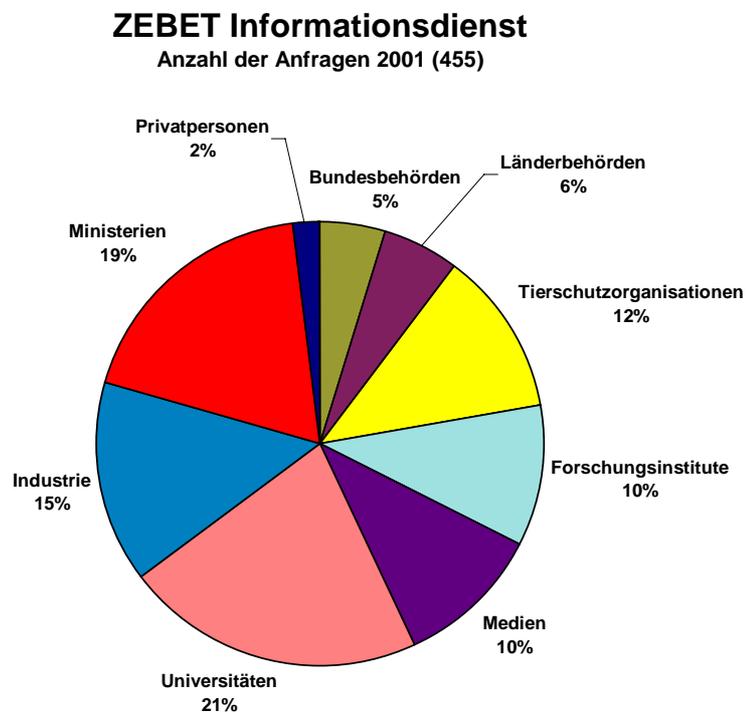
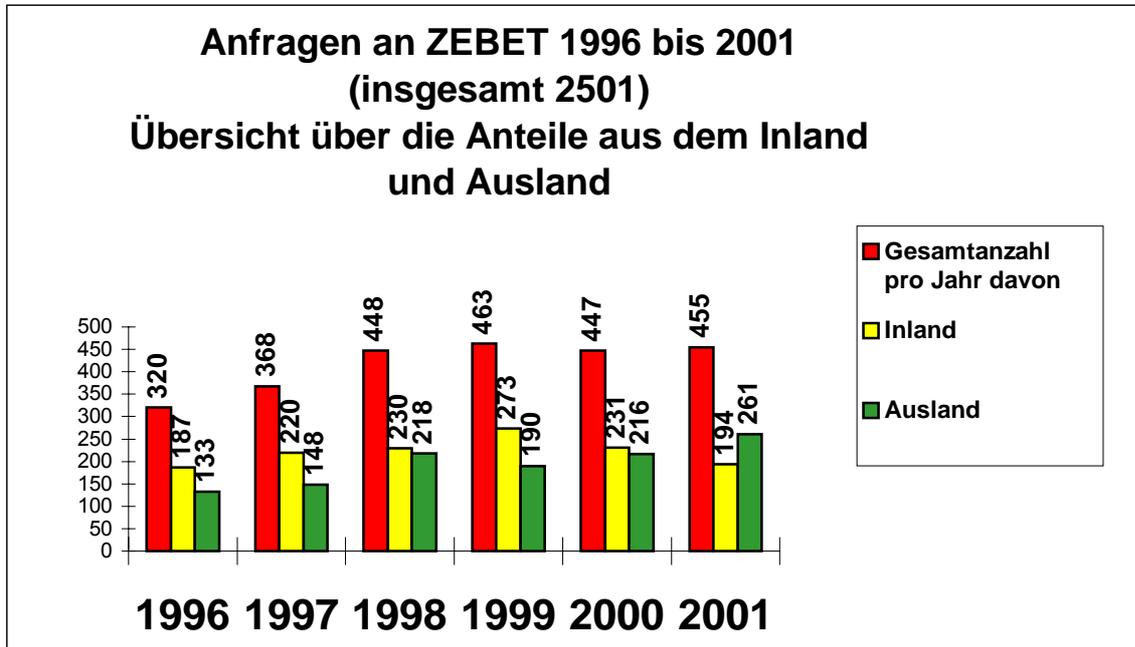


Abbildung 2. Nutzer des ZEBET-Informationdienstes



**Abbildung 3: Nationale und internationale Anfragen an den ZEBET-Informationssdienst**


### 3.9.2.2 ZEBET-Datenbank (AltAnim-ZEBET)

#### Aufgabenstellung der ZEBET-Datenbank

Das deutsche Tierschutzgesetz und die übergeordnete EU-Richtlinie 86/609/EEC zum Schutz von Versuchstieren schreibt den Wissenschaftlern vor, bei der Vorbereitung ihrer Versuchsvorhaben zu prüfen, ob der verfolgte Zweck nicht durch andere Methoden oder Verfahren als den Tierversuch erreicht werden kann (§ 7, Abs. 2, Satz 2 Tierschutzgesetz). Die ZEBET-Datenbank hat die Aufgabe, die Prüfung der Unerlässlichkeit von Tierversuchen durch relevante Informationen zu unterstützen.

#### Zugriff auf die ZEBET-Datenbank

Auf die ZEBET-Datenbank kann online sowohl über das Deutsche Institut für Medizinische Information und Dokumentation (DIMDI, <http://www.dimdi.de>) als auch über die Webseite des BgVV (<http://www.bgvv.de>) zugegriffen werden. Den Wissenschaftlern, Behördenvertretern aber auch allen anderen interessierten Besuchern der Datenbank stehen alle Leistungen des DIMDI-Benutzerservices zur Verfügung. Hinweise für die Suchfunktionen werden in der sogenannten „Memokarte zur ZEBET-Datenbank“ von DIMDI gegeben. Der Zugriff auf die Datenbank ist ohne Anmeldung kostenfrei möglich. Benutzerführungen werden sowohl in deutscher als auch in englischer Sprache angeboten.

Die ZEBET-Datenbank erreichte in 2000 und 2001 folgende Zugriffszahlen:

- insgesamt 22.400 Zugriffe vom Februar bis Dezember 2000,
- insgesamt 17.274 Zugriffe vom Januar bis September 2001.
- Die Mehrzahl der Zugriffe kam aus Deutschland. Die Zugriffe aus dem Ausland kamen besonders häufig aus Spanien und Italien.

Für die Akzeptanz der ZEBET-Datenbank ist es wichtig, dass inzwischen Links zur ZEBET-Datenbank von deutschen Universitäten, europäischen und amerikanischen Institutionen eingerichtet wurden.

### **Inhalt der ZEBET-Datenbank**

Die Dokumente der Datenbank werden in Englisch angefertigt, um eine reibungslose Suche in allen Abschnitten der Datenbank einschließlich aller bibliographischen Daten zu sichern. Dabei wird anerkannt, dass der überwiegende Teil der naturwissenschaftlichen Literatur in englischer Sprache veröffentlicht wird.

Die in der Fachliteratur beschriebenen Alternativmethoden werden vor ihrer Aufnahme in die ZEBET-Datenbank eingehend nach wissenschaftlichen Kriterien bewertet. Diese Kriterien entsprechen dem Prinzip der "3 R" von Russel und Burch (1959); das heißt, es werden ausschließlich Methoden dokumentiert, die mindestens eine der drei folgenden Anforderungen erfüllen:

- Durch die Anwendung der Methode werden Tierversuche ersetzt ("Replacement"),
- die Zahl der Versuchstiere wird reduziert ("Reduction"),
- das Leiden und die Schmerzen der Versuchstiere werden vermindert ("Refinement").

Außerdem werden der Entwicklungsstand und die wissenschaftliche bzw. behördliche Akzeptanz der Alternativmethode bewertet und dokumentiert. Die Dokumente der ZEBET-Datenbank gliedern sich in Datenfelder auf: Bezeichnung der Methode, Schlagwörter, Bewertung, Zusammenfassung und Literatur.

In der Datenbank sind bisher 74 Methoden dokumentiert. Als Schwerpunkt werden Alternativmethoden dokumentiert, die für pharmakologische und toxikologische Fragestellungen entwickelt wurden. Daneben werden aber auch Methoden aus anderen Fachgebieten dokumentiert, wie z.B. aus der Mikrobiologie, Immunologie, Lebensmittelhygiene und Neurologie. ZEBET ist für die fortlaufende Aktualisierung der bereits vorhandenen Dokumente und die Anfertigung neuer Dokumente verantwortlich.

### **Besonderheiten der ZEBET-Datenbank**

Die Datenbank zeichnet sich durch zwei Besonderheiten aus:

#### *1. Wissenschaftliche Bewertung der dokumentierten Methoden*

Die ZEBET-Datenbank unterscheidet sich von anderen nationalen und internationalen Datenbanken über Alternativmethoden zum Tierversuch dadurch, dass der Entwicklungsstand jeder Methode, ihre Relevanz für den Tierschutz, die experimentelle Validierung und die wissenschaftliche bzw. behördliche Akzeptanz bewertet und dokumentiert sind.

#### *2. Gleichzeitige Recherche in mehreren Datenbanken*

DIMDI bietet seinen Nutzern sehr gute Suchmöglichkeiten an. Dazu gehört die gleichzeitige Recherche in mehreren Datenbanken. So ist es möglich, in der ZEBET-Datenbank allein zu recherchieren oder für die Recherche die ZEBET-Datenbank z.B. mit MEDLINE zu verknüpfen. Die Nutzer können so zu einem Thema die ZEBET-Datenbank und gleichzeitig die von MEDLINE erfasste und verschlagwortete Literatur abfragen.

### **Sonderforschungsprojekt zur Erweiterung der ZEBET-Datenbank**

Die Mitarbeiter der ZEBET-Datenbank haben 2001 wichtige Vorbereitungen zur Durchführung des bewilligten Sonderforschungsprojekts "Indexierung biowissenschaftlicher Informationen unter besonderer Berücksichtigung von Online-Datenbanken für Alternativmethoden zu Tierversuchen" abgeschlossen und werden in 2002 mit den eigentlichen Arbeiten beginnen.

Der Hintergrund dieses Projektes ist die Tatsache, dass es gegenwärtig für die Indexierung (Verschlagwortung) von Online-Datenbanken für Alternativmethoden weder Anleitungen, Regelwerke wie einen Thesaurus, noch publizierte Erfahrungsberichte gibt. Das liegt sicher auch daran, dass auf diesem Gebiet weltweit erst seit ca. zehn Jahren gearbeitet wird. Eine gute Indexierung wird aber grundsätzlich als eine Voraussetzung für das Auffinden von Informationen betrachtet.

Was ist eine gute Indexierung von Alternativmethoden? Diese Frage wurde bisher weder für Datenbanken noch für andere relevante Adressen im Internet beantwortet. ZEBET bringt in das Projekt seine langjährigen praktischen Erfahrungen auf dem Gebiet der Dokumentation von Alternativmethoden ein. Unabhängig davon wird ZEBET in diesem Projektes eng mit der Fachhochschule Potsdam, Institut für Information und Dokumentation, zusammenarbeiten.

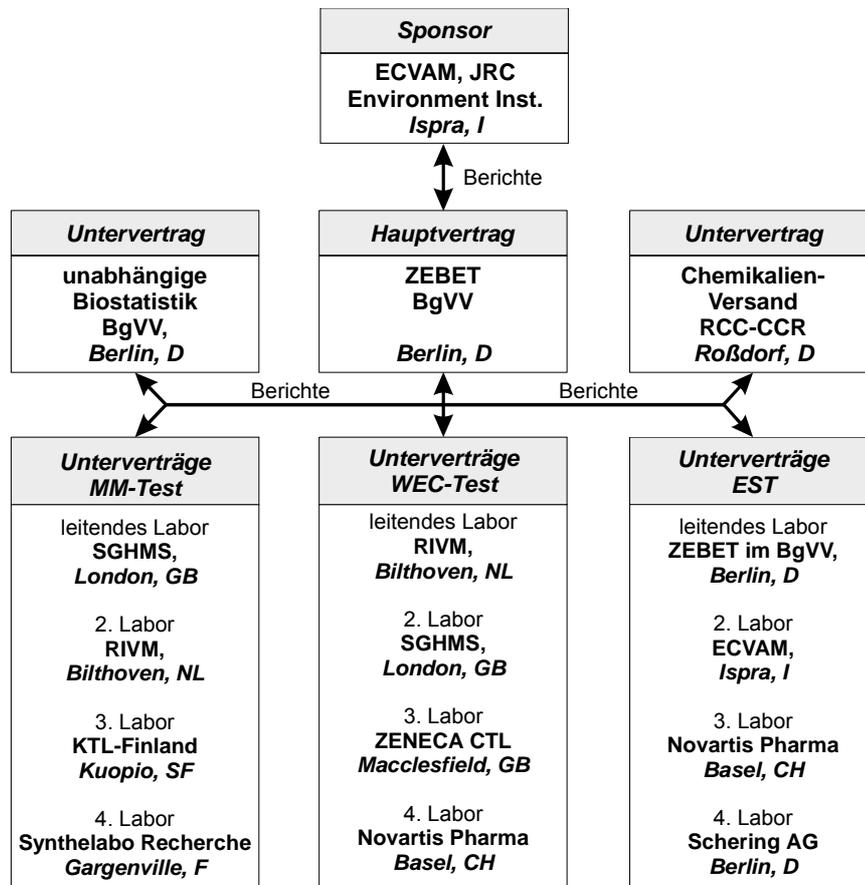
### **Forschungspreis 2001 für die ZEBET-Datenbank (AltAnim-ZEBET)**

Im September 2001 wurde die ZEBET-Datenbank (AltAnim-ZEBET) mit dem Herbert-Stiller-Forschungspreis 2000 ausgezeichnet. Der Herbert-Stiller-Forschungspreis 2000 war mit 50.000 DM dotiert und wurde zu gleichen Teilen von den Tierschutzvereinigungen „Ärzte gegen Tierversuche e.V.“ und „Bürger gegen Tierversuche e.V. Hamburg“ gestiftet. Der Preis wurde am 8. September 2001 im Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin durch die Vorsitzenden der beiden Tierschutzvereinigungen, Herrn Dr. Bernhard Rambeck und Frau Simone Runde, überreicht. Die „Ärzte gegen Tierversuche“ bemühen sich vor allem um die Aufklärung der Öffentlichkeit über Tierexperimente und über Möglichkeiten des Ersatzes von Tierversuchen. Die Auszeichnung mit dem Herbert-Stiller-Forschungspreis ist eine Bestätigung für die Akzeptanz und Anerkennung der ZEBET-Datenbank. Der Forschungspreis wird zweckgebunden für den weiteren Aufbau der ZEBET-Datenbank verwendet.

## **3.9.3 Bewertung und Validierung**

### **3.9.3.1 ECVAM-Projekt „Validierungsstudie von drei In-vitro-Embryotoxizitätstests“**

Von 1997 bis 2000 koordinierte ZEBET im Auftrag der ECVAM eine Studie zur Prävalidierung und Validierung von drei In-vitro-Embryotoxizitätstests. Bei diesen Tests handelt es sich um Systeme mit Kulturen ganzer Rattenembryonen (Whole Embryo Culture Test, WEC-Test), mit Kulturen von primären Zellen der Extremitätenknospen von Rattenembryonen (Micromass-Test, MM-Test) und mit einem In-vitro-Differenzierungsmodell mit embryonalen Stammzellen der Maus. Letzterer (Embryonaler Stammzelltest, EST) wurde bei ZEBET entwickelt, und mit diesem Test nahm die ZEBET auch selbst an der Studie teil. Die Struktur der Studie ist in **Abbildung 4** dargestellt. Jeder der Tests wurde in vier teilnehmenden Laboratorien mit je 20 Testsubstanzen unter blinden Bedingungen nach den formalen Validierungskriterien der ECVAM durchgeführt. Die Testsubstanzen wurden sehr sorgfältig aufgrund umfangreicher Kenntnisse über deren embryotoxische Wirkung in Tierversuchen und aufgrund vorhandener Daten am Menschen ausgewählt. Sie wurden in die drei Embryotoxizitätsklassen "*nicht embryotoxisch*", "*schwach embryotoxisch*" und "*stark embryotoxisch*" kategorisiert. Bei den Teilnehmern handelt es sich um Laboratorien der Industrie, Universitäten und Behördliche Einrichtungen im Europäischen Raum.



**Abbildung 4:** Struktur der Validierungsstudie. Dargestellt sind die in die Validierungsstudie involvierten Vertrags- und Untervertragsnehmer. Die Untervertragsnehmer berichten dem Hauptvertragsnehmer ZEBET über ihre Ergebnisse, die von ZEBET zusammengefasst und an den Sponsor ECVAM berichtet werden. Die Beziehungen der Institutionen untereinander sind durch Pfeile gekennzeichnet (WEC, Whole Embryo Culture; MM, Micromass; EST, Embryonaler Stammzelltest).

Ziel dieses Projektes war die Entwicklung von Prädiktionsmodellen und die Validierung der drei In-vitro-Embryotoxizitätstests. Im Berichtszeitraum 2000/2001 wurden die letzten praktischen Versuche abgeschlossen und die biometrische Auswertung aller Daten bei ZEBET durchgeführt. Die Publikation mit vergleichenden Ergebnissen der drei In-vitro-Methoden befindet sich im Druck.

## Material und Methoden

### Testchemikalien

Die Testchemikalien der Validierungsstudie sind in **Tabelle 1** dargestellt. Die sechs Testsubstanzen der Phase I der Validierungsstudie, die u.a. die Grundlage zur Berechnung der Prädiktionsmodelle beim MM Test und beim WEC bildeten, sind im Teil A dargestellt, während die 14 Testsubstanzen der Phase II zur Evaluierung im Teil B stehen.

**Tabelle 1: Liste der Testchemikalien der Validierungsstudie**
**a) Phase I: 6 Testsubstanzen**

Testsubstanz	CAS No.	Hersteller	Cat. No.
<b><i>In vivo stark embryotoxisch</i></b>			
hydroxyurea	127-07-1	Sigma	H8627
6-aminonicotinamide	329-89-5	Sigma	AO630
<b><i>in vivo schwach embryotoxisch</i></b>			
boric acid	-	TiHo Hannover	B7660
salicyl acid sodium salt	54-21-7	Sigma	S3007
<b><i>in vivo nicht embryotoxisch</i></b>			
acrylamide	79-06-1	Sigma	A9099
dimethylphthalate	131-11-3	Merck	8.00918

**b) Phase II: 14 Testsubstanzen zur Evaluierung**

Testsubstanz	CAS No.	Company	Cat. No.
<b><i>In vivo stark embryotoxisch</i></b>			
5-bromo-2'-deoxyuridine	59-14-3	Sigma	B9285
methyl mercury chloride	115-09-3	Aldrich	442534
methotrexate	59-05-2	Sigma	A6770
all-trans-retinoic acid	302-79-4	Roche	Dr. H. Bürgin
<b><i>in vivo schwach embryotoxisch</i></b>			
pentyl-4-yn-VPA	-	TiHo Hannover	Prof. H. Nau
valproic acid	99-66-1	Merck	8.14439.0025
lithium chloride	7447-41-8	Sigma	L4408
dimethadione	695-53-4	Sigma	D7631
methoxyacetic acid	625-45-6	Merck	8.21532
<b><i>in vivo nicht embryotoxisch</i></b>			
isobutyl-ethyl-VPA	-	TiHo Hannover	Prof. H. Nau
D-(+)-camphor	464-49-3	Sigma	C9380
diphenhydramine hydrochloride	147-24-0	Sigma	D3630
penicillin G sodium salt	69-57-8	Sigma	PEN-NA
saccharin sodium hydrate	82385-42-0	Sigma	S1002

**Embryonaler Stammzelltest (EST)**

Embryonale Stammzellen (ES-Zellen) der Maus können in Zellkultur mit Hilfe des „Leukemia Inhibitory Factor“ (LIF) im undifferenzierten Stadium kultiviert werden (Williams *et al.*, 1988). Der bei ZEBET entwickelte EST nutzt die Fähigkeit dieser embryonalen Stammzellen, *in vitro* unter definierten Kulturbedingungen ohne die Einwirkung von LIF in spontan kontrahierende Herzmuskelzellen zu differenzieren. Der Einfluss von Testsubstanzen auf die Differenzierung von Herzmuskelzellen, die sich aus ES-Zellen der Linie D3 entwickeln (Kontraktionen, die bei mikroskopischer Auswertung registriert werden), wird verglichen mit dem im MTT-Test ermittelten zytotoxischen Effekt auf ES-Zellen und dem zytotoxischen Effekt auf differenzierte Fibroblasten-Zellen der Maus-Linie 3T3. Die IC<sub>50</sub>-Konzentrationen für die Zytotoxizität und die Differenzierung werden anhand von Konzentrations-Wirkungs-Kurven bestimmt. Dabei dienen die IC<sub>50</sub>-Konzentrationen für den zytotoxischen Effekt auf 3T3-Zellen und ES-Zellen (IC<sub>50</sub>D3, IC<sub>50</sub>3T3) und die IC<sub>50</sub>-Konzentrationen für die Inhibition der Differenzierung (ID<sub>50</sub>) von ES-Zellen zur Klassifizierung der Testsubstanzen in die drei Embryotoxizitätsklassen *nicht*, *schwach*, oder *stark embryotoxisch* mit Hilfe eines Prädiktionsmodells (=PM), das durch Diskriminanzanalyse erstellt wurde.

**Micromass (MM)-Test**

Am Tag 14 der Schwangerschaft werden Ratten die Embryonen entnommen und deren Extremitätenknospen unter dem Mikroskop isoliert. Nach Dissoziation der Zellen werden die-

se in hoher Zelldichte (= Micromass) unter definierten Bedingungen kultiviert, die eine Differenzierung in Knorpelzellen erlauben. Nach sechstägiger Kultur in Gegenwart ansteigender Konzentrationen von Testsubstanzen wird geprüft, ob die embryonalen MM-Zellen eine normale Differenzierung durchlaufen haben. Dies geschieht durch eine für differenzierte Knorpelzellen spezifische Färbemethode mit Alcian Blau. Der Einfluss der Behandlung mit Testsubstanzen auf die Differenzierung der Knorpelzellen wird verglichen mit dem rein zytotoxischen Effekt derselben Testsubstanzen auf die MM-Zellen der Extremitätenknospen, der durch Färbung mit Neutralrot bestimmt wird. Die  $IC_{50}$ -Konzentrationen für die Zytotoxizität und die Differenzierung werden anhand von Konzentrations-Wirkungs-Kurven bestimmt.

#### *Kultur ganzer Rattenembryonen (WEC-Test)*

Trächtigen Rattenweibchen werden am Tag 10 der Schwangerschaft die Embryonen entnommen und unter definierten Bedingungen bei ansteigenden Konzentrationen von Testsubstanzen kultiviert. Eine große Zahl morphologischer und entwicklungsspezifischer Parameter wird zu Beginn und nach 48-stündiger Entwicklung der Embryonen *in vitro* dokumentiert. Den Beobachtungen werden je nach ihrer Ausprägung Zahlenwerte auf einer Skala von 0-6 ("Morphological Score") zugeordnet, die eine quantitative Auswertung der gewonnenen Daten in Konzentrations-Wirkungs-Kurven ermöglichen. Die Summe der Einzelwerte für die verschiedenen "Morphological Scores" werden als "Total Morphological Score" (TMS) erfasst und dienen als Maß für das Stadium der normalen Entwicklung zum Zeitpunkt der Auswertung nach 48 Stunden. Die Spezifität und die Häufigkeit von Missbildungen bestimmter Organe und Organanlagen werden gesondert dokumentiert. Dadurch kann man zwischen spezifischen Effekten der Testchemikalien auf die Entwicklung bestimmter Organe (z. B. des Neuralrohrs) und einer generellen Wachstumsverzögerung (z.B. Kopf-Rumpf Länge) unterscheiden.

#### *Biostatistik*

Die lineare Diskriminanzanalyse wurde verwendet, um diejenigen Variablen zu identifizieren, die die beste Trennung zwischen den drei embryotoxischen Klassen ergab (schrittweise Diskriminanzanalyse). Die schrittweise Diskriminanzanalyse wurde für alle drei *In-vitro*-Tests für die Berechnung der Prädiktionsmodelle (PM) verwendet. Für den WEC wurden zwei PM berechnet. In das zweite Prädiktionsmodell (PM2) wurde zusätzlich als Parameter der Zytotoxizität ein Endpunkt des EST mit integriert. Im Gegensatz zum EST-Test, in dem sowohl die zytotoxischen Eigenschaften einer Substanz auf differenzierte Zellen (zytotoxisches Potential) als auch die Wirkung auf die Differenzierung von ES-Zellen in kontrahierende Herzmuskelzellen (embryotoxisches Potential) berücksichtigt werden, wird im WEC-Test kein zytotoxischer Endpunkt bestimmt. Da offensichtlich eine Stärke des EST in dieser zusätzlichen Information liegt, wurde PM2 entwickelt, bei dem neben den Variablen aus dem WEC-Test zusätzlich ein Endpunkt des EST in die schrittweise Diskriminanzanalyse integriert wurde.

Als höchste zu testende Konzentration wurden 1000µg/ml festgelegt. Falls bei dieser Konzentration kein  $IC_{50}$  bzw.  $ID_{50}$  Wert erreicht wird, wird per Definition der  $IC_{50}$ - bzw.  $ID_{50}$ -Wert auf 1000µg/ml gesetzt. Die Konsequenz ist, dass zukünftig die höchste zu testende Konzentration 1000µg/ml ist.

#### **Ergebnisse**

Zur Definition von biostatistisch fundierten Vorhersagemodellen wurde eine Zwischenauswertung verwendet, die auf den Ergebnissen der Prävalidierung und den ersten sechs Testsubstanzen der Phase I der Validierungsstudie beruhte. Für den Embryonalen Stammzelltest lag aus einer weiteren Prävalidierungsstudie bereits ein optimiertes Vorhersagemodell (Prädiktionsmodell) vor. Die korrekte Klassifizierung lag bei 93% aller Experimente. Für den MM-

Test lag die korrekte Einstufungsrate mit der Lernstichprobe bei knapp 80%, für den WEC bei 72% für PM1 und 88% für PM2, also deutlich niedriger als mit dem EST (**Tabelle 3a**).

Es muss aber berücksichtigt werden, dass die Modelle auf unterschiedlichen Testchemikalien beruhen. Darüber hinaus führt die Klassifizierung der Lernstichprobe zu einer zu optimistischen Schätzung, da das PM der Lernstichprobe angepasst wird. Deshalb wurden die Prädiktionsmodelle mit den verbleibenden 14 Testchemikalien der formalen Validierung geprüft bzw. bestätigt, um eine realistischere Schätzung der Güte der PM zu erhalten. In **Tabelle 2** sind die Klassifizierungsergebnisse der drei In-vitro-Embryotoxizitätstests für die 14 Testchemikalien angegeben.

**Tabelle 2: Klassifizierungsergebnisse des EST, MM Test und WEC von 14 Testsubstanzen zur Evaluierung (Phase II)**

<i>In vivo</i>	Anzahl der Testchemikalien	Anzahl der Experimente	Prädiktion		
			nicht	schwach	stark
<b>EST</b>					
nicht embryotoxisch	5	40	<b>28</b>	12	0
schwach embryotoxisch	5	40	7	<b>33</b>	0
stark embryotoxisch	4	32	4	2	<b>26</b>
<b>MM test</b>					
nicht embryotoxisch	5	40	<b>32</b>	8	0
schwach embryotoxisch	5	40	16	<b>24</b>	0
stark embryotoxisch	4	32	8	2	<b>22</b>
<b>WEC PM1</b>					
nicht embryotoxisch	5	20	<b>14</b>	2	4
schwach embryotoxisch	5	20	11	<b>9</b>	0
stark embryotoxisch	4	16	0	1	<b>15</b>
<b>WEC PM2</b>					
nicht embryotoxisch	5	20	<b>16</b>	4	0
schwach embryotoxisch	5	20	7	<b>13</b>	0
stark embryotoxisch	4	16	0	0	<b>16</b>

Wie zu erwarten schwächte sich diese Einstufungsrate mit den 14 Stoffen der Validierungsstudie zur Evaluierung leicht ab. Es zeigte sich, dass in etwa 70% aller Experimente (MM Test und PM1 WEC) bzw. in etwa 80% aller Experimente (EST und PM2 WEC) die Testsubstanzen korrekt in die drei Embryotoxizitätsklassen eingestuft wurden (**Tabelle 3b**).

Das Management Team der Studie hatte sowohl für die korrekte Klassifizierung als auch für die Prädiktivität und Identifizierung der Substanzen Bewertungskriterien erarbeitet. Mit einbezogen wurde der Wert einer zufälligen richtigen Klassifizierung, der bei drei Klassen 33% beträgt, während bei einer Klassifizierung in zwei Klassen 50% zufällig richtig klassifiziert werden. So wurden alle Klassifizierungen, die unter 65% lagen, als ungenügend eingestuft. Als ausreichend wurden richtige Klassifizierungen eingeschätzt, die mindestens 65% betragen, aber unter 75% lagen. Eine richtige Einstufung von mindestens 75% kann als gut bezeichnet werden, und ab 85% wurde die richtige Klassifizierung als exzellent bewertet. Die Bewertungskriterien sind in **Tabelle 3c** dargestellt.

Die Identifizierung stark embryotoxischer Substanzen ist exzellent mit PM1 und PM2 des WEC, gut mit dem EST und ausreichend mit dem MM Test. Die Prädiktivität der stark embryotoxischen Substanzen ist bei allen drei In-vitro-Tests exzellent, mit Ausnahme des PM1 des WEC, mit dem nur eine gute Prädiktivität erreicht wird.

Ungenügende Klassifizierungen wurden nur mit dem MM Test und dem PM1 des WEC erreicht. Bei beiden betrafen die Mängel die Prädiktivität der nicht embryotoxischen Substanzen und die Identifizierung der schwach embryotoxischen Substanzen. Insgesamt erzielten der EST und das PM2 des WEC gute Ergebnisse bei der Klassifizierung aller Testchemikalien, während der MM Test und das PM2 des WEC nur ausreichende Ergebnisse erzielten.

Tabelle 3: Zusammenfassung der Klassifizierungsergebnisse und Bewertung

**a) Prädiktionsmodelle (unterschiedliche Datenbasis)**

Zusammenfassung	EST	MM	WEC	
			PM1	PM2
Korrekte Klassifizierung (%)	93	79	72	88

**b) Evaluierung mit 14 Testsubstanzen der Validierung (Phase II)**

Zusammenfassung	EST	MM	WEC	
			PM1	PM2
Prädiktivität für nicht embryotoxische Substanzen (%)	72	57	56	70
Prädiktivität für schwach embryotoxische Substanzen (%)	70	71	75	76
Prädiktivität für stark embryotoxische Substanzen (%)	100	100	79	100
Identifizierung der nicht embryotoxischen Substanzen (%)	70	80	70	80
Identifizierung der schwach embryotoxischen Substanzen (%)	83	60	45	65
Identifizierung der stark embryotoxischen Substanzen (%)	81	69	94	100
Korrekte Klassifizierung (%)	78	70	68	80

**c) Bewertung**

Bewertung	Anteil der korrekten Klassifizierung
zufällig	= 33%
ungenügend	< 65%
ausreichend	≥ 65%
gut	≥75%
exzellent	≥85%

**3.9.3.2 EU Kommission akzeptiert In-vitro-Phototoxizitätstest als erste experimentell validierte tierversuchsfreie Prüfmethode in der Sicherheitstoxikologie**

Am 4. Februar 2000 haben die zuständigen Behörden der Europäischen Union eine tierversuchsfreie Methode zur Prüfung der Phototoxizität von chemischen Substanzen offiziell akzeptiert. Dieser In-vitro-Phototoxizitätstest wurde unter Federführung der ZEBET in enger Zusammenarbeit mit den wichtigsten Firmen der europäischen Kosmetikindustrie bzw. dem Verband der Hersteller von Kosmetika (COLIPA) in Brüssel entwickelt. Damit steht nun erstmals eine validierte und innerhalb der Europäischen Union amtlich anerkannte Methode zur Prüfung der Phototoxizität zur Verfügung.

In Tests zur Phototoxizität wird untersucht, wie sich chemische Stoffe unter dem Einfluss von Licht auf die Gesundheit auswirken. Ein chemischer Stoff wird dann als phototoxisch bezeichnet, wenn es nach dem Auftragen oder der Einnahme des Stoffes zu Rötungen, Schwellungen oder anderen Reaktionen bzw. Schädigungen der Haut oder anderer Organe kommt, die dem Licht und der Sonne ausgesetzt sind.

Die Prüfung der Phototoxizität ist bei Arzneimitteln und solchen Substanzen erforderlich, die in kosmetischen Mitteln als Sonnenschutzfilter verwendet werden. Bisher wurden von den Herstellern im Bereich der kosmetischen Mittel zwar Angaben zur Phototoxizität der eingesetzten Substanzen verlangt; es war aber keine Prüfmethode vorgeschrieben. In der Praxis erfolgte üblicherweise die phototoxische Prüfung in Tierversuchen. Mäuse, Ratten, Meer-schweinchen oder Kaninchen wurden dabei mit Prüfsubstanzen behandelt und dann mit UV-Licht an der rasierten Haut bestrahlt.

Bei der tierversuchsfreien Methode des BgVV werden Zellen von Mäusen oder der menschlichen Haut während der Kultivierung im Brutschrank mit Prüfsubstanzen behandelt und mit UV-Licht bestrahlt. Überraschenderweise sagt der BgVV-Zellkulturtest phototoxische Reaktionen beim Menschen erheblich besser vorher als die Tierversuche. Für die sicherheitstoxikologische Risikoabschätzung beim Menschen ist somit der neue Zellkulturtest sehr viel besser geeignet als der Tierversuch. Außerdem ist er billiger und sehr viel rascher durchzuführen. Weltweit setzt die kosmetische Industrie den neuen Test bereits zur Prüfung der Unbedenklichkeit von UV-Filterstoffen in Sonnenschutzmitteln ein.

Trotz der guten Übereinstimmung der Ergebnisse, die der Zellkulturtest im Vergleich mit den am Menschen beobachteten Wirkungen erbrachte, musste der neue Test in einer großen Zahl von Laboratorien der Kosmetikindustrie in Europa, Japan und den USA auf seine Zuverlässigkeit geprüft werden. Die Prüfung hatte unter blinden Bedingungen mit codierten Prüfsubstanzen zu erfolgen. Diese Art der experimentellen Überprüfung der Zuverlässigkeit einer neuen Prüfmethode für den Verbraucherschutz heißt Validierung. Sie ist international vorgeschrieben. Erst wenn die Validierung abgeschlossen ist, wird eine neue Prüfmethode von den für den Verbraucherschutz zuständigen Behörden international anerkannt. Die Ergebnisse dieser eingehenden experimentellen Validierung sind nunmehr von der zuständigen Behörde in Brüssel, der Generaldirektion für Umwelt, Reaktorsicherheit und Chemikalien (DG E) positiv bewertet und damit offiziell akzeptiert worden.

Zugelassene sicherheitstoxikologische Prüfmethoden sind im Anhang V der Gefahrstoffverordnung für die Einstufung, Kennzeichnung und Verpackung gefährlicher Güter verzeichnet (EU Direktive 67/548/EEC). Am 4. Februar 2000 haben die Vertreter der 15 EU-Mitgliedstaaten der 27. Änderung der EU-Gefahrstoffverordnung zugestimmt. Durch diese Änderung wurden zum ersten Mal tierversuchsfreie, sogenannte "Alternativmethoden" in den Anhang V der Gefahrstoffverordnung aufgenommen. Es handelt sich dabei um den In-vitro-Phototoxizitätstest des BgVV sowie zwei Methoden zur Prüfung chemischer Stoffe auf Ätzwirkung an der Haut, bei denen künstliche menschliche Haut bzw. Rattenhaut verwendet wird. Diese Prüfungen führten zu dem Ergebnis, dass alle Sicherheitsansprüche des Verbraucher- und Arbeitsschutzes garantiert werden. Aufgrund der EU-Direktive 86/609/EEC zum Schutz von Versuchstieren dürfen nach der formellen Bestätigung durch das Europaparlament und sechs Monate nach der Veröffentlichung dieser Änderung im Amts- bzw. Gesetzblatt der EU in EU-Mitgliedstaaten bei der Testung der Phototoxizität von Substanzen für kosmetische Mittel und Arzneimittel sowie bei Testungen der Ätzwirkung an der Haut durch Chemikalien keine Tierversuche mehr durchgeführt werden. Fällt der In-vitro-Test auf Ätzwirkung negativ aus, sind jedoch weiterhin Tierversuche zur Prüfung der Reizwirkung von Chemikalien notwendig.

Wissenschaftlich markiert die Zellkulturmethode einen weiteren Neuanfang, da diese neue Methode über die üblichen Tierversuche hinaus in der Lage ist, toxische Wirkungen am Menschen mit großer Sicherheit vorherzusagen. Für den Tierschutz und den Verbraucherschutz in Deutschland und Europa, aber auch für das BgVV ist dieser Erfolg ein ermutigender Durchbruch. Das Institut konnte am Beispiel der Phototoxizität erstmals zeigen, dass es möglich ist, mit Hilfe experimentell validierter Zellkulturmethoden das Risiko für den Menschen richtig abzuschätzen.

### 3.9.3.3 Behördliche Anerkennung von zwei Alternativmethoden durch die OECD 2001

Nach der EU empfiehlt auch die OECD die beiden In-vitro-Toxizitätstests, die bei ZEBET entwickelt wurden, nämlich den 3T3-NRU-In-vitro-Phototoxizitätstest und den Test zur Prüfung auf Ätzwirkung an der Haut.

Zwei Tierversuchsmodelle, die bisher international für die Prüfung von Arzneimitteln, Chemikalien und auch von Kosmetika vorgeschrieben waren, werden voraussichtlich bald weltweit durch diese tierversuchsfreien Tests ersetzt. Expertengremien der OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) haben den OECD-Mitgliedstaaten auf einer Sitzung vom 30.10.-2.11. 2001 im BgVV den Ersatz der Tierversuche empfohlen. Es ist damit zu rechnen, dass dies zu einer raschen Anerkennung der Tests durch diese Staaten und in der Folge zu einer weltweiten Anerkennung dieser Prüfmethoden führen wird. Nach einer Anerkennung durch die OECD dürfen in diesen Staaten dann zur Prüfung von Substanzen auf Phototoxizität und Ätzwirkung an der Haut keine zusätzlichen Tierversuche mehr durchgeführt werden.

Die Prüfung auf Ätzwirkung an der Haut ist für gefährliche Stoffe international im Rahmen des Arbeitsschutzes und der Transportsicherung vorgeschrieben und hat direkte Konsequenzen für die Kennzeichnung, die Aufbewahrung, den Transport gefährlicher Güter und den Arbeitsschutz (Handschuhe, Schutzbrille etc.). Die Zustimmung des Vertreters der internationalen Transportkommission GESAMP während des OECD-Expertentreffens dürfte zu einem weltweiten Verbot der bisherigen, belastenden Tierversuche mit ätzenden Stoffen am Kaninchen führen.

## 3.9.4 Forschung und Forschungsförderung

### 3.9.4.1 BMBF- Verbundprojekt: "Weiterentwicklung eines In-vitro-Embryotoxizitätstests mit embryonalen Stammzellen: Verwendung molekularer Marker zur Erfassung verschiedener Differenzierungsendpunkte – Teilprojekt 1"

Seit Oktober 2000 führt ZEBET in Kooperation mit Firmen der deutschen Arzneimittel-Industrie ein Forschungsvorhaben zur Weiterentwicklung eines In-vitro-Embryotoxizitätstests mit embryonalen Stammzellen der Maus (Embryonaler Stammzelltest, EST) durch.

Dieser Test, der in den letzten Jahren bei ZEBET entwickelt wurde, basiert auf der Fähigkeit embryonaler Stammzellen (ES-Zellen) der Maus, in vitro in rhythmisch kontrahierende Herzmuskelzellen zu differenzieren, die mikroskopisch detektiert werden können. Im Vergleich zu anderen In-vitro-Säugetier-Modellen kann somit auf den Einsatz trächtiger Tiere zur Gewinnung embryonaler Gewebe vollkommen verzichtet werden. Mit dem EST wird der Einfluss von teratogenen und embryotoxischen Testchemikalien auf die Differenzierung von embryonalen Stammzellen in kontrahierende Herzmuskelzellen untersucht. Diese Ergebnisse werden in Relation zum zytotoxischen Effekt der Substanzen auf ES-Zellen und auf differenzierte Zellen (3T3 Maus-Fibroblasten) bewertet. Anhand von Konzentrations-Wirkungskurven werden Halbhemmkonzentrationen ( $ID_{50}$ ,  $IC_{50}$ ) bestimmt, die die Klassifizierung der Testsubstanzen in die drei Embryotoxizitätsklassen „nicht, schwach oder stark“ embryotoxisch gestatten. Die Klassifizierung erfolgt mit einem biostatistischen Prädiktionsmodell.

Im Rahmen des Verbundprojektes soll der Test in Kooperation mit der Bayer AG, der Schering AG und Boehringer Ingelheim Pharma KG dahingehend weiterentwickelt werden, dass neben der Herzmuskelzellendifferenzierung zusätzliche toxikologisch relevante Endpunkte der Embryonalentwicklung möglichst frühzeitig erfasst werden können. Diese sollen die Differen-

zierungen in weitere Gewebe wie z.B. die neuronale Differenzierung, Angiogenese und Vaskulogenese sowie die Differenzierung zu Knorpel- und Knochengewebe einschließen. Durch die Erfassung der Differenzierungsendpunkte mit den Methoden der Genshiptechnologie, der TaqMan-PCR und der FACS-Analyse (FACS=Fluorescence-activated Cell Sorter) soll die Weiterentwicklung zur Etablierung eines standardisierten und teilautomatisierten Tests führen, der eine verlässliche Vorhersage embryotoxischer Wirkungen für ein breites Spektrum chemischer Stoffklassen zulässt. Die Anwendung des In-vitro-Systems in der Reproduktionstoxikologie würde Tierversuche in großem Maßstab reduzieren bzw. ersetzen. Im Teilprojekt 1 des BgVV werden die Differenzierungsendpunkte auf der Ebene der Proteine mit Hilfe der FACS-Analyse untersucht bzw. quantitativ bestimmt.

## Methodik

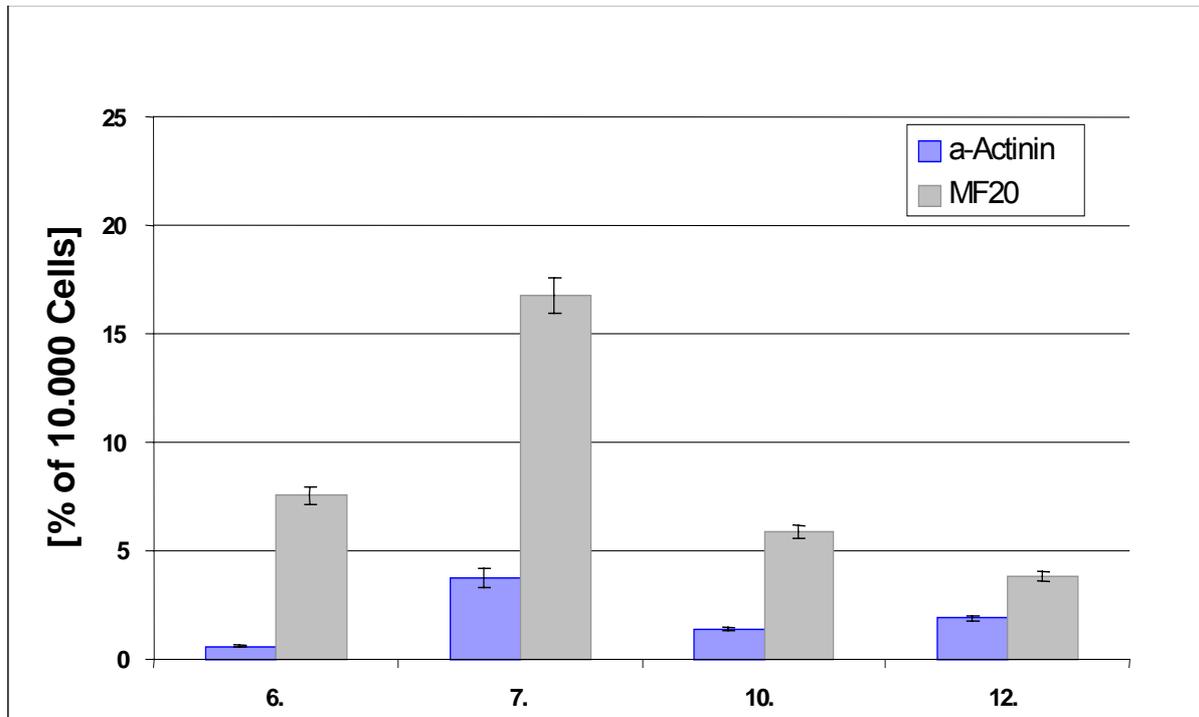
Die FACS-Analyse bietet die Möglichkeit, die Expression bestimmter Gene anhand des exprimierten Proteins quantitativ und schnell zu bestimmen. Dazu werden die Zellen mittels spezifischer Antikörper gegen intrazelluläre Proteine mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert und einzeln an einem Lichtstrahl vorbeigeleitet. Die Zellen senden, da sie fluoreszenzmarkiert sind, charakteristische Lichtsignale aus. Mit Hilfe von Photodetektoren werden die Lichtstreuung und die Fluoreszenzintensität der Zellen quantifiziert.

## Ergebnisse

Im Berichtszeitraum 2000/2001 wurde im ZEBET-Labor ein standardisiertes Testprotokoll (SOP) zur Erfassung der Herzmuskelzellendifferenzierung mittels der FACS-Analyse erarbeitet. Methoden zur Dissoziation, Fixierung und Permeabilisierung der differenzierten Herzmuskelzellen, sowie der intrazellulären Markierung und Detektion strukturspezifischer Proteine mittels monoklonaler Antikörper (MAK) für die quantitative Bestimmung in der FACS-Analyse konnten etabliert werden. Zur Erfassung der Herzmuskelzellendifferenzierung kamen monoklonale Antikörper gegen die Strukturproteine  $\alpha\beta$ -MHC (*Myosin Heavy Chain*),  $\alpha$ -Actinin und sarcomeric MHC (MF20) zum Einsatz. Zur Optimierung der Testdauer haben wir den zeitlichen Verlauf der Herzmuskelzellendifferenzierung anhand der beiden Markerproteine  $\alpha$ -Actinin und Myosin Heavy Chain (MF20) über einen Zeitraum von insgesamt zwölf Tagen mittels FACS-Analysen untersucht (**Abbildung 5**). Das stärkste Signal für beide Markerproteine wurde am Tag 7 der Differenzierung beobachtet, wobei mit dem Antikörper MF20 im Durchschnitt 17% von 10.000 Zellen positiv waren und mit dem Antikörper gegen das  $\alpha$ -Actinin der Anteil positiver Ereignisse bei 4.5% lag. Um die Anwendbarkeit des neuen Endpunktes zu untersuchen, wurden erste Versuche mit bekannten standard-positiven und standard-negativen Testsubstanzen (5-Fluorouracil, all-*trans*-Retinsäure, Penicillin G) durchgeführt und die Wirkung der Substanzen anhand der Expression der Strukturproteine  $\alpha$ -Actinin und sarc. MHC geprüft. Die Ergebnisse zeigten, dass die FACS-Analysen zu aussagekräftigen Konzentrations-Wirkungskurven führen. Die ermittelten Halbhemmkonzentrationen ( $ID_{50}$ -Werte) wurden in die drei linearen Diskriminanzfunktionen des validierten Prädiktionsmodells eingesetzt. Die Ergebnisse der Klassifizierungen zeigten eine korrekte Einstufung der Einzelexperimente für beide untersuchten Zeitpunkte (Tag 7 und Tag 10 der Differenzierung). Somit konnte für alle drei getesteten Prüfsubstanzen das embryotoxische Potential richtig vorhergesagt werden, und zwar für beide Methoden zur Bestimmung der  $ID_{50}$ -Werte (FACS / Mikroskop) und für die beiden gemessenen Zeitpunkte (Tag 7 und Tag 10 der Differenzierung, **Abbildung 6**). Diese ersten Ergebnisse wurden 2001 auf vier internationalen Kongressen in Europa und den USA vorgestellt und 2001 und 2002 publiziert.

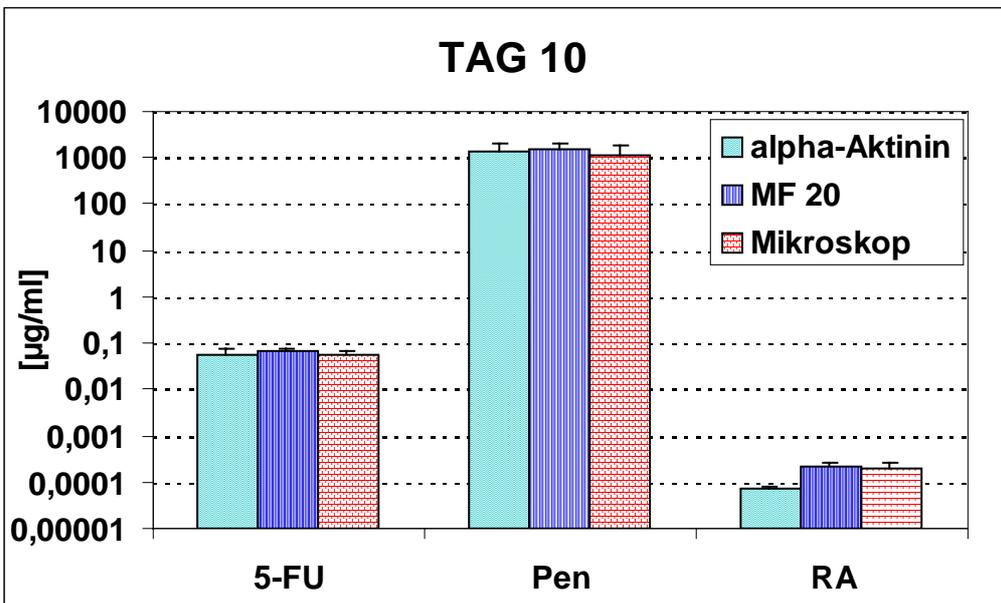
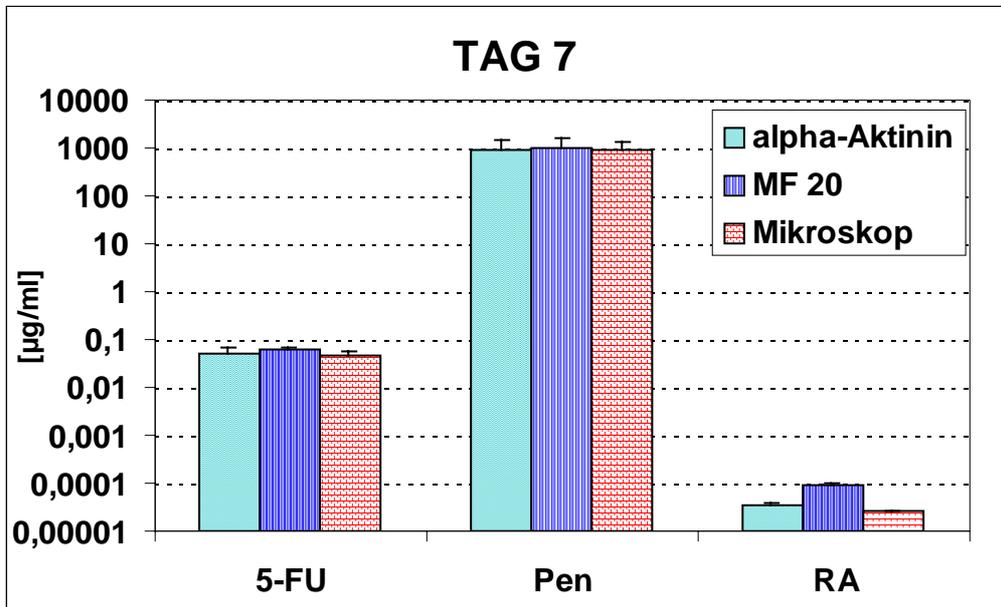
**Abbildung 5: Zeitlicher Verlauf der Herzmuskelzelldifferenzierung gemessen am Tag 6, 7, 10, und 12 der Differenzierung.**

24 EBs wurden gepoolt, eine Einzelzellsuspension hergestellt und geteilt. Die Hälfte der Zellen wurde mit dem mAB *anti-alpha-Aktinin* (EA-53), die andere Hälfte der Zellen mit dem mAB *anti-Sarcomeric Myosin Heavy Chain* (*anti-MHC*, MF20) markiert und im FACS (Dot Plot Analyse) der prozentuale Anteil positiver Ereignisse quantifiziert. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus vier unabhängigen Experimenten.



Zeit [d]  
 n=4 ± SEM

**Abbildung 6: Vergleichende Darstellung der ID<sub>50</sub>-Werte,** ermittelt mit der mikroskopischen Erfassung und der FACS-Analyse für alle drei getesteten Substanzen und die beiden gemessenen Zeitpunkte, Tag 7 und Tag 10 der Differenzierung. Die dargestellten ID<sub>50</sub>-Werte sind Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Experimenten ± der Standardabweichung (SE).



Zur Erfassung weiterer gewebespezifischer Endpunkte wurden im Labor der Bayer AG Protokolle für die Nerven-, Knochen- und Knorpelzellendifferenzierung erarbeitet und in die Labore der Kooperationspartner transferiert. Ziel unserer weiterführenden Arbeiten wird die Etablierung und Optimierung der neuen Differenzierungsprotokolle und die Entwicklung von FACS-Methoden zur Quantifizierung der neuen Gewebe sein.

Andrea Seiler, Anke Visan, Ingeborg Pohl, Elke Genschow, Roland Büsen, Horst Spielmann

### 3.9.4.2 BMBF-Projekt: „Primordiale Keimzellen der Maus als In-vitro-Modell zur Erfassung von Fertilitätsbeeinträchtigungen“

Mit der 7. Änderung der EG-Richtlinie 67/548 in das nationale Gesetz zum Schutz vor gefährlichen Stoffen (ChemG) und der neuen MAK- und BAT-Werte Liste 2000 wurden die Prüfanforderungen um die Prüfung auf keimzellmutagene Eigenschaften erweitert. Regulatorisch akzeptierte In-vivo-Testsysteme zur Abschätzung stadienspezifischer Mutagenität sind der sogenannte „Dominante Letaltest (DL)“ und der „Spezifische-Lokus-Test (SL)“ mit Mäusen. Ein In-vitro-Testsystem zur Beurteilung der Keimzellmutagenität, insbesondere hinsichtlich geschlechtsspezifischer Effekte eines Mutagens, steht zur Zeit jedoch noch nicht zur Verfügung.

Ziel dieses Projektes ist die Entwicklung und Etablierung eines In-vitro-Prüfverfahrens auf für Keimzellen mutagene Eigenschaften mit Hilfe von permanenten männlichen und weiblichen embryonalen Keimzelllinien der Maus. Nach erfolgreicher Etablierung und genetischer Charakterisierung der embryonalen Keimzelllinien vom Balb/cJ Mausstamm wurden im Berichtszeitraum 2000/2001 Zytotoxizitätsstudien (MTT-Test) und Genotoxizitätsprüfungen (SCE-Indikatorstest) anhand positiver Standard-Referenzmutagene und Negativkontrollen durchgeführt.

#### Material und Methoden

##### *Testchemikalien*

Als Standard-Referenzmutagene wurden Ethylnitrosoharnstoff (ENU, CAS-No 759-73-9), Methylnitrosoharnstoff (MNU, CAS-No 684-93-5), Methylmethansulfonat (MMS, CAS-No 66-27-3), Hydroxyharnstoff (HU, CAS-No 127-07-1) und Mitomycin C (MMC, CAS-No 50-07-7) verwendet. Penicillin G (CAS-No 69-57-8), Saccharin (82385-42-0) und L-Ascorbinsäure (CAS-No 134-03-2) dienten dagegen als Negativkontrollen.

#### MTT Zytotoxizitätstest

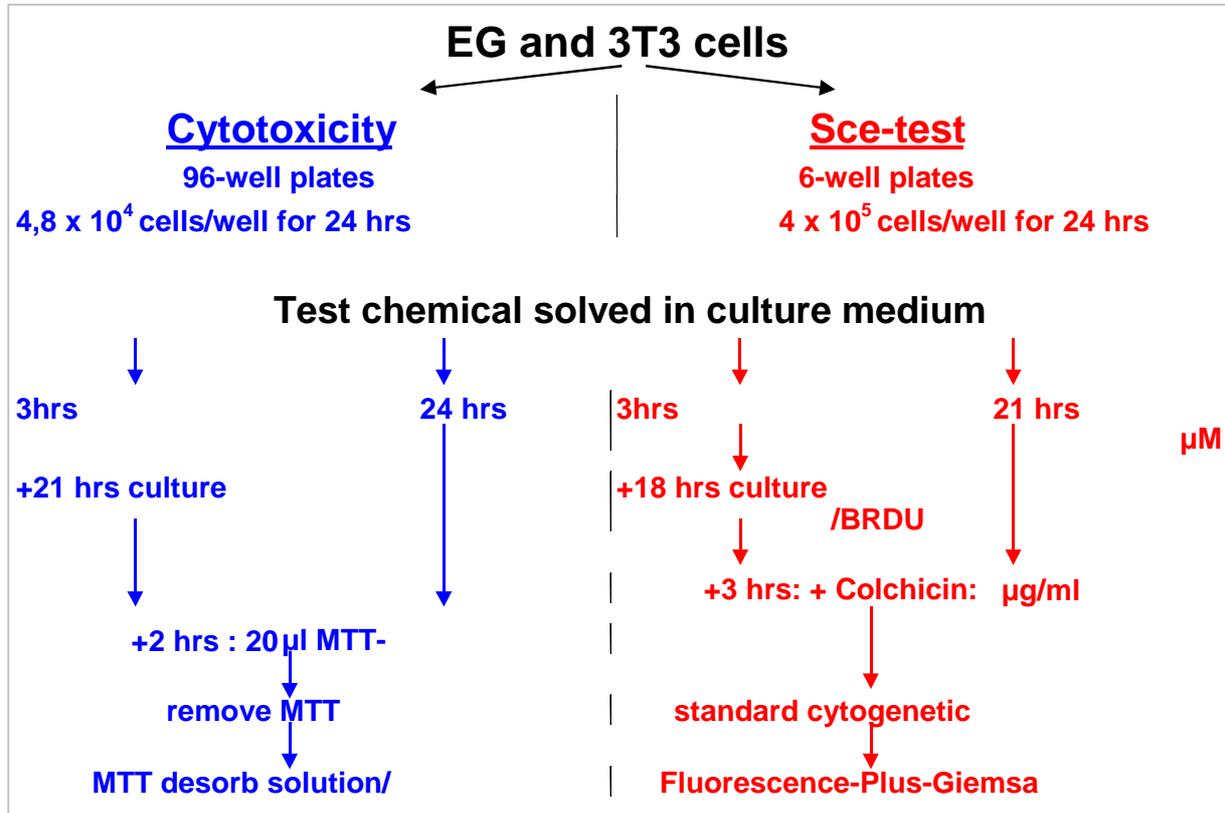
Zur Bestimmung der zytotoxischen Effekte verschiedener Testsubstanzen auf die weibliche Keimzelllinie EG<sub>3</sub> und die 3T3-Fibroblastenzellen wurde der 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl-Tetrazolium-Bromid-Test (MTT) in Abwesenheit von LIF durchgeführt (**Abbildung 7**). Dazu wurden 4.8 x 10<sup>4</sup> Zellen/200 µl Medium pro Vertiefung einer 96-well Mikrotiterplatte ausgesät und durch 24stündige Vorkultur bis zur exponentiellen Wachstumsphase gebracht. In standardisierten Protokollen erfolgte die Substanzzugabe für 3 bzw. 24 Stunden in jeweils acht verschiedenen Konzentrationen und sechs Replikaten, Lösungsmittelkontrollen wurden vergleichend erfasst. Die höchste Testkonzentration ergab sich aus der Toxizität bzw. Löslichkeit der Testsubstanzen. Als zytotoxischer Endpunkt wurde der IC<sub>50</sub>-Wert sowohl für EG<sub>3</sub> - als auch 3T3-Zellen als Halbhemmkonzentration des Zellwachstums aus den entsprechenden Konzentrations-Wirkungskurven quantitativ mittels ELISA-Reader ermittelt.

#### SCE Genotoxizitätstest

Die etablierten EG<sub>3</sub>- und 3T3-Zellen wurden wiederum in der exponentiellen Wachstumsphase der Testsubstanz in fünf verschiedenen Konzentrationen im Doppelansatz für 3 bzw. 24 Stunden ausgesetzt (**Abbildung 7**). Der Nachweis des Schwesterchromatid-Austauschs (OECD-Richtlinie 479) erfolgte durch BrdU-Einbau (10<sup>-5</sup> M BrdU) und anschließender färberischer Differenzierung der unterschiedlich stark substituierten Chromatiden mittels Fluoreszenz-plus-Giemsa-Technik (FPG) (Perry and Wolff, 1985). Als genotoxischer Endpunkt wur-

de der SCE<sub>200</sub>-Wert aus den Konzentrations-Wirkungskurven der *genotoxischen* und *nicht-genotoxischen* Testsubstanzen ermittelt.

**Abb. 7: Schematischer Ablauf von MTT-Zytotoxizitätstest und SCE-Genotoxizitätstest**



## Ergebnisse

Im Zeitraum 1998 bis 2000 wurden in unserem Labor vier embryonale Keimzelllinien (EGC) und drei embryonale Stammzelllinien (ESC) vom Balb/c Mausstamm etabliert. Zur Analyse von Inzuchtstamm-Divergenzen wurde außerdem eine EGC-Linie vom C57BL/6-Mausstamm etabliert. Bei der Geschlechtsbestimmung mit Hilfe exponentieller DNA-Amplifikation durch Polymerase Kettenreaktion (PCR) haben wir sowohl männliche (EG<sub>5</sub> und ES<sub>1-2</sub>) als auch weibliche (EG<sub>2-4</sub> und ES<sub>3</sub>) embryonale Keimzelllinien und Stammzelllinien des BALB/cJ Mausstamm identifiziert. Bei der zusätzlichen Keimzelllinie vom C57BL76-Mausstamm handelt es sich um eine weibliche Zelllinie (EG<sub>1</sub>). Die ausgewählten Zelllinien ES<sub>1</sub>, EG<sub>1</sub>, EG<sub>3</sub> und EG<sub>5</sub> wurden hinsichtlich der Langzeitstabilität von Karyotyp (> 40 Passagen), Verdopplungszeit und Vitalität eingehend charakterisiert, und es erfolgte eine monatliche Überprüfung der embryonalen Zelllinien auf ihre „Undifferenziertheit“ mittels AP-Test (AP=kalische Phosphatase).

Nach der erfolgreichen Etablierung und genetischen Charakterisierung der embryonalen Keimzelllinien wurden Zytotoxizitätsstudien (MTT-Test) und Genotoxizitätsprüfungen (SCE-Indikatortest) anhand positiver Standard-Referenzmutagene und Negativkontrollen durchgeführt. Die weibliche EG<sub>3</sub>-Keimzelllinie reagierte wesentlich sensibler hinsichtlich der gewählten zytotoxischen und genotoxischen Endpunkte als die zum Vergleich getesteten 3T3-Mausfibroblastenzellen. Sie wurde daher zur Entwicklung eines In-vitro-Klassifizierungsmodells auf der Grundlage genotoxischer und nicht-genotoxischer In-vivo-Daten eingesetzt.

In Anwendung der linearen Diskriminanzanalyse wurden drei Endpunkte zur korrekten Klassifizierung (100 %) der Testsubstanzen ermittelt: der SCE<sub>200</sub>-Wert (Verdopplung der SCE-Rate) der Keimzelllinie EG<sub>3</sub> im 3- und 24-Stunden-Ansatz (**Tabelle 4**) und der IC<sub>50</sub> Wert der EG<sub>3</sub> Zellen nach dreistündiger Substanzzugabe (**Tabelle 5**). Diese ersten Ergebnisse wurden im Jahr 2000 auf zwei internationalen Kongressen vorgestellt und konnten im Jahr 2001 publiziert werden (Klemm et al., 2001a und 2001 b). Die mit der weiblichen Keimzelllinie EG<sub>3</sub> dargestellten Untersuchungen wurden im Jahr 2001 mit der neuen, erfolgreich etablierten und inzwischen charakterisierten männlichen Keimzelllinie EG<sub>6</sub> wiederholt, um der Frage eventueller geschlechtsspezifischer Keimzell-Mutagenität näher zu kommen.

Martina Klemm, Christa Barrabas, Elke Genschow,  
 Ingeborg Pohl, Manfred Liebsch, Andrea Seiler, Horst Spielmann

Tabelle 4: Ergebnisse von jeweils zwei Zytotoxizitätstests mit EG<sub>3</sub>- und 3T3-Zellen (IC<sub>50</sub>-Mittelwerte ± SD) mit fünf positiven Stoffen und drei nicht genotoxischen Kontrollen, jeweils bei drei und 24 Stunden Expositionszeit

Testsubstanz	IC <sub>50</sub> (µg/ml), arithm. Mittel ± Standardabweichung			
	EG <sub>3</sub>		3T3	
	3Std	24Std	3Std	24Std
Mitomycin C (MMC)	3.15 ± 1.20	0.78 ± 0.11	>50 *	40 ± 25.5
Methylmethansulfonat (MMS)	52.0 ± 22.6	19 ± 4.2	143 ± 3.5	59.5 ± 10.6
Hydroxyharnstoff (HU)	148 ± 10.6	29 ± 1.41	>3000 *	>3000 *
Methylnitrosoharnstoff (MNU)	665 ± 49.5	255 ± 63.6	>750 *	>750 *
Ethylnitrosoharnstoff (ENU)	790 ± 14	313 ± 3.54	>1000 *	>1000 *
Ascorbinsäure	>1000 *	860 ± 141	285 ± 63.6	200 ± 70.7
Penicillin G	>3000 *	>3000 *	>3000 *	975 ± 35.4
Saccharin	>15000 *	12750 ± 354	>15000 *	7250 ± 354

\* Kein IC<sub>50</sub>-Wert bis zur höchsten Testkonzentration ermittelbar (limitierender Faktor: Substanzlöslichkeit)

Tabelle 5: Ergebnisse von jeweils zwei SCE-Genotoxizitätstests mit der EG<sub>3</sub>-Zelllinie (Endpunkt: SCE<sub>200</sub>, Mittelwerte ± SD) mit fünf positiven Stoffen und drei nicht genotoxischen Kontrollen, jeweils bei drei und 24 Stunden Exposition

Testsubstanz	SCE <sub>200</sub> Wert EG <sub>3</sub> (µg/ml)	
	arithmetisches Mittel ± Standardabweichung	
	3 Std	24 Std
Mitomycin C (MMC)	0.0095 ± 0.0007	0.0014 ± 0.0006
Methylmethansulfonat (MMS)	0.225 ± 0.15	0.16 ± 0.03
Ethylnitrosoharnstoff (ENU)	3.475 ± 0.035	4.25 ± 3.32
Hydroxyharnstoff (HU)	12.75 ± 3.18	2.15 ± 0.64
Methylnitrosoharnstoff (MNU)	30 ± 29.7	22.5 ± 6.36
Ascorbinsäure	> 1000 *	> 1000 *
Penicillin G	> 3000 *	> 3000 *
Saccharin	> 15000 *	> 15000 *

\* Kein SCE<sub>200</sub>-Wert bis zur höchsten Testkonzentration ermittelbar (limitierender Faktor: Substanzlöslichkeit)

### 3.9.4.3 Vorbereitung einer Validierungsstudie in Zusammenarbeit mit dem Validierungszentrum der US-Bundesbehörden ICCVAM über In-vitro-Methoden zur Bewertung der akuten systemischen Toxizität

Auf dem ICCVAM-Workshop über In-vitro-Methoden zur Bewertung der akuten systemischen Toxizität im Oktober 2000 in Arlington, Virginia (USA), wurde der sofortige Einsatz des Registers der Zytotoxizität (RC) beschlossen. Vor Beginn eines Tierversuches (in vivo) zur Bestimmung des LD<sub>50</sub> wird mit einem Zytotoxizitätstest die Startdosis für den Tierversuch bestimmt. Das Ziel ist die Überprüfung der RC-Methode in der Praxis. Darüber hinaus wurde als mittelfristige Maßnahme die Durchführung einer Validierungsstudie beschlossen, deren Ziel eine direkte Vorhersage der LD<sub>50</sub> mit Hilfe von Zytotoxizitätsdaten sowie die Einstufung in Giftigkeitsklassen ist.

#### Einleitung

Durch die Initiative der amerikanischen Umweltbehörde EPA (Environmental Protection Agency) müssen in den USA bis zum Jahr 2004 für ca. 1500 Altstoffe (existing chemicals), deren Jahresproduktion über 10.000 Tonnen liegt, toxikologische Grunddaten nachgewiesen werden. Dabei sind auch Versuche zur akuten systemischen Toxizität (früher orale LD<sub>50</sub>) vorgesehen.

Die heute üblichen Testsysteme zur Beurteilung der akuten oralen Toxizität bzw. LD<sub>50</sub> sind toxikologische Tierversuche, die sequentiell durchgeführt werden, d.h. dass man sich stufenweise der Dosis annähert, bei der die Hälfte der Tiere sterben (LD<sub>50</sub>). Durch die sequentielle Testung werden Tiere eingespart, so dass sequentielle Verfahren als Alternativmethoden im Sinne des 3R-Konzeptes gelten. Je weiter die Startdosis im Tierversuch von der "wahren" LD<sub>50</sub> entfernt ist, desto mehr Schritte mit entsprechend höherem Tierverbrauch müssen durchgeführt werden. Die Testung der 1500 Altstoffe würde nach der heute üblichen Methode zu einem recht hohen Tierverbrauch führen.

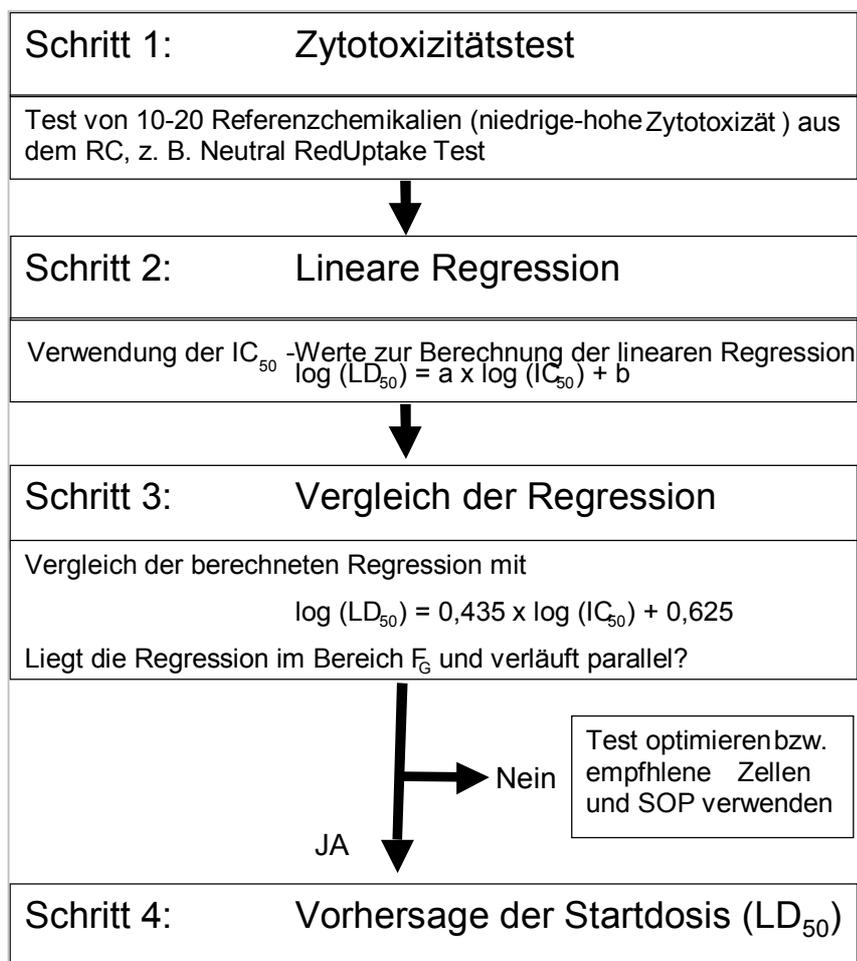
Deshalb veranstaltete die ICCVAM (US Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) im September 2000 eine öffentlichen Anhörung, um über die Eignung von In-vitro-Methoden für die Vorhersage der akuten Toxizität zu beraten. ZEBET war eingeladen, um über das Register der Zytotoxizität (RC) von Willi Halle zu berichten.

#### Das Register der Zytotoxizität (RC)

Willi Halle, dessen Forschung in den letzten Jahren mit Mitteln der Forschungsförderung des BgVV finanziert wurde, hat schon in der früheren DDR ein Modell entwickelt, mit dem die Startdosis für den Tierversuch vorhergesagt werden kann. Mit Hilfe von 160 Literaturstellen, die etwa 350 Chemikalien beschreiben, entwickelte er das Register der Zytotoxizität. Zwischen der Stärke der Zytotoxizität in den Zellkulturen und der akuten Toxizität im Tierversuch stellte er einen eindeutigen Zusammenhang fest, der als Vorhersagemodell benutzt wird. Als Vorhersagemodell diente eine einfache lineare Regression zwischen den logarithmierten IC<sub>50</sub>-Werten und dem Logarithmus des LD<sub>50</sub>-Wertes. Die IC<sub>50</sub>-Werte wurden der Literatur entnommen und ihr geometrischer Mittelwert als IC<sub>50x</sub>-Werte angegeben, während die LD<sub>50</sub>-Werte aus dem NIOSH-Register stammen. Um den Tierverbrauch zu verringern, kann mit Hilfe von geeigneten Zytotoxizitätstests die Startdosis für den Tierversuch vorhergesagt werden und zwar unter Zuhilfenahme des von Halle entwickelten Referenzchemikalien(RC)-Vorhersagemodells.

In **Abbildung 8** ist die RC-Methode nach Halle beschrieben, mit der eine Zelllinie prinzipiell auf ihre Eignung zur Vorhersage der Startdosis für die akute orale Toxizität überprüft werden kann. Mit Hilfe von zehn bis 20 Referenzchemikalien (Schritt 1) kann die lineare Regression zwischen den  $IC_{50}$ -Werten und dem  $LD_{50}$  berechnet werden (Schritt 2). Die so ermittelte Regressionsgerade wird mit der Regression aus dem RC verglichen (Schritt 3) und kann unter bestimmten Akzeptanzbedingungen direkt zur Vorhersage der Startdosis einer Substanz mit unbekanntem  $LD_{50}$  verwendet werden (ZEBET-RC-Methode).

**Abbildung 8: ZEBET-RC-Methode: Evaluation eines Zytotoxizitätstests zur In-vitro-/In-vivo-Testung für akute orale Toxizität**



### Anwendung des RC durch ICCVAM

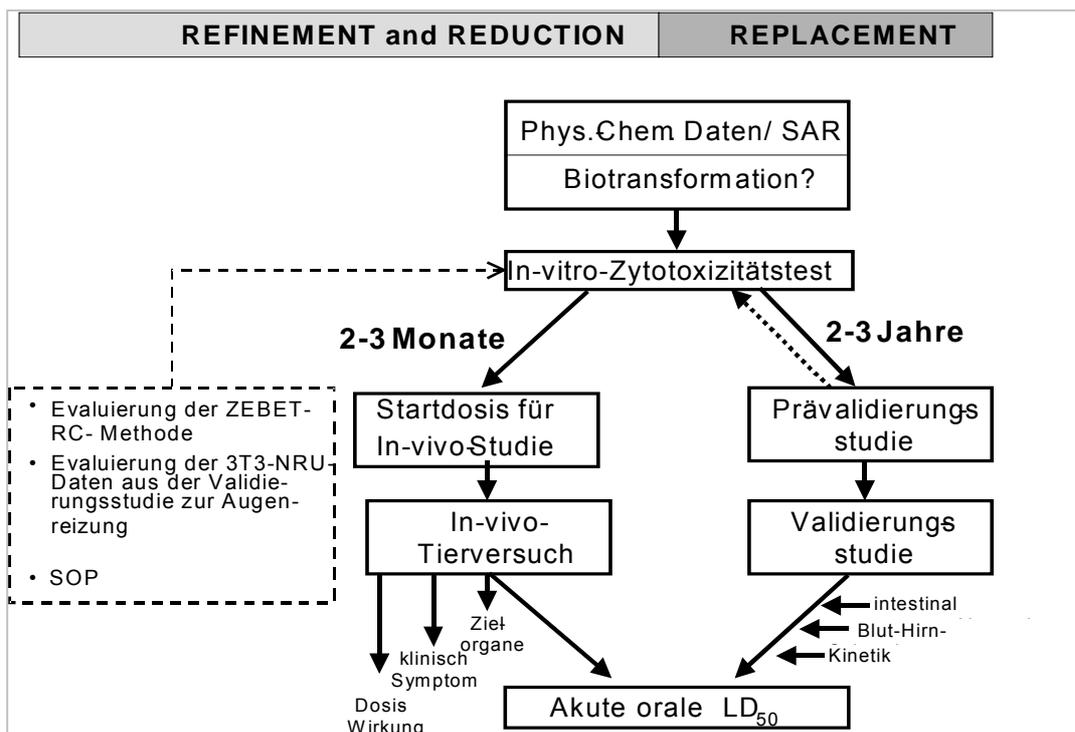
Bei der ICCVAM-Anhörung wurde die ZEBET-RC-Methode übereinstimmend als das erfolgversprechendste Konzept eingeschätzt. In **Abbildung 9** ist die kurz- und mittelfristige Planung für die Einbindung der ZEBET-RC-Methode in die Vorhersage der akuten oralen Toxizität dargestellt. Auf der Anhörung wurde beschlossen, zwei Wege parallel einzuschlagen. In **Abbildung 9** wird auf der linken Seite das kurzfristige Ziel - die Evaluierung der ZEBET-RC-Methode - beschrieben. Um dieses Konzept zu verwirklichen, wurde sowohl die Evaluierung der 3T3-NRU-Daten aus einer Validierungsstudie als auch die Erstellung einer SOP (Standardprotokoll) innerhalb von zwei bis drei Monaten vereinbart. In der SOP sind auch die Referenz-

chemikalien festgelegt. Dieser Teil des Vorhabens ist abgeschlossen, so dass die Dokumente von ICCVAM veröffentlicht wurden (<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/invitro.htm>).

Nach der Veröffentlichung durch die ICCVAM bzw. durch das National Institute of Health (NIH) der USA soll die ZEBET-RC-Methode direkt in die Praxis umgesetzt werden, indem vor Beginn des Tierversuches (in vivo) gemäß der SOP des NIH-Berichtes mit einem Zytotoxizitätstest die Startdosis für den Tierversuch bestimmt wird.

Bei der Durchführung der Tierversuche fallen nicht nur Daten zum LD<sub>50</sub>-Wert an, sondern es können darüber hinaus auch Informationen über Dosis-Wirkungs-Beziehungen, über klinische Symptome und über die betroffenen Zielorgane dokumentiert werden. Das Ziel ist einerseits die Überprüfung der ZEBET-RC-Methode in der Praxis und andererseits eine sofortige Einsparung des Tierverbrauches, wenn sich die Methode bewährt. Darüber hinaus kann überprüft werden, ob die aus dem Tierversuch zusätzlich gewonnenen Daten zu unentbehrlichen Resultaten führen, die mit den In-vitro-Methoden nicht erzielt werden können.

**Abbildung 9: Kurz- und mittelfristige Planung für die Einbindung der ZEBET-RC-Methode in die Vorhersage der akuten oralen Toxizität**



Parallel zu dieser kurzfristigen Maßnahme wurde auf der Anhörung eine mittelfristige Validierung inklusive einer Prävalidierungsphase beschlossen, die in zwei bis drei Jahren beendet sein soll und deren Ziel eine direkte Vorhersage der LD<sub>50</sub> mit Hilfe von Zytotoxizitätsdaten sowie die Einstufung in Giftigkeitsklassen ist. Neben der Bestimmung des IC<sub>50</sub>-Wertes sollen zur Verbesserung der Vorhersage der akuten Toxizität Informationen über die intestinale Absorption, die Blut-Hirn-Schranke und die Kinetik in das Modell mit einfließen. Die Ergebnisse der Anhörung und die Veröffentlichung im Federal Register sind auf folgender Website zu finden: <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/invitro.htm>.

#### **3.9.4.4 Forschungsförderung: Vergabe von Forschungsmitteln für die wissenschaftliche Erarbeitung von Tierversuchersatzmethoden**

Die ZEBET hat neben der systematischen Erfassung bereits publizierter Methoden die Entwicklung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch zu evaluieren. Dabei wird in der Phase der Validierung die Gültigkeit bzw. Anwendbarkeit der Methoden unter Routinebedingungen in verschiedenen Laboratorien geprüft.

Aus den genannten Gründen sollen erfolgversprechende Ansätze zur Entwicklung und Validierung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zu Tierversuchen gefördert werden. Eine klare Darstellung des Anwendungsbereiches, in dem Tierversuche eingespart werden können, ist notwendig. Insbesondere ist ausführlich und genau darzulegen, welcher Tierversuch durch das In-vitro-Modell ersetzt werden soll. Hohe Priorität hat der Ersatz von Tierversuchen in behördlichen Anmelde- und Zulassungsverfahren, wie z.B. in OECD-Richtlinien und im Europäischen Arzneibuch, der Pharmakopoe, in denen Tierversuche vorgeschrieben sind. Dabei ist der Einsatz neuer Methoden der Zell- und Gewebekultur, Immunologie oder der Computersimulation, Biometrie sowie molekularbiologische und molekulargenetische Methoden anzustreben. Die In-vitro-Methoden sollen soweit entwickelt werden, dass sie in internationalen Ringversuchen validiert werden können.

Interessierte Wissenschaftler können ihre Angebote unter Aufführung der geplanten Forschungsziele mit einer detaillierten Aufstellung des erforderlichen Aufwandes an Personal, Geräten und Materialien und der jeweils dafür veranschlagten Kosten an die Administrative Forschungs koordinierung im BgVV richten.

ZEBET verfügte im Jahr 2001 über einen Etat von 704.000 DM zur Vergabe von Forschungsmitteln für die wissenschaftliche Erarbeitung von Ersatzmethoden zu Tierversuchen in Deutschland. Auf die öffentliche Ausschreibung im Frühjahr 2001 gingen bei ZEBET 26 Anträge auf Forschungsförderung ein, von denen zehn Projekte als förderungswürdig eingestuft wurden. Mit den bereits laufenden Forschungsvorhaben konnten im Jahr 2001 somit insgesamt 17 Projekte gefördert werden (siehe **Tab. 6**). Außerdem wurden vier Werkverträge im Rahmen der Bewertung von Alternativmethoden vergeben.

Susanne Boy und Horst Spielmann

**Tabelle 6: Übersicht über die im Jahr 2001 geförderten Projekte**

Nr.	Institution	Thema	Laufzeit
1	Humboldt-Universität zu Berlin	Die Evaluierung dreidimensionaler humaner Hepatozytenkulturen zur Untersuchung des Metabolismus und der Toxizität von Arzneistoffen als Alternative zu Tierversuchen	09/99-08/01
2	Humboldt-Universität zu Berlin	Normotherme Hämoperfusion isolierter Organe von Schlachtschweinen als Tierversuchersatzmethode	09/99-08/01
3	Tierärztliche Hochschule Hannover	Ein molekularer In-vitro-Differenzierungsassay zur Evaluierung der teratogenen Potenz von ausgewählten exogenen Substanzklassen	10/98-09/01
4	Universität des Saarlandes, Saarbrücken	Entwicklung und Validierung eines In-vitro-Testsystems zur Ermittlung der Permeabilität von Arzneistoffen über das Alveolarepithel auf der Basis humaner alveolarer Epithelzellmonolayer	09/99-08/02
5	Freie Universität Berlin	In-vitro-Modell zur Angiogenese und Antiangiogenese	11/99-10/02
6	Universitätsklinikum Benjamin Franklin, Berlin	Regulation der immunologischen Antwort humaner Talgdrüsenzellen (SZ95-Zelllinie) in vitro	01/00-12/02
7	Humboldt-Universität zu Berlin	Implementierung eines Computerprogrammes für die quantitative Bewertung der Phototoxizität von chemischen Stoffen	11/00-06/01
8	Humboldt-Universität zu Berlin	Charakterisierung eines Dotterfaktors (EYF-X) mit wachstumstimulierenden Eigenschaften in In-vitro-Zellkulturen. Ersatz von fötalem Kälberserum (FCS) durch EYF-X	10/01-10/03
9	Tierärztliche Hochschule Hannover	In-vitro-Nachweis einer Sensibilisierung gegen Allergene an passiv sensibilisierten humanen Keratinozyten; Vorhersage eines allergenen Potentials von Prüfsubstanzen	07/01-06/03
10	Tierärztliche Hochschule Hannover	Der isoliert hämoperfundierte Rinderuterus als In-vitro-Entzündungsmodell zur Prüfung antiphlogistisch wirksamer Pharmaka	07/01-06/03
11	Universität zu Köln	Entwicklung eines dynamischen In-vitro-Co-Kultur-Modells der Blut-Hirn-Schranke zur Substitution von Langzeit-Permeabilitätsstudien an Tieren	07/01-06/03
12	Universität Tübingen	3-D-Computersimulation der Wirkstoffverteilung in den Innenohrflüssigkeiten bei lokaler Pharmaka-Applikation	07/01-12/02
13	Freie Universität Berlin	Zucht von <i>Pediculus humanus corporis</i> , der Kleiderlaus des Menschen, in vitro - eine tierschutzgerechte Alternative zur Zucht mittels Kaninchen	09/01-10/02
14	Universität Ulm	Etablierung eines Zellkulturmodells (Primärzellkulturen arterieller menschlicher glatter Muskelzellen)	10/01-09/02
15	Universität Bremen	Entwicklung und Prävalidierung von In-vitro-Methoden als Alternativen zum Draize Augenirritationstest unter Anwendung der Quantitativen Fluoreszenz-Scanning-Mikroskopie (QFSM)	10/01-10/03
16	GenPharmTox BioTech AG, Martinsried	Konstruktion und Charakterisierung von V79 Pathway Cell Lines™: Heterologe Koexpression von humanem Cytochrom P450 1A2 und polymorphen Formen humaner N-Acetyltransferase Typ2 in V79 Chinesischen Hamsterzellen zur In-vitro-Untersuchung von Toxizität und Metabolismus von Chemikalien und Arzneimitteln	10/01-09/04
17	Tierärztliche Hochschule Hannover	Molekularer In-vitro-Differenzierungsassay zur Evaluierung der teratogenen Potenz von ausgewählten exogenen Substanzklassen: Wege zur automatisierten Testung neuer Substanzen	10/01-11/02

### 3.9.5 Mitarbeit in internationalen Gremien

#### Europäische Union

Sehr eng kooperiert ZEBET mit ECVAM bei der Planung und Durchführung von Validierungsstudien sowie bei der Unterstützung von Maßnahmen zur Beschleunigung der behördlichen Anerkennung tierversuchsfreier, toxikologischer Prüfmethode. Mitarbeiter der ZEBET sind deshalb in mehreren wichtigen Gremien von ECVAM vertreten, die die Arbeit von ECVAM unterstützen.

Dazu gehören:

- das ECVAM Scientific Advisory Committee ESAC
- die ECVAM Task Force on the Validation of Alternative Methods
- die ECVAM Task Force on Biostatistics
- die ECVAM Task Force on Reproductive Toxicology
- die ECVAM Task Force on Data Banks and Information Systems on Alternative Methods
- die ECVAM Task Force on In Vitro Alternatives for Eye Irritation Testing
- die ECVAM Task Force on In Vitro Alternatives for Skin Irritation Testing
- die ECVAM Working Group on the New EU Chemicals Policy

#### ECVAM Scientific Information System

Das ECVAM Scientific Information System (SIS) wird zukünftig über Internet folgende Datenbanken anbieten:

- Datenbank für internationale Validierungsstudien zu Alternativmethoden,
- Datenbank für Alternativmethoden,
- INVITTOX-Protocols,
- Datenbanken für wissenschaftliche Institutionen, Literatur, chemische Stoffe, Workshops u.a.

Die Datenbank für Validierungsstudien hat die Aufgabe, internationale Validierungsstudien zu unterstützen, die von ECVAM koordiniert werden. Es sollen die zur Validierung erforderlichen Informationen und Daten dokumentiert werden und den Teilnehmern von Validierungsstudien Möglichkeiten der Kommunikation eingerichtet werden. ZEBET ist im Advisory Committee des ECVAM-SIS-Informationssystems vertreten

#### OECD

OECD Working Group on Validation

#### USA

1998 haben die US-Bundesbehörden das Validierungszentrum **ICCVAM** (Interagency Coordinating Center for the Validation of Alternative Methods) gegründet, das über das NTP (National Toxicology Program) finanziert wird und im NIEHS in Research Triangle Park, NC etabliert wurde. ICCVAM hat die Aufgabe, validierte In-vitro-Toxizitätstests wissenschaftlich daraufhin zu prüfen, ob sie von einer oder mehreren US-Bundesbehörden als offizielle Prüfmethode anerkannt werden können. Die Bewertung neuer Methoden erfolgt entsprechend dem Verfahren des Peer reviewing in öffentlicher Anhörung, an der sich jeder Bürger beteiligen kann. ICCVAM hat Richtlinien für die Akzeptierung neuer Prüfmethode verabschiedet. In den Jahren 2000 und 2001 wurde ZEBET offiziell von ICCVAM um Kommentierung der ICCVAM Reports zur Bewertung aller In-vitro-Toxizitätstests gebeten und auch an der Planung von Validierungsstudien beteiligt.

Außerdem hat ZEBET seit seinem Bestehen eng mit dem **Centre for Alternatives to Animal Testing (CAAT)** an der Johns Hopkins University in Baltimore, MD (USA) zusammengearbeitet sowie mit dem 1997 gegründeten **Institute for In Vitro Sciences (IIVS)** in Gaithersburg bei Washington DC. ZEBET ist in mehreren Entscheidungsgremien des CAAT vertreten, während sich die Zusammenarbeit mit dem IIVS auf die experimentelle Kooperation bei Validierungsstudien beschränkt.

#### Altweb-Website des CAAT Zentrums für Alternativmethoden

Seit 1997 bietet das **Centre for Alternatives to Animal Testing (CAAT)** auf seiner Altweb-Website (<http://altweb.jhsph.edu>) Informationen zum Thema Alternativmethoden über das Internet an. Es handelt sich dabei um Informationen über relevante Publikationen, aktuelle Entwicklungen des Tierschutzgesetzes, Meetings, Preise, wichtige Datenbanken oder andere Websites. Gleichzeitig ist die AltWeb-Website ein Diskussionsforum für Wissenschaftler in den USA und Europa. AltWeb ist rein englischsprachig. Die Homepage richtet sich vor allem an Wissenschaftler, die experimentell an Universitäten oder in Forschungseinrichtungen der Industrie tätig sind. Zu seinen Nutzern zählen aber auch Tierschutzorganisationen, Lehrer, Studenten und Privatpersonen.

Seit 1998 arbeitet ZEBET im Management-Team für die AltWeb-Website im Internet aktiv mit. Ziel dieser Kooperation ist es, über die AltWeb-Website Informationen aus Europa rasch weltweit anbieten zu können. Außerdem wird seit 2000 die ZEBET-Datenbank über Alternativmethoden auch über die Altweb-Website im Internet angeboten.

### **3.9.6 Auszeichnungen**

#### **Doerenkamp-Zbinden-Tierschutzpreis**

Im Rahmen des internationalen Kongresses für In-vitro-Toxikologie, INVITOX 2000, wurde im Oktober 2002 im spanischen Alicante der mit 25.000 Schweizer Franken dotierte Tierschutzpreis der Schweizer Doerenkamp-Zbinden-Stiftung vergeben. Professor Vera Rogiers, Medizinisch-Pharmazeutische Fakultät der Freien Universität Brüssel, und Dr. Horst Spielmann, Leiter der ZEBET am BgVV, erhielten den Preis für ihre erfolgreichen Bemühungen zur Reduktion und zum Ersatz von Tierversuchen. Die Doerenkamp-Zbinden Stiftung wurde vor zehn Jahren von Professor Gerhard Zbinden, dem Direktor des Instituts für Toxikologie der ETH Zürich, ins Leben gerufen. Neben der jährlichen Vergabe des Tierschutzpreises unterstützt die Stiftung Projekte zum Ersatz von Tierversuchen in Forschung und Lehre.

Horst Spielmann erhält den Preis in Anerkennung seiner Leistungen bei der Suche nach Alternativen zum Tierversuch in der biomedizinischen Forschung. Neben seinen Aktivitäten als Mitbegründer und Vorsitzender von europäischen Gesellschaften, die sich dem Ersatz von Tierversuchen widmen, wie z.B. der European Research Group for Alternatives in Toxicological Testing (ERGATT), würdigt die Auszeichnung vor allem den Aufbau und die erfolgreiche Arbeit der ZEBET. ZEBET hat sich in den zehn Jahren seines Bestehens eine international beachtete Position erworben.

#### **Herbert-Stiller-Forschungspreis 2000 der „Ärzte gegen Tierversuche“**

Der Herbert-Stiller-Forschungspreis 2000 ging an die Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch (ZEBET) am BgVV mit 50.000 DM dotierte und zu gleichen Teilen von „Ärzte gegen Tierversuche“ e.V. und der Tierschutzorganisation „Bürger gegen Tierversuche e.V. Hamburg“ gestiftete Preis wurde der Leiterin der Dokumentation und Information der ZEBET, Dr. Barbara Grune, für den Aufbau der ZEBET-Datenbank über Alternativmethoden zum Tierversuch überreicht. Er wurde am 8. September 2001 im BgVV durch die Vorsitzenden der beiden Vereinigungen, Herrn Dr.

Bernhard Rambeck und Frau Simone Runde, verliehen. Gleichzeitig erhielt Dr. Jan Zak den mit 10.000 DM dotierten Promotionspreis der Vereinigung „Ärzte gegen Tierversuche“ e.V. Jan Zak wird damit für seine Dissertation an der Universität Münster über eine tierversuchsfreie Methode im Rahmen der Krebsforschung ausgezeichnet.

Der nach dem Gründer der Vereinigung „Ärzte gegen Tierversuche“ e.V. benannte Herbert-Stillier-Forschungspreis wird alljährlich für wissenschaftliche Arbeiten vergeben, die sich unter Verzicht auf Tierexperimente mit den relevanten Ursachen und Therapiemöglichkeiten menschlicher Erkrankungen beschäftigen und einen wesentlichen Beitrag zum medizinischen Fortschritt leisten. Der Vereinigung gehören rund 250 Mediziner, Zahnmediziner, Psychologen und im klinischen Bereich tätige Wissenschaftler an, die dem Tierversuch kritisch gegenüberstehen und sich für den Ausbau wissenschaftlicher Forschung ohne Tierleid engagieren. Die „Ärzte gegen Tierversuche“ bemühen sich vor allem um die Aufklärung der Öffentlichkeit über Tierexperimente und Möglichkeiten alternativer Forschung.

### **3.9.7 ZEBET Kommission**

Die Kommission unterstützt die Arbeit von ZEBET durch grundsätzliche Überlegungen zur Planung und Durchführung von Ringversuchen und ist bei der Entwicklung und Anwendung von allgemeinen Anwendungskriterien für Ersatz- und Ergänzungsmethoden beratend tätig. Schwerpunkt der Tätigkeit ist die kritische Bewertung behördlich vorgeschriebener toxikologischer Tierversuche mit dem Ziel, diese durch tierversuchsfreie Methoden zu ersetzen und - wo das nicht möglich ist - die Tierzahlen zu verringern bzw. das Leiden der Versuchstiere zu mildern.

Die aktuelle [Zusammensetzung der ZEBET-Kommission](#) kann der Homepage des BgVV entnommen werden.

### **3.9.8 Fachgebiet 911: Spezielle Fragen des Tierschutzes**

- Beratung von Bundesregierung, Länderbehörden, wissenschaftlichen Einrichtungen und von Fachgremien bei Vorbereitung, Setzung und Vollzug von tierschutzrelevanten Rechtsvorschriften
- Mitarbeit in nationalen und internationalen Gremien und Fachverbänden des Tierschutzes
- Durchführung von wissenschaftlichen Forschungsvorhaben zu tierschutzrelevanten Fragestellungen bei Haltung, Transport und Schlachtung landwirtschaftlicher Nutztiere
- Tierschutzbeauftragter im BgVV

#### **3.9.8.1 Detaillierte Aufgabenbeschreibung**

In den letzten Jahren hat der Tierschutz in der Haltung von Nutztieren erheblich an Bedeutung gewonnen. Dies wird deutlich durch die Zunahme an Tierschutz-Gesetzgebungsverfahren auf nationaler und internationaler Ebene bei Haltung und Transport, der aktuellen politischen und gesellschaftlichen Diskussion zu Krisen in der landwirtschaftlichen Tierhaltung und der von der Bundesregierung unterstützten Etablierung von tiergerechteren Halungsverfahren im Zuge der sogenannten Agrarwende.

#### **3.9.8.2 Beratung von Bundesregierung, Länderbehörden, wissenschaftlichen Einrichtungen und von Fachgremien bei Vorbereitung und Vollzug von tierschutzrelevanten Rechtsvorschriften**

Für die Ausarbeitung von Anforderungen des Tierschutzes an die Praxis der Tierhaltung sind umfangreiche Arbeiten in Gremien erforderlich, die dem Gesetzgeber für die Inhalte von Rechtsvorschriften zuarbeiten. Auf Bundesebene sind dies die regelmäßigen Sitzungen der für den Tierschutz zuständigen obersten Landesbehörden beim BMVEL und die Arbeitsgruppe für Tierschutz (AFTSCH) der Arbeitsgemeinschaft der für das Veterinärwesen zuständigen obersten Landesbehörden (ArgeVet). In beiden Gremien ist das BgVV mit dem FG 911 als ständiger Gast vertreten.

Schwerpunkte der Tätigkeit im Bereich der Haltung von Tieren betreffen die Schaffung der Tierschutz-Nutztierhaltungsverordnung, in die eine nach der Nichtigkeitserklärung durch das Bundesverfassungsgericht neugefasste Legehennenverordnung sowie die bestehenden Kälber- und Schweinehaltungsverordnungen integriert wurden. Zur den Vorlagen des Rates und der Kommission der Europäischen Union zur Novellierung der Richtlinie 91/630 EWG und ihrer Anhänge zum Tierschutz bei der Haltung von Schweinen wurden im Fachgebiet umfangreiche Stellungnahmen erarbeitet.

Auf europäischer Ebene erfolgt eine Überarbeitung des Europäischen Übereinkommens zum Schutz von Tieren beim internationalen Transport. Für den Transport von Tieren auf Straße, Schiene, See und in der Luft wurden im Fachgebiet detaillierte Anforderungen und Vorschläge ausgearbeitet. Auch befinden sich die Anforderungen an Versorgung, Ladedichten und Klimabedingungen der Richtlinie 91/628 EWG zum Schutz von Tieren beim Transport unter Beteiligung des Fachgebietes in einer ausgiebigen Diskussion.

Die tierschutzgerechte Betäubung und Schlachtung sowie die Tötung von landwirtschaftlichen Nutztieren im Seuchenfall hat im Zuge von Berichten über unzureichende Betäubung (Bolzenschuss beim Rind, CO<sub>2</sub> beim Schwein) und über das Seuchengeschehen (Aviäre Influenza, BSE und MKS) neue Aktualität erfahren. Hierzu wird in den entsprechenden Fachgremien bei Bund und Ländern unter Beteiligung des Fachgebietes intensiv beraten, um

die Bestimmungen der Tierschutz-Schlachtverordnung (TierSchIV) den neuen Anforderungen anzupassen.

### **3.9.8.3 Durchführung von wissenschaftlichen Forschungsvorhaben zu tierschutzrelevanten Fragestellungen bei Haltung, Transport und Schlachtung landwirtschaftlicher Nutztiere**

Ein Schwerpunkt der wissenschaftlichen Tätigkeit in der Fachgruppe "Spezielle Fragen des Tierschutzes" sind Untersuchungen zum Tierschutz bei Nutztieren während des Transportes. Es besteht zur Zeit eine Beteiligung am EU – Projekt QLRT-1999-01507: "Minimizing stress inducing factors on cattle during transport and handling to improve animal welfare and meat quality - CATRA" <http://www.lt.slu.se/catra/>. Als "Partner 11" wird hierin verantwortlich das Projekt "Long distance transport of slaughter cattle" betreut, in dem regelmäßig in Zusammenarbeit mit der Tierärztlichen Hochschule Hannover und dem Beratungs- und Schulungsinstitut für schonenden Umgang mit Zucht- und Nutztieren (BSI) Transporte von Schlachtbullen aus dem norddeutschen Raum nach Koper/Slowenien mit einem Laborfahrzeug begleitet und untersucht werden.

Eine weitere wichtige Fragestellung ist die Harmonisation der Transport- und Pausenzeiten nach Tierschutz-Transportverordnung mit den gesetzlich festgelegten Lenkzeiten für die Fahrer. Vorläufige Untersuchungen zur Abladeregel (link: [Abschlußbericht Rindertransport I.pdf](#)) und zur Gestaltung von Fahrt- und Pausenintervallen (link: [Abschlußbericht Rindertransport II.pdf](#)) im Ferntransport sind abgeschlossen und die Ergebnisse dem BMVEL berichtet worden.

Um die Belastungen der Rinder während des Ferntransportes nach Art und Umfang unter Berücksichtigung einer eingeschränkten Adaptationskapazität der Tiere einschätzen zu können, werden vergleichend Untersuchungen zur Belastung von Rindern im üblichen landwirtschaftlichen Betrieb (link: [Vergleichsversuch zum Transport.pdf](#)) durchgeführt. Auch hierzu liegen erste Ergebnisse vor.

Michael Marahrens

### **3.9.8.4 Mitarbeit in nationalen und internationalen Gremien und Fachverbänden des Tierschutzes**

Das FG 911 entsendet einen vom BMVEL vorgeschlagenen nationalen Experten zur Unterstützung von Inspektionen des Direktorates F (Food and Veterinary Office [http://europa.eu.int/comm/food/fs/inspections/index\\_en.html](http://europa.eu.int/comm/food/fs/inspections/index_en.html)) der Generaldirektion für Gesundheit und Verbraucherschutz der EU zur Einhaltung der Tierschutzaufgaben beim Transport und der Schlachtung von Nutztieren in den Mitgliedsstaaten.

Die Organisation, die Technik und die Logistik des Tiertransportes wird auf auf EU-Ebene in einem "Code of best Practice" standardisiert. Hierzu hat sich bei der Europäischen Normungsbehörde CEN <http://www.cenorm.be/> im Technical Committee (TC) 320 die Arbeitsgruppe TG 2 "Transport of living animals" etabliert, in der Deutschland bisher nicht vertreten ist. Die deutsche Normungsbehörde DIN ist in Zusammenarbeit mit dem BgVV bemüht, ein nationales Gremium zum Transport von Tieren zu schaffen, das Vertreter in das CEN/TC 320/WG 2 entsendet.