

# Alternative Prüfmethode

## Neue Trends: Die tierversuchsfreie Route



© Tran-Photography-Fotolia.de

**Der Trend zu tierfreien Testmethoden ist in der chemischen und in der pharmazeutischen Industrie sichtbar. Kosten, ethische Gründe und die Robustheit der neuen Ersatzmethoden sind sicherlich die wichtigsten Gründe. Einen Einstieg in die Arbeitsweisen und Optimierungen zellbasierter *in vitro* Methoden als Alternativmethode zum Tierversuch bekommen Sie durch fachgerechte Weiterbildung.**

Über 30000 Chemikalien, die in der EU produziert oder eingeführt werden, werden seit 2006 unter die Lupe genommen. Die erlassene EU Chemikalienverordnung REACH [1] hat die Zulassung, Bewertung und Registrierung von Chemikalien neu angeordnet um die Gesundheit des Menschen und der Umweltsicherheit zu stellen. Solche Chemikalien, die in einem Volumen von einer Tonne und mehr pro Jahr im Handel sind, werden

auf ihre gesundheitsschädliche Wirkung hin getestet.

### Chemie im Alltag

Auf der Liste stehen Alkylphenole, die sich in Wasch- und Reinigungsmitteln befinden und ins Grundwasser gespült werden. Bromierte Flammschutzmittel, die die Entzündung brennbarer Materialien wie Kunststoffe, Textilien oder Holz hinauszögern, und Phthalate, die als nützliche Weichmacher und Veredler von Textilien genutzt werden, gehören dazu (Abb. 1). Sie stehen in Verdacht nicht nur Fische zu schädigen. Über das Grundwasser können diese synthetisch hergestellten Stoffe auch in den Kreislauf des Menschen gelangen.

Viele dieser von der Industrie hergestellten Chemikalien stehen schon lange auf der Kandidatenliste der Europäischen Chemikalienagentur (ECHA) als registrierungspflichtige Substanzen. Allerdings hat man für die erfolgreiche Umsetzung des Vorhabens REACH berechnet, dass mit den Untersuchungen zur Bewertung der Giftigkeit von Substanzen, die benötigte Anzahl der Tiere pro Jahr um 600000 steigt. Davon abgesehen zeigten Statistiken, dass bereits im Jahr 2006 schon 2.5 Millionen Tiere für Versuchs- und andere wissenschaftliche Zwecke in Deutschland im Einsatz waren. Dabei ist auch nicht nur der hohe Anstieg an Tierexperimenten zu betrachten, auch forderte die erlassene EU Chemikalienverordnung REACH zusätzlich einen hohen

Kostenanstieg von ca. 5.4 Billionen Euro [2]. Damit wird die Suche nach alternativen Prüfmethode immer dringender.

### Alternative Prüfmethode

Schon seit den 80iger Jahren wird zur Vermeidung von Tierversuchen bei der Prüfung von Wirkstoffen streng nach dem 3R-Konzept, das die Biologen Rex Burch und William Russell 1959 (The Principles of Humane Experimental Technique, London 1959) entwickelt haben, vorgegangen. Wesentliches Ziel des Konzepts ist es, die signifikante Einsparung von tierexperimenteller Untersuchungen durch alternative Methoden zu ersetzen (Replacement). Wenn dies nicht möglich ist, soll die Zahl der benötigten Tiere zumindest auf ein Minimum beschränkt werden (Reduction). Mit dem dritten R geht es darum, das Leiden der eingesetzten Tiere zu verringern und aus dem einzelnen Tierversuch so viele Informationen wie möglich zu gewinnen (Refinement).

Umfangreiche Vorschriften zum Verbot von Tierversuchen wurde in 2003 bei kosmetischen Mitteln erlassen. Danach dürfen in der EU keine Tierversuche mit fertigen kosmetischen Produkten mehr durchgeführt werden.

Für die klassischen Prüfverfahren wird zur Einstufung der Schädlichkeit einer Substanz die Letalitätsdosis herangezogen. Am lebenden Tieren (*in vivo*), dazu zählen Mäuse, Ratten, Meerschweinchen und Kaninchen, wird die Dosis-Effekt-Beziehung bestimmt, bei der die Hälfte



Abb. 1: Die ‚Rainbow Loom Bands‘, die Armbänder zum Selber basteln sollen giftige Substanzen wie Phthalate enthalten.

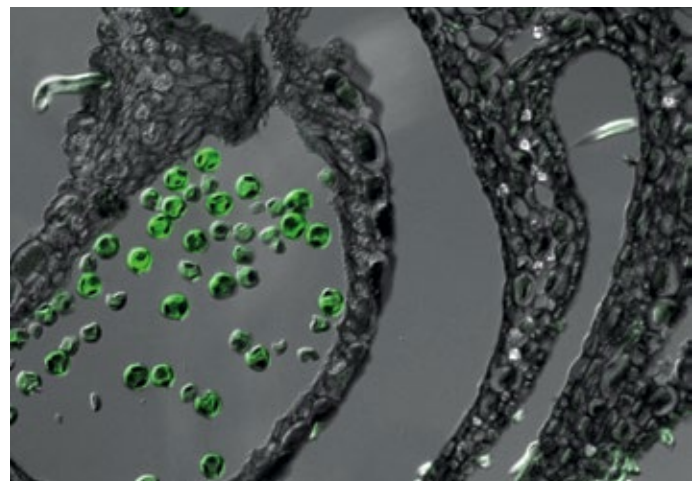


Abb.2: Testmethode im Reagenzglas (*in vitro*): Zellkultursysteme

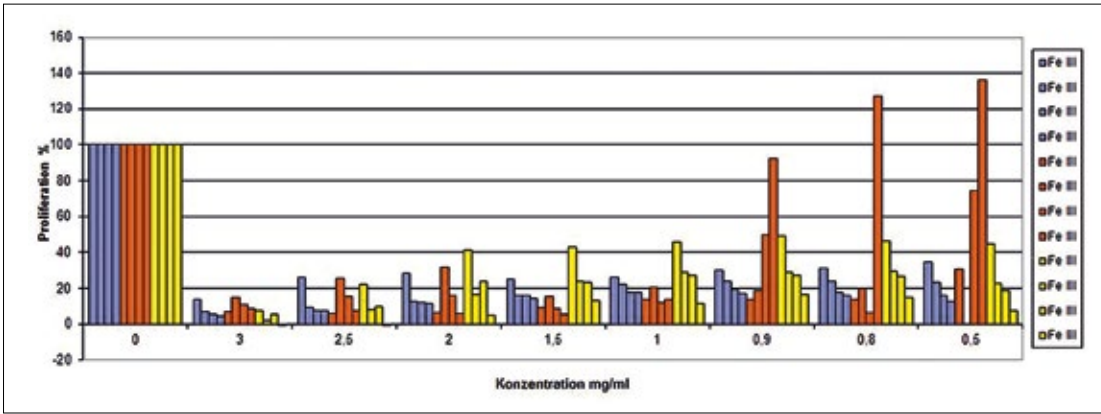


Abb.3: Mit einer steigenden Eisen (III)-Natriumverbindung (Konzentration in µg/ml) zeigen primäre Zelllinien unter unterschiedlich langer Behandlung (Balken von links nach rechts, nach 24h, 48h, 96h, 144h) im Zellproliferationstest unterschiedliches Zellwachstum (%). Glatte Muskelzellen (blau), Endothelzellen (orange), Fibroblasten(gelb).

(50%) der Versuchstiere sterben. Mit der LD 50, die sogenannte tödliche letale Dosis wird eine krebserregende und eine erbgutverändernde Eigenschaft eines Stoffes ermittelt (g/l).

Um Tierversuche zu reduzieren und um kostengünstige alternative Methoden so schnell wie möglich zu entwickeln, hat das Bundesministerium für Bildung und Forschung mehr als 400 Projekte gefördert [3].

Mehr als 200 Millionen € wurden in der EU investiert um Alternativen zu Tierversuchen zu entwickeln. Diese Programme werden über die Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, das OECD [4] koordiniert. Die Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung wird dabei auf internationale Ebene und in Europa durch ein EU Research Centre in Ispra, in Italien, koordiniert. Beim Bundesamt für Risikobewertung ist eine zentrale Datenbank eingerichtet, die über die Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch "Auskunft gibt (Zebet) [5]. Der Trend in der Pharmaindustrie und in der Kosmetikindustrie sich vom Tierexperiment weg zu bewegen hält dabei entschlossen an. Kosten, ethische Gründe und die Robustheit (Zuverlässigkeit) der neuen Ersatzmethoden sind sicherlich die wichtigsten Gründe. Sicherlich nimmt das Tempo, mit dem wir im alltäglichen Leben neuen Substanzen und Stoffen begegnen, weiterhin rasant zu und wird den Nachdruck auf die Entwicklung alternativer Testsysteme erhöhen.

### Methoden im Reagenzglas

Zu den robusten *in vitro* (im Reagenzglas) Testsystemen ohne Tierversuch werden humane Primärzellen, Zelli-

nien oder adulte Stammzellen eingesetzt (Abb. 2, 3). Dabei sind die Kulturbedingungen der Zellen so geschaffen, dass sie den natürlichen Mikroumgebungen der Zellen im Körper ähnlich sind. Vom Fraunhofer Institut für Grenzflächen und Bioverfahrenstechniken (IGB) wurden bereits dreidimensionale organoide Textsysteme entwickelt [6]. Diese künstlich hergestellten Hautäquivalente sind die Nachahmungen der menschlichen Haut und werden zur Prüfung von Substanzen eingesetzt.

### Die Zelle zum Stauen

Die kleinsten Einheiten des Körpers von Tier und Menschen sind die Zellen. Sie haben charakteristische Eigenschaften und Strukturen und bilden die verschiedensten Gewebe und Organe. Spezifische Reaktionen und Interaktionen von Zellen oder Zellverbänden werden hauptsächlich über externe Faktoren initiiert.

Damit die im Reagenzglas (*in vitro*) gezüchteten Zellkulturen die natürliche Umgebung widerspiegeln und eine annähernde *in vivo* Nachahmung repräsentieren, ist es von großer Bedeutung, dass die *in vivo* Bedingungen genauestens bekannt sind. Dazu gehören die geeigneten Zellmedien und spezifische Wachstumsfaktoren, die die Zellfunktionen und den Differenzierungsgrad gezielt aufrecht erhalten. Die Lebensdauer verschiedener Zellen variiert extrem, von Schleimhaut des Dünndarms mit 1,4 Tagen und Leberzellen mit 220 Tagen. Noch extremer sind Nervenzellen, die oft lebenslang aktiv sind, ohne dass sie sich jemals teilen. Ebenso variiert die Größe der Zellen, von der durchschnittlichen Größe von 30–50 µm (Leberzellen) bis zu den größten Zellen des Menschen, den Eizellen mit 120 µm. Die Größe und die Morphologie ist

für jeden Zelltyp spezifisch und erfordert spezielle Kenntnisse.

### Mitarbeit für Zellkultursysteme

Um den richtigen Umgang und standardisierte Arbeitsweisen im Zellkulturlabor zu garantieren, werden Kenntnisse in Zellkulturtechniken dringend benötigt. Für die Methodenentwicklung und die Validierung von Primärzellen, permanenten Zelllinien oder adulten Stammzellen sind wichtige Basiskenntnisse in Zellbiologie erforderlich. Einen Einstieg in die Arbeitsweisen und die Optimierung zellbasierter *in vitro* Methoden als Alternativmethode zum Tierversuch bekommen Sie z.B. bei Biobioseminars.

### Referenzen

- [1] Die Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 (Reach Verordnung)
- [2] Umweltbundesamt UFORDAT- Die Datenbank zur Umweltforschung.URL: [www.umweltbundesamt.de](http://www.umweltbundesamt.de)
- [3] Bundesministerium für Bildung und Forschung. URL: [www.bmbf.de/de/1040.php](http://www.bmbf.de/de/1040.php)
- [4] Die Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung. URL: [www.oecd.org/berlin/dieoecd/](http://www.oecd.org/berlin/dieoecd/)
- [5] Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), November 2015, Quelle: URL: <http://www.bfr.bund.de/de/start.html>
- [6] Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik.URL: <http://bit.ly/Zellkulturmodell>

### Kontakt

Dr. Jutta Wirth  
Biobioseminars  
Universität Wageningen  
Niederlande  
[jutta.wirth@wur.nl](mailto:jutta.wirth@wur.nl)  
[www.biobioseminars.com](http://www.biobioseminars.com)



Weitere Beiträge zum Thema:  
<http://bit.ly/Tierversuch>



Informationen zum Thema  
REACH: [www.reach-info.de](http://www.reach-info.de)



Informationen zu Fortbildungen:  
[www.biobioseminars.com](http://www.biobioseminars.com)