Linz 2000, 2. Teil

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

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

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

Freie Vorträge

(Vorsitz: Horst Spielmann, D-Berlin)

Zum Tagungsbeginn berichtet **Augustinus Bader** (D-Hannover) über die Fortschritte beim „Züchten künstlicher Organe für die Transplantation am Menschen. Welche Perspektiven gibt es für die Entwicklung prädiktiver *in vitro* Modelle in der Arzneimittelforschung - erste Beispiele im Bereich der Leber?"

Das „*Tissue Engineering*" stellt einen sich neu entwickelnden, biotechnologischen Forschungszweig dar, der sehr starke Verbindungen zu den klinischen Fachrichtungen der Medizin besitzt. Die aktuellen Arbeiten sind motiviert durch die vielfältigen therapeutischen Einsatzbereiche bioartifizieller Organe zur Behandlung eines Organversagens. Das Ziel des *Tissue Engineering* ist die Entwicklung von Ersatzgewebe für die Therapie ausgefallener oder partiell defekter Organe. Bei dieser Forschungsrichtung handelt es sich um ein interdisziplinäres Feld, in dem die Prinzipien der Ingenieur- und Lebenswissenschaften eingesetzt werden, um biologische Ersatzsysteme für erkrankte Organe zu entwickeln. Das Innovationspotential für die Grundlagenforschung, wie auch für die angewandte Forschung und klinische Therapie, ist als sehr hoch einzuschätzen.

Das *Tissue Engineering* kann als eine Weiterentwicklung der Transplantationsmedizin angesehen werden. Hierbei werden jedoch autologe (d.h. körpereigene) im Unterschied zu allogenen (von anderen Menschen) oder xenogenen (von Tieren stammende) Organe transplantiert oder regeneriert. Die damit verbundene Ablösung palliativer oder symptomatischer Therapieformen hat das Ziel einer „*restitutio at integrum*" d.h. einer vollständigen körperlichen Wiederherstellung bzw. Genesung und könnte daher bei verkürzter Behandlungsdauer zu erheblichen Kosteneinsparungen im Gesundheitswesen führen. Damit verbunden ist auch eine Verbesserung der Lebensqualität der Patienten. Die bisherigen Kosten für die klassischen Therapieformen des Organausfalls werden allein in den USA auf 500 Milliarden US Dollar geschätzt. Die Chancen für den Industrie- und Wissenschaftsstandort Europa sind noch weitgehend ungenützt und bedürfen einer entsprechenden Entwicklung der Infrastruktur. Nach internationalen Voraussagen wird der Gewebingenieur als eine der Top-Berufsperspektiven der nächsten 10-20 Jahre im wissenschaftlichen Bereich angesehen.

Aus der Sicht des Tierschutzes ist diese Entwicklung zu begrüssen. Sie stellt eine wissenschaftlich und therapeutisch überlegene Alternative zur Xenotransplantation dar, die eine Vielzahl schwer belastender Versuche an Primaten erfordert. Es soll jedoch nicht verschwiegen werden, dass sich bei der Gewinnung von menschlichen Stammzellen neue ethische Dimensionen ergeben, wenn diese aus abgetriebenen Föten oder überzähligen Embryonen gewonnen werden. *ALTEX* wird diesem Thema demnächst ein Schwerpunktheft widmen, in dem das Manuskript von Augustinus Bader eine zentrale Bedeutung haben wird.

Eine gute Nachricht vermittelte der Bericht zum „Stand des Verbots der Gewinnung monoklonaler Antikörper über die Aszitesmaus in Europa und den USA" von **Uwe Marx** (ProBioGen, D-Berlin). In Europa ist diese Methode bisher nur in der Schweiz, in Deutschland und den Niederlanden bereits verboten, im restlichen Europa ist das Verbot jedoch noch nicht durchsetzbar. In Amerika haben Tierschutzorganisationen zwei Prozesse gegen diese Gewinnungsmethode verloren und schon fast resigniert. Über eine Million Aszitesmäuse wurden dort jährlich für die Produktion monoklonaler Antikörper verbraucht. Die Wende brachten offenbar die Publikation des ECVAM-Workshopberichts und vor allem der „*Production of Monoclonal Antibodies Workshop*" auf dem Weltkongress im August 1999 in Bologna. Das NIH (*National Institute of Health*) konnte sich den Argumenten für die *in vitro* Produktion nicht weiter verschliessen. Nach dem Besuch einiger Experten in europäischen Labors, die mit den Alternativmethoden arbeiten, verkündete es, man werde in den USA keine Forschungsarbeiten mehr fördern, die Aszitesmäuse verwenden. Dies sei nicht mehr der Stand der Wissenschaft. Nun ist man also in den USA, spät gestartet zwar, doch noch schneller am Ziel. Dies muss zwangsläufig

zu der Überlegung führen, ob die Politik, nach einem gesetzlichen Verbot zu trachten, nicht doch zuviel Zeit kostet. UCSF (*University of California at San Francisco*) schreibt zum Beispiel: „*In order to eliminate the use of mice and to avoid pain, discomfort, or distress to animals from the production of monoclonal antibodies using mouse ascites, both OPRR (Office for Protection from Research Risks) and USDA (US Department of Agriculture) encourage the use of alternative methods to produce monoclonal antibodies in vitro, without compromising the aims of the study. Institutional Animal Care User Committees are now expected to critically evaluate all protocols which propose using the mouse ascites method, and only allow in vivo production on the basis of strong scientific justification. UCSF has responded to this by setting up a core laboratory within the Cell Culture Facility to produce in vitro antibodies for UCSF investigators.*" Auch in Kanada kommt der Forscher, der weiterhin mit der Aszitesmaus arbeiten will, in einen Rechtfertigungsnotstand. Der *Canadian Council on Animal Care* (CCAC) schreibt in einem Entwurf: „*Every attempt should be made to use an in vitro method for production of mAbs. Therefore, any proposed production of monoclonal antibodies using the ascites method requires justification by the investigator to the animal care committee.*"

fpg

Poster

Das Neurofibrom-HET-CAM-Modell als Methode der Wahl zur Untersuchung der Pathogenese und pharmakologischen Intervention des Neurofibromwachstums

Sabine Hüske, Bernd Algermissen, Agnes Großewinkelmann, Basil Jamil, Uwe Müller und Hans-Peter Berlien
Abt. für Lasermedizin, Krankenhaus Neukölln, D-Berlin, lasermed@knk-berlin.de

Einleitung
Die Pathogenese der Induktion und des Wachstums eines Neurofibroms ist unbekannt. Bis zum heutigen Tage existiert kein aussagekräftiges Tier- oder *in vitro* Modell, mit dem diese Fragestellungen oder gezielte pharmakologische Testungen untersucht werden können. Im NF/HET-CAM-Modell ließen sich jedoch Vaskularisierung und Wachstum, sowie Infiltrationsverhalten der Schwannzellen in vorangegangenen Untersuchungen nachweisen. Bei histologischen Untersuchungen zum Wachstumsverhalten von Neurofibromen (NF) auf der CAM zeigte sich in der frühen Phase, d.h. vor Beginn der Vaskularisierung der NF-Probe, eine vollständige Mastzelldegranulation innerhalb der Grenzzone zwischen CAM und NF-Probe. Somit könnten die Mastzellen, die eine Vielfalt von Mediatoren (bFGF, TNF-α, VEGF) und Substanzen (Histamin, Heparin) enthalten, die direkt oder indirekt eine Induktion der Angioneogenese auslösen können, für die erste Phase des Neurofibromwachstums von Bedeutung sein. Ziel dieser Arbeit war es daher, anhand des Neurofibrom-CAM-Modells durch pharmakologische Blockade der Degranulation der Mastzellen einen direkten Einfluß der Mastzellmediatoren auf die Neovaskularisation des Tumors zu bestätigen. Hierzu wurden die beiden klinisch verwendeten „Mastzellstabilisatoren" Ketotifen und Cromoglicinsäure eingesetzt.

Material und Methode
1. Zunächst wurden die direkten Effekte im Bereich von 10nM - 100mM von Ketotifen und Cromoglicinsäure auf der CAM getestet. Die einmalige Applikation erfolgte am 6. Bebrütungstag der SPF-Eier (38,7°C, Luftfeuchtigkeit 60%). Morphologische Veränderungen über einen Zeitraum von 6 Tagen wurden dokumentiert.
2. Frisch entnommene Neurofibromproben (pro Konzentration n=5) wurden zusammen mit je 50ml der mit NaCl verdünnten Substanzen Ketotifen (1mM-10nM) und Cromoglicinsäure (100mM bis 10nM) auf die CAM transplantiert. In den Kontrollgruppen wurde lediglich 50µl NaCl appliziert. Makroskopische Veränderungen wurden über 6 Tage dokumentiert.

Ergebnisse
Die Substanzen bewirkten unter 10mM für Ketotifen und 100mM für Cromoglicinsäure keine makroskopischen Veränderungen an der CAM. In der Versuchsreihe mit Ketotifen (10nM-1000nM) sowie Cromoglicinsäure (10-100nM) zeigten die Neurofibromproben auf der CAM eine unbeeinflußte Neovaskularisation und Größenzunahme. Im Gegensatz dazu kam es nach der Applikation von 10mM Cromoglicinsäure zu einer vollständigen Blockade des Anwachsens des Tumors mit ausbleibender Neovaskularisation und damit zur Tumornekrose bei erhaltener vitaler CAM.

Diskussion/Zusammenfassung
Cromoglicinsäure im Gegensatz zum Ketotifen blockiert nach der Applikation von einer 10mM-Lösung (100mM Lösung wird klinisch zur Behandlung der allergischen Konjunktivitis eingesetzt) die Induktion der Neovaskularisation der NF-Proben. Ketotifen gilt als sehr schwacher Mastzellstabilisator und erreicht klinisch eher Antihistaminika-Effekte. In weiteren Untersuchungen müssen die Effekte der Cromoglicinsäure sicherlich analysiert werden. Diese Untersuchungen verdeutlichen aber, daß das NF/HET-CAM-Modell als zur Zeit einziges *in vivo* Modell zur Anzüchtung von Neurofibromen ermöglicht, einzelne Teilschritte der Pathogenese zu analysieren und mit diesem Wissen gezielt pharmakologische Interventionen am gleichen Modell zu untersuchen und zu entwickeln.