▶ Zusammenarbeit mit einschlägigen Publikationsorganen, nicht zuletzt z.B. ALTEX

▶ Nutzung der vorhandenen Forschungs-Aktivitäten innerhalb der Fachgesellschaften für Ersatzmethoden

▶ Berücksichtigung von auf dem Sektor Tierschutz qualifizierten Kollegen zur Herstellung einer ausgewogenen Stellenbesetzung an den Instituten

▶ Aufnahme von Alternativmethoden als Teil der Prüfungsanforderungen für die Ausbildung zum Fachpharmakologen/-toxikologen bzw. Facharzt für Pharmakologie und Toxikologie

Diese offene Annahme der Herausforderung „Ersatz von Tierversuchen" in Pharmakologie und Toxikologie ist ein wichtiger Beitrag zum Profil der Zukunft dieser Fächer.

**Literatur**


Balls, M., Blaauboer, B., Brusick, D., Frazier, J., Lamb, D., Pemberton, M., Reinhardt, C., Roberfroid, M., Rosenkranz, H., Schmid, B., Spielmann, H., Stammati, A-L. and Walum, E. (1990). Report and recommendations of the CAAT/ERGATT workshop on the validation of toxicity test procedures. *ATLA 18*, 313-337.

Balls, M. and Karcher, W. (1995). The validation of alternative test methods. *ATLA* 23, 884-886.

Goldberg, A. M., Frazier, J. M., Brusick, D., Dikens, M. S., Flint, O., Gettings, S. D., Hill, R. N., Lipnick, R. L., Renskers, K. J., Bradlaw, J. A., Scala R. A., Veronesi B., Green S., Wilcox N. L. und Curren R. D. (1993). Report on the validation and technology transfer committee on the Johns Hopkins Center for alternatives to animal testing. Framework for validation and implementation of *in vitro* toxicity tests. *Xenobiotica 23*, 563-572.

Green, S. (1993). Regulatory agency considerations and requirements for validation of toxicity. *Toxicol. Lett. 68*, 119-123.

Hartung, T. und Spielmann, H. (1995). Der lange Weg zur validierten Ersatzmethode. *ALTEX 12*, 98-103.

Curren, R. D., Southee, J. A., Spielmann, H., Liebsch, M., Fentem J. H. and Balls, M. (1995). The role of prevalidation in the test development and validation process. *ATLA 23*, 211-217.

Spielmann, H. (1996). Alternativen in der Toxikologie. In F. P. Gruber und H. Spielmann (Hrsg.), *Alternativen zu Tierexperimenten* (108-126). Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.

Spielmann, H. (1997). EU-Recht erfordert Novellierung des Tierschutzgesetzes. *Biospektrum 3*, 20.



**Korrespondenzadresse**
Dr. Dr. med. Thomas Hartung
Biochemische Pharmakologie
Universität Konstanz
D-78457 Konstanz
Tel.: +49-7531-884116
Fax: +49-7531-884117
E-mail: Thomas.Hartung@uni-konstanz.de


# OECD forciert antiquierte Tierversuche zur Prüfung auf endokrine Wirksamkeit


Roman Kolar
Akademie für Tierschutz, D-Neubiberg



Zusammenfassung
*Die OECD (Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung) plant momentan die Erstellung einer Richtlinie zur Chemikalienprüfung („Immature Rat Utereotrophic Bioassay Screening Test"), welche mithilfe von veralteten Tierversuchen die routinemäßige Prüfung auf endokrine Wirksamkeit standardisieren soll. Die vorgeschlagene Methode wird dem Umwelt- und Verbraucherschutz nicht gerecht. Andererseits existiert heute bereits eine ganze Reihe von vielversprechenden in vitro Methoden, mit deren Hilfe der Effekt von Substanzen auf Hormonsysteme, auch in Hinblick auf Wirkungsmechanismen, untersucht werden kann. Aus Sicht des Tierschutzes ist daher der OECD-Vorschlag ebenfalls inakzeptabel.*

*Summary: OECD pushes antiquated animal test for endocrine disrupting activity*
*The OECD (Organization for Economic Co-operation and Development) plans to set up a guideline for chemical testing (the „Immature Rat Utereotrophic Bioassay Screening Test") on the basis of an obsolete animal assay to standardize routine testing for endocrine disrupting activity. The proposed method will not do justice to the protection of consumers and the environment. On the other hand a number of promising in vitro methods exist that can be used to study the (also mechanistc) effects of substances on the endocrine system. Therefore, from the animal point of view, too, the OECD proposal is unacceptable.*



*Keywords: animal experimentation, animal wellfare, toxicology, endocrine disrupters, hormones, in vitro methods, replacement, refinement, OECD Guidelines*


## 1 Einleitung

Seit geraumer Zeit wird die mögliche Wirkung von Umweltchemikalien auf das Hormonsystem diskutiert (sog. *endocrine disrupting activity*). Dies ist vor allem Folge der augenscheinlichen Zunahme von Erkrankungen bei Mensch und Tier, die in Zusammenhang mit Wirkungen von Umweltchemikalien auf Sexualhormone stehen. Hierzu liegen epidemiologische Studien vor, die eine Zunahme von Störungen des Geschlechtssystems konstatieren. In Bezug auf Wildtiere stehen Mißgeburten, Verhaltensstörungen, Feminisie-

rung, Virilisierung und Infertilität im Mittelpunkt des Interesses (Holmes et al., 1998; Greim, 1998a). Soweit bekannt liegt die Wirkungsweise von *endocrine disrupters* entweder in einer - oft stimulativen - Wirkung auf körpereigene Hormone oder in einer hormonähnlichen Wirkung der Substanzen selbst.

Allerdings sind bis heute die tatsächlichen Gefahren, die von Umweltchemikalien auf Hormonsysteme ausgehen, wissenschaftlich nicht zweifelsfrei erwiesen. So wird auch die Ansicht vertreten, daß aufgrund der (insbesondere im Vergleich zu Phytohormonen) niedrigen Konzentration, in der solche Stoffe in der Umwelt vorkommen, eine Wirkung auf das Hormonsystem nicht zu erwarten ist (Greim, 1998b) bzw. die beobachteten Phänomene möglicherweise auf andere Ursachen, wie beispielsweise Ernährung und Lebenswandel zurückzuführen sind (Ashby et al., 1997).

## 2 Prüfung auf endokrine Wirksamkeit

Unabhängig von dieser unsicheren Ausgangslage fordern unter anderem Mediziner und Ökologen, daß in Zukunft für die Zulassung von Stoffen ein Unbedenklichkeitsnachweis in Hinblick auf endokrine Wirksamkeit gefordert werden soll. Die OECD ist in diesem Zusammenhang aktiv geworden und läßt momentan entsprechende Richtlinienentwurf prüfen. Es ist sicherlich diskussionswürdig, ob vor der Beratung über weltweite Richtlinien zur Routineprüfung nicht erst einmal das zugrunde gelegte hypothetische Risiko wissenschaftlich hätte abgesichert sein müssen. Denn grundsätzlich erlaubt erst der Nachweis, daß eine Gefährdung tatsächlich gegeben ist und wie sich diese im einzelnen darstellt, die Entwicklung entsprechender Testsysteme (vgl. Ashby et al., 1997; Balls et al., 1995).

Es ist aber auch nachvollziehbar, daß nicht immer erst abgewartet werden kann, bis eine Schädigung von Mensch, Tier oder Ökosystem so massiv auftritt, daß ein bestimmtes Gefahrenpotential unzweifelhaft als erwiesen gilt und seitens von Wissenschaft, Behörden und Politik entsprechende Konsequenzen ergriffen werden. Nicht zuletzt Umwelt- und Tierschutzverbände haben hier in der Vergangenheit ein schnelleres und effektiveres Vorgehen gefordert. Ein neu einzuführendes, routinemäßig und noch dazu weltweit verbindliches Testverfahren muß aber gewissen Mindestansprüchen genügen, um den Herausforderungen gerecht zu werden. Es muß auf einer soliden wissenschaftlichen Basis stehen und sollte Rückschlüsse auf Wirkungsmechanismen ermöglichen. Neben *in vitro*-Tests, werden hier auch *in vivo* Verfahren vorgeschlagen, die zum Beispiel die Messung der Aktivität und des Gehaltes an Enzymen und Hormonen beinhalten sollen (Ashby et al., 1997). Für zahlreiche schon existierende Assays, ob *in vivo* oder *in vitro*, existieren noch keine standardisierten Testprotokolle, und zudem erlauben die ihnen zugrundeliegenden Bewertungsmaßstäbe keinen objektiven Vergleich der Brauchbarkeit etablierter und neu entwickelter Methoden (Spielmann et al., 1998).

## 3 OECD-Richtlinienentwurf

Aus ethischer Sicht sind *in vivo* Methoden, selbst wenn ihnen aus wissenschaftlicher Sicht ein gewisser Wert zugesprochen wird, bedenklich. Ein von der OECD jetzt diskutiertes Testverfahren genügt jedoch in vielerlei Hinsicht nicht einmal grundlegenden wissenschaftlichen Ansprüchen. Der „*Immature Rat Uterotrophic Bioassay Screening Test*" soll die Abschätzung der östrogenen Aktivität von Chemikalien ermöglichen oder als Eingangs- bzw. Screeningtest auf endokrine Wirksamkeit dienen. Er basiert auf einem Tierversuch an Ratten oder Mäusen. Dabei wird die Testsubstanz an mindestens drei aufeinander folgenden Tagen entweder subkutan per Injektion oder oral per Magensonde verabreicht. Es werden mindestens 2 Testgruppen und 5 Kontrollgruppen eingesetzt, die aus jeweils mindestens 10 weiblichen Jungtieren bestehen. Als Endpunkt wird in erster Linie das Uterusgewicht der Tiere und das Auftreten von Abnormalitäten im Rahmen einer Autopsie bestimmt.

Die Nachteile dieses Verfahrens liegen aus wissenschaftlicher Sicht, neben der prinzipiellen wissenschaftlichen und ethischen Problematik von Tierversuchen, in einer geringen Sensitivität sowie einer mangelnden Übertragbarkeit der Ergebnisse: u.a. exprimieren Nager kein Geschlechtshormon-bindendes Globulin (*sex hormone binding globuline*, SHBG) (Spielmann et al., 1998). Darüber hinaus erlaubt es keinerlei Aussagen über Wirkungsmechanismen.

Während die OECD in einer Broschüre zu ihren *Test Guidelines* betont, daß die darin aufgeführten Methoden *state-of-the-art* sind, drängen sich diesbezüglich Zweifel auf, wenn man im Richtlinienentwurf innovative Aspekte sucht. Das Testprinzip stammt laut Richtlinienvorschlagstext aus den 30er Jahren (vgl. u.a. Lauson, 1939).[1] Das bedeutet, daß die Methode entwickelt wurde, als der überwiegende Teil biologischer bzw. chemisch-physikalischer Nachweisverfahren noch nicht bekannt war. Daß Messungen von Enzymaktivitäten und Hormonspiegeln im Richtlinienentwurf keine Erwähnung finden, braucht insofern nicht zu verwundern. Es ist von daher festzustellen, daß dieser nicht dem wissenschaftlichen Stand entspricht, auch wenn der Test weitgehend akzeptiert und etabliert sein mag.

Zudem läßt das jetzt von der OECD zu beratende Testverfahren keine fundierten Aussagen zur verläßlichen Risikoabschätzung zu. Wörtlich heißt es im Richtlinienvorschlag:

„*...this method will <u>not provide evidence for definitive claims of no effects</u> ... positive results are useful for initial hazard assessment and contribute to decisions with respect to the necessity and timing of additional testing. [...] Although, as a consequence, <u>negative data do not indicate absolute safety</u> with respect to estrogenic activity, this information may provide some reassurance if exposures were clearly less than the dose related to the No-Observed-Adverse Effect Level (NOAEL). Moreover, in the absence of data from other estrogen bioassays, <u>positive results are useful for initial hazard assessment and contribute to decisions with respect to the necessity and timing of additional testing</u>*".[2]

Da von der Methode demnach falsch negative Ergebnisse erwartet werden - dies ist bekanntlich einer der Hauptkritikpunkte an bestehenden *in vitro* Verfahren mit geringer Metabolisierungskapazität - , ist es nicht einzusehen, hierfür Tiere zu opfern, wenn Alternativmethoden zur Verfügung stehen; denn diese lassen zumindest in dem genannten Rahmen ähnliche Schlußfolgerungen zu.

## 4 Fazit

Es ist aus den genannten Gründen vollkommen unverständlich, daß ein derarti-

ger Richtlinienentwurf überhaupt zur Beratung ansteht. Insbesondere für reine Screening-Tests, die lediglich Hinweise auf weitere durchzuführende Untersuchungen liefern sollen, würde sich der Einsatz von *in vitro* Methoden anbieten (Spielmann et al., 1998; Markiewicz et al., 1993; Mayr et al., 1992; Soto et al., 1992; Soto et al., 1991; Littlefield et al., 1990). Ihr großer zusätzlicher Vorteil ist, daß sie nicht nur Aussagen darüber erlauben, ob ein Gefahrenpotential zu vermuten ist, sondern auch konkrete Hinweise auf Wirkungsmechanismen liefern.

Aus der Perspektive des Tierschutzes hat die OECD damit erneut Kredit verspielt. Allen Beteuerungen zum trotz soll wieder ein Tierversuch ohne Validierung etabliert werden, während die Anerkennung von Alternativmethoden bei der OECD durch Forderungen nach immer neuen Beweisen für deren Brauchbarkeit im Rahmen aufwendiger Validierungsstudien und Anerkennungsverfahren verschleppt wird. In einem Statement des *Chemicals Group and Management Committee* des OECD Programmes zur Kontrolle von Chemikalien heißt es, 1982: „*Every effort should be made to discover, develop and validate alternative testing systems.*" Im Fall der Prüfung auf hormonelle Wirksamkeit sind sicherlich nicht alle ensprechenden Anstrengungen unternommen worden.

Und selbst wenn nur sehr bescheidene Tierschutzmaßstäbe angelegt werden, ist die Methode inakzeptabel: So hat man die Möglichkeit, bereits existierenden Richtlinien einen zusätzlichen Endpunkt hinzuzufügen (Holmes et al., 1998), nicht wahrgenommen, sondern strebt an, der langen Liste von OECD Tierversuchs-Richtlinien eine weitere hinzuzufügen. In dem Entwurf ist auch keine Rede davon, daß möglicherweise Alternativmethoden vorgeschaltet werden könnten. Zu guter Letzt: wenn auch OECD-Verteter die 3R gern im Munde führen, so findet hier *Refinement* keinerlei Berücksichtigung.

In Kürze schreiben wir das Jahr 2000. Bis dahin will die Europäische Kommission die Zahl der Tierversuche von 1993 um die Hälfte reduziert haben. Diese Bemühungen werden durch den neuen Richtlinienvorschlag *ad absurdum* geführt, denn er wird nicht nur die Etablierung von *in vitro* Verfahren für das bezeichnete Gebiet hinauszögern, sondern zementiert dort gleichzeitig wissenschaftlich fragwürdige Tierversuche.

## Literatur


Anon. (1998). Draft OECD Guideline for Testing of Chemicals - Immature Rat Uterotrophic Bioassay Screening Test. *Unveröffentlichtes Manuskript.*

Ashby, J., Houthoff, E., Kennedy, S. L., Stevens, J., Bars, R., Jekat, F. W., Campbell, P., Van Miller, J., Carpanini, F. M. and Randall, G. L. P. (1997). The challenge posed by endocrine-disrupting chemicals. *Environmental Health Perspectives 105*, 164.

Balls, M., Blaauboer, B. J., Fentem, J. H., Bruner, L., Combes, R. D., Ekwall, B., Fielder, R. J., Guillouzo, A., Lewis, R. W., Lovell, D. P., Reinhardt, C. A., Repetto, G., Sladowski, D., Spielmann and H., Zucco, F. (1995). Practical aspects of the validation of toxicity test procedures. The report and recommendations of ECVAM Workshop 5. *ATLA 23*, 129-147.

Greim, H. (1998a). Environmental estrogens and human health. *Iutox Newsletter July 1998, 21.*

Greim, H. (1998b). Hormonähnliche wirkende Stoffe in der Umwelt - Einführung und Sachstand. *Bundesgesundheitsblatt 8*, 326 - 329.

Hammond, G. L. (1998). Molecular properties of corticoid binding globulin and the sex-steroid binding proteins. *Endocrine Revue 11*, 65-79.

Holmes, P., Humfrey, C., Scullion, M. (1998). *Appraisal of test methods for sex-hormone disrupting chemicals capable of affecting the reproductive process.* (Prepared by MRC Institute for Environment and Health for the UK Department of Environment, Transport and the Regions).

Lauson, H. D., Heller, C. G., Golden, J. B. and Sevringhaus, E. L. (1939). The immature rat uterus in the assay of estrogenic substances and a comparison of estradiol, estrone, and estriol. *Endocrinology 24*, 35-44.

Littlefield B. A, Gurpide E., Markiewicz L, McKinley B. and Hochberg R. B. (1990). A simple and sensitive microtiter plate estrogen bioassay based on stimulation of alkaline phosphatase in Ishikawa cells: Estrogenic action of D[5] adrenal steroids. *Endocrinology 127*, 2757-2762.

Markiewicz L., Garey J., Aldercreutz H. and Gurpide E. (1993). *In-vitro* bioassays of non-steroidal phytoestrogens. *J. Steroid. Biochem. Molec. Biol. 45*, 399-405.

Mayr U., Butsch A. and Schneider, S (1992) Validation of two *in vitro* test systems for estrogenic activities with zearalenone, phytoestrogens and cereal extracts. *Toxicology 74*, 135-149.

Safe, S. H. (1995). Environmental and dietary estrogens and human health: Is there a problem? *Environmental Health Perspectives 103,* 346-351.

Soto A. M, Justicia H., Wray J.W. and Sonnenschein C. (1991). p-Nonyl-Phenol: An estrogenic xenobiotic released from „modified" polystyrene. *Environmental Health Perspectives 92*, 167-173.

Soto A.M., Lin T.-M., Justicia H., Silvia R. M. and Sonnenschein C. (1992). An „in culture" bioassay to assess the estrogenicity of xenobiotics (E-screen). In: T. Colborn and C. Clement (eds.), *Chemically-Induced Alterations in Sexual Development: The Wildlife/Human Connection* (295-309). Princeton NJ: Princeton Scientific Publishing Company Inc,

Spielmann, H., Bochkov, N. P., Costa, L., Gribaldo, L., Guillouzo, A., Heindel, J. J., Karol, M., Parchment, R., Pfaller, W., Peraita, P. P., Zacharewski, T. (1998). 13th meeting of the scientific group on methodologies for the safety evaluation of chemicals (SGOMSEC): alternative testing methodologies for organ toxicity. *Environmental Health Perspectives 106, Supplement 2*, 427 - 439.



**Korrespondenzadresse**
Dipl. Biol. Roman Kolar
Akademie für Tierschutz
Spechtstr. 1
D-85579 Neubiberg
Tel. +49-89-600291-0
Fax +49-89-600291-15
E-mail:
akademie.fuer.tierschutz@muenchen.org


[1] In der Literatur zum Richtlinienentwurf sind 14 Quellen angegeben; davon stammen drei aus den 30er, eine aus den 40er, zwei aus den 50er, vier aus den 60er und eine aus den 70er Jahren. Ein Übersichtsartikel datiert von, 1996, die beiden anderen Quellenangaben verweisen auf ein und dieselbe OECD Publikation (von 1982) zur GLP (*Good Laboratory Praxis*).

[2] Unterstreichungen des Autors