

- lauf-Forschung (38–41). Wien, New York: Springer-Verlag.
- Oetliker, H., Zhang, W., Mojon, D. und Oetliker, M. (1993b) Summation und Tetanus am Menschen. In H. Schöffl, H. Spielmann und H. A. Tritthart (Hrsg.), *Ersatz- und Ergänzungsmethoden zu Tierversuchen, Band II, Alternativen zu Tierversuchen in Ausbildung, Qualitätskontrolle und Herz-Kreislauf-Forschung* (42–48). Wien New York: Springer-Verlag.
- Rieg, T., Völlm, B. und Feddersen A. (1993). *Über Leichen zum Examen?*. Bochum: Timona Verlag.
- Rieg T. und Löblein C. M. (1995a). Die rechtlichen Regelungen von Eingriffen und Behandlung an Tieren zur Aus-, Fort- und Weiterbildung, Teil 1. *ALTEX 12*, 59–69.

- Rieg T. und Löblein C. M. (1995b). Die rechtlichen Regelungen von Eingriffen und Behandlung an Tieren zur Aus-, Fort- und Weiterbildung, Teil 2. *ALTEX 12*, 123–128.
- Rusche, B. und Sauer, U. G. (1995). *Gelbe Liste: Tierversuche – Alternativen*. 4. Teil: Tierverbrauchsfreie Verfahren in der Ausbildung von Biologen, Medizinern und Veterinärmedizinern. Bonn: Köllen Druck & Verlag GmbH.
- Rusche, B. und Sauer, U.G. (1996). Tierverbrauchsfreie Verfahren in der Ausbildung von Biologen, Medizinern und Veterinärmedizinern. In F. P. Gruber und H. Spielmann (Hrsg.), *Alternativen zu Tierexperimenten* (257–270), Berlin, Heidelberg, Oxford: Spektrum Akademischer Verlag.

- Wiesendanger, M. und Durand, J. (1991). Alternativen zu Tierexperimenten im physiologischen Praktikum für Medizinstudenten an der Universität Freiburg (CH). *ALTEX Nr. 14*, 19–23

#### Danksagung

Diese Studie wurde von der Stiftung Fonds für versuchstierfreie Forschung (FFVFF), CH-Zürich, finanziert.

#### Korrespondenzadresse

Harald Schöffl  
zet – Zentrum für Ersatz- und Ergänzungsmethoden zu Tierversuchen  
Postfach 210  
A-4021 Linz

## Terminkalender

#### • ECEAE – European Congress on the Ethics of Animal Experimentation. B-Brussels, 17–18 December 1996.

Preliminary Programme: The Classical Debate: Animal Research and Animal Protection; Regulation of Animal Experimentation in Europe and Beyond; Animal Biotechnology. Workshops: Replacement, Alternatives and Regulatory Toxicology; Refinement of Animal Experiments; The Use of Primates in Experiments; Public Understanding of Animal Research. Posters are invited on following subjects: The Regulation of Animal Experimentations; Animal Biotechnology; Replacement Alternatives; Refinement of Animal Experiments; The Use of Primates in Experiments; Public Understanding of Animal Research; Improved Animal Models; General. Further Information: Congress Secretariat, BW&Partners, 9, rue du Moniteur, B-1000 Brussels (Fax +32-2-219 32 15).

#### • Zellkultur-Methoden. Kurs der Gesellschaft für Zell- und Gewebezüchtung. Technische Fachhochschule Berlin, D-Berlin, 12.2.–13.2.1997.

Sekretariat „GZG-Kurs“, Prof. Dr. Monika Gross, TFH Berlin/FB3, Seestr. 64, D-13347 Berlin (Tel. +49-30-4504-3901, Fax +49-30-4504-3959).

#### • 6. Österreichischer internationaler Kongress über Ersatz- und Ergänzungsmethoden zu Tierversuchen in der biomedizinischen Forschung. Universität Linz, A-Linz, 23.–24. Februar 1997.

Tagungsthema: Ersatz- und Ergänzungsmethoden in der chirurgischen Forschung. 1. Ersatz- und Ergänzungsmethoden in der chirurgischen Ausbildung. 2. Ersatz- und Ergänzungsmethoden in der chirurgischen Forschung. 3. Ersatz- und Ergänzungsmethoden in der Prüfung von Biomaterialien. 4. Refinement und Tierschutz. Weitere Informationen bei zet. Postfach 210, A-4021 Linz (Fax +43-5333-6248).

• **V<sup>th</sup> Symposium on Vertebrate Whole Embryo Culture. Hadassah Medical School, The Hebrew University, Jerusalem, April 1–4, 1997.** Symposium I: The Use of Preimplantation Embryos in Experimental Medicine and Genetics (Org. C. Epstein, San Francisco). Symposium II: The Use of Postimplantation Animal Embryos in Experimental Medicine and Genetics (Org. N. Brown, London, J. Picard, Belgium). Symposium III: Culture of Human Embryos (Org. N. Laufer, Jerusalem). Symposium IV: Embryonic Stem Cells (Org. H. Spielmann, Berlin). Symposium V: The Role of the Yolk Sac in Normal and Abnormal Embryonic Development and Nutrition (Org. R. L. Brent, USA). Information: Ms. Sara Sher, Division for Development and Public Relations, The Hebrew University of Jerusalem, Mount Scopus, Jerusalem 91905, Israel (Phone: +972-2-882817, Fax: +972-2-322556).

#### • 5th CFN Symposium. Effects of Toxicants on Gene Expression and Intracellular Signalling. Stockholm,

**14.–16. September 1997.** Topics: The molecular mechanisms whereby toxic and pharmaceutical agents activate intracellular signalling pathways leading to specific change in gene expression. The consequences of such activation for key aspects of cellular behaviour including apoptosis and cell cycle progression. Implications of the recent advances in the knowledge about signal transduction and control of gene expression for toxicological research and risk identification. Information: Lena Odland, Ministry of Agriculture, S-10333 Stockholm (Fax +46-810-9339).

#### • 7. Österreichischer internationaler Kongress über Ersatz- und Ergänzungsmethoden zu Tierversuchen in der biomedizinischen Forschung. 4. Jahrestagung der MEGAT – Mitteleuropäische Gesellschaft für Alternativmethoden zu Tierversuchen. Universität Linz, A-Linz, 21.–23. September 1997.

Informationen bei zet. Postfach 210, A-4021 Linz (Fax +43-5333-6248).

#### • 42nd International Congress of the European Tissue Culture Society (ETCS). Johannes Gutenberg Universität Mainz, 12.–15. Oktober 1997.

Development and Tumor Biology. Organotypical Cultures and Artificial Organs. Genetically Engineered Cells in Diagnostics and Clinic. Information bei W. Mueller-Klieser, Institut für Physiologie und Pathophysiologie, Universität Mainz, Duesbergweg 6, D-55099 Mainz (Fax +49-6131-395560, E-Mail muellerkli@vzdmzd.zdv.uni-mainz.-de)

# Nachrichten



## ECVAM Skin Corrosivity Validation Study

### Einleitung

Eine von der Oberfläche ausgehende, irreversible Schädigung des Hautgewebes nach Applikation einer Testsubstanz wird als Hautkorrosion (Verätzung der Haut) bezeichnet (OECD, 1992). Das Ätzpotential chemischer Substanzen spielt eine wichtige Rolle beim Erstellen von Sicherheitsrichtlinien für den Umgang, die Verpackung und den Transport von Chemikalien. Bei der derzeitigen Standardmethode zur Messung der Hautkorrosion und Hautirritation wird die Testsubstanz auf die rasierte Haut von Albino-Kaninchen aufgetragen und anschließend bis zu 21 Tage visuell kontrolliert, inwieweit sich nach einer bis zu vier Stunden dauernden Exposition der Testsubstanz eine irreversible, tiefgreifende Hautnekrose entwickelt.

Neue Chemikalien müssen entsprechend den internationalen gesetzlichen Bestimmungen auf ihre Hautkorrosivität geprüft werden. Die Europäische Union fordert eine Einstufung der Chemikalien in Risikogruppen (sog. R-Sätze: R34 bzw. R35). R34 enthält Chemikalien, bei denen nach vier Stunden Anwendung eine Verätzung der Haut auftritt, während dies bei R35 Chemikalien bereits nach drei Minuten der Fall ist (OECD, 1983).

Die Prüfung auf Korrosivität kann für die Labortiere mit Schmerzen und Leiden verbunden sein. Aus diesem Grund wurden verschiedene Alternativmethoden entwickelt, um ätzende Substanzen zu identifizieren.

Die aktualisierte OECD Richtlinie von 1992 stellt folgendes fest:

- „... it may not be necessary to test *in vivo* materials for which corrosive properties are predicted on the basis of results from *in vitro* tests.“
- „If an *in vitro* test is performed before the *in vivo* test, the description or reference of the test, including

details of the procedures, must be given together with results obtained with the test and reference substances.“

### Die Prävalidierungsstudie

Die von 1993 bis 1995 durchgeführte Prävalidierungsstudie zur *in vitro* Hautkorrosivitätsprüfung sollte die *in vitro* Tests bestimmen, die im Rahmen der OECD Richtlinie 404 eingesetzt werden können (OECD, 1992). Die Studie umfaßte drei Testsysteme:

- a) den *Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance* (TER) Test,
- b) CORROSITEX™
- c) den Skin<sup>2TM</sup> ZK1350 Korrosivitätstest (Botham et al., 1995), sowie die Prüfung von 50 (25 korrosive und 25 nicht korrosive) Chemikalien.

Die Prävalidierungsstudie hatte folgende Zielsetzung (Botham et al., 1995):

1. Beurteilung des TER Tests, der CORROSITEX™ und Skin<sup>2TM</sup> Methode hinsichtlich ihrer Fähigkeit, korrosive bzw. nicht korrosive Eigenschaften von definierten Testchemikalien korrekt vorherzusagen.
2. Erste Überprüfung der Interlabor-Variabilität; hierzu wurde jeder Test in zumindest zwei Labors durchgeführt.
3. Überprüfung der drei Tests im Hinblick auf den jeweiligen Stand der Optimierung, Evaluierung und Validierung.

Die Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen (Botham et al., 1995):

### Interlabor-Reproduzierbarkeit:

TER Test – 92% (2 Labors)  
CORROSITEX – 96% (2 Labors)  
Skin<sup>2</sup> – 60–80% (3 Labors)

### Konkordanz:

TER Test – 68%, 76%  
CORROSITEX – 74%, 80%  
Skin<sup>2</sup> – 70%, 80%, 92%

### Spezifität:

TER Test – 48%, 56%  
CORROSITEX – 65%, 71%  
Skin<sup>2</sup> – 76%, 76%, 88%

### Sensitivität:

TER Test – 88%, 96%  
CORROSITEX – 81%, 89%  
Skin<sup>2</sup> – 64%, 84%, 96%

### Die Validierungsstudie

Als Fortsetzung der „EU/USA International Prevalidation Study on *in vitro* Tests for Skin Corrosivity“ (Botham et al., 1995) findet zur Zeit (1996/97) die von ECVAM koordinierte Validierungsstudie statt (ECVAM, 1995), gemäß den im Bericht zur Prävalidierung enthaltenen Schlußfolgerungen und Empfehlungen.

### Ziele der Studie

1. Identifizierung der Tests, die zwischen korrosiv und nicht korrosiv unterscheiden können im Hinblick auf bestimmte Chemikaliengruppen (z.B. organische Säuren, Phenole) bzw. im Hinblick auf die einzelnen Chemikalien.
2. Feststellung, ob die Tests in der Lage sind, bekannte Chemikalien der R35/UN Verpackungsgruppe I (*packing group I*) und der R34/UN Verpackungsgruppen II und III zu identifizieren.

Folgende Tests werden bewertet: a) der *Rat Skin* TER Test, b) CORROSITEX™, c) der Skin<sup>2TM</sup>ZK1350 Korrosivitätstest und d) EPISKIN™. Entsprechend den Prinzipien, Kriterien und Vorgehensweise für Validierungsstudien, die von ECVAM zusammen mit den entsprechenden internationalen Experten festgelegt wurden, wird jeder Test in drei unabhängigen Labors durchgeführt. Sechzig (kodierte) Chemikalien werden geprüft (inkl. organische Säuren, organische Laugen, neutrale organische Substanzen, Phenole,

anorganische Säuren, anorganische Laugen, anorganische Salze, elektrophile Substanzen, oberflächenaktive Substanzen).

**TER Test**

Mit dem TER Test kann das hautätzende Potential von Testmaterialien *in vitro* bestimmt werden (Oliver et al., 1988). Die Ergebnisse tragen anscheinend zur Vorhersage von schweren Hautschäden (= Hautkorrosion) bei. In den letzten Jahren setzten einige Firmen diesen Test bereits erfolgreich routinemäßig zum „*in-house prescreening*“ ein (Botham et al., 1992). Der TER Test wurde in verschiedenen Studien unter Beteiligung einzelner oder mehrerer Labors bewertet und schnitt bei der Prävalidierungsstudie sehr gut ab (Botham et al., 1995). Basierend auf den Erkenntnissen der Prävalidierungsstudie wurde das Testprotokoll modifiziert und optimiert.

**CORROSITEX™**

CORROSITEX (*InVivo International*, Irvine, CA, USA) ist eine standardisierte, quantitative *in vitro* Methode zur Prüfung der Hautkorrosivität. Bestimmt wird die Zeit, die eine Testsubstanz benötigt, um eine biologische Membranbarriere (hier eine künstliche Kollagenmatrix) zu passieren und anschließend eine chemisch meßbare Veränderung zu erzeugen (Gordon et al., 1994). Auch dieser Test erzielte sehr gute Ergebnisse bei der 1993/94 durchgeführten Prävalidierungsstudie. In der Zwischenzeit hat das amerikanische Verkehrsministerium (US Department of Transportation, DOT) diesen Test akzeptiert (vgl. ALTEX 11, 1/94). Seine Anwendung zur Erkennung von ätzenden Substanzen ist jedoch auf bestimmte chemische Stoffklassen beschränkt. Das Testprotokoll wurde in Anlehnung an die Erkenntnisse der Prävalidierungsstudie modifiziert und optimiert.

(Wie in ALTEX 13, 2/96 berichtet, hat auch das BgVV CORROSITEX unter bestimmten Bedingungen anerkannt)

**Skin<sup>2</sup>™ ZK1350 Korrosivitätstest**

Skin<sup>2</sup>ZK 1350 (*Advanced Tissue Sciences, Inc.*, La Jolla, CA, USA) ist ein dreidimensionales Modell der menschlichen Haut und umfaßt die Haut-

schichten Dermis, Epidermis und Kornea. Für die Prüfung werden die Testsubstanzen topisch auf das *stratum corneum* (die oberste Schicht der Haut) aufgetragen (De Wever und Rheins, 1994). Auch dieser Test erwies sich als sehr gut bei der 1993/94 durchgeführten Prävalidierungsstudie und wurde ebenfalls vom DOT sowie vom kanadischen Transportministerium für die Erkennung von ätzenden Substanzen (auf bestimmte chemische Stoffklassen beschränkt) zugelassen (vgl. ALTEX 11, 4/94). Entsprechend den Erkenntnissen der Prävalidierungsstudie wurde das Testprotokoll modifiziert und optimiert.

**EPISKIN™**

EPISKIN™ (SADUC – Biomatériaux Imedex™, Chaponost, Frankreich) ist ebenfalls ein dreidimensionales Modell der menschlichen Haut (bestehend aus einer nachgebildeten Epidermis mit einem funktionale *stratum corneum*). Auch bei dieser Methode wird die Testsubstanz topisch auf das *stratum corneum* aufgetragen. Eine *in-house* Evaluierung und Prävalidierung fand von 1994 bis 1996 statt. Vor Beginn der Validierungsstudie wurde das Testprotokoll modifiziert und optimiert.

**Aktueller Stand der Arbeiten**

Planung und Konzept der Studie umfaßten 12 bis 18 Monate (Abbildung und Tabelle), im einzelnen bedeutete dies:

- a) Auswahl des Management-Teams, der Tests, der Labors sowie der Testchemikalien (mit den entsprechenden *in vivo* Daten, die bestimmte Kriterien erfüllen müssen);
- b) Optimierung der Testprotokolle und Definition von Vorhersagemodellen (*prediction models*) für die einzelnen Tests (für die Interpretation der *in vitro* Daten im Hinblick auf die Einstufung der Korrosivität und des Gefahrensatzes [R34, R35]);
- c) Handling und Analyse der Daten
- d) Training in den teilnehmenden Labors
- e) Erstellen und Abschließen der Verträge (ohne Berücksichtigung der ECVAM-internen Aufwendungen sind Gesamtkosten von ca. 500.000 ECU für die Validierungsstudie veranschlagt; jeder Teilnehmer hat einen Vertrag mit ECVAM)
- f) Kodieren und Verschicken der Chemikalien durch eine unabhängige Stelle.

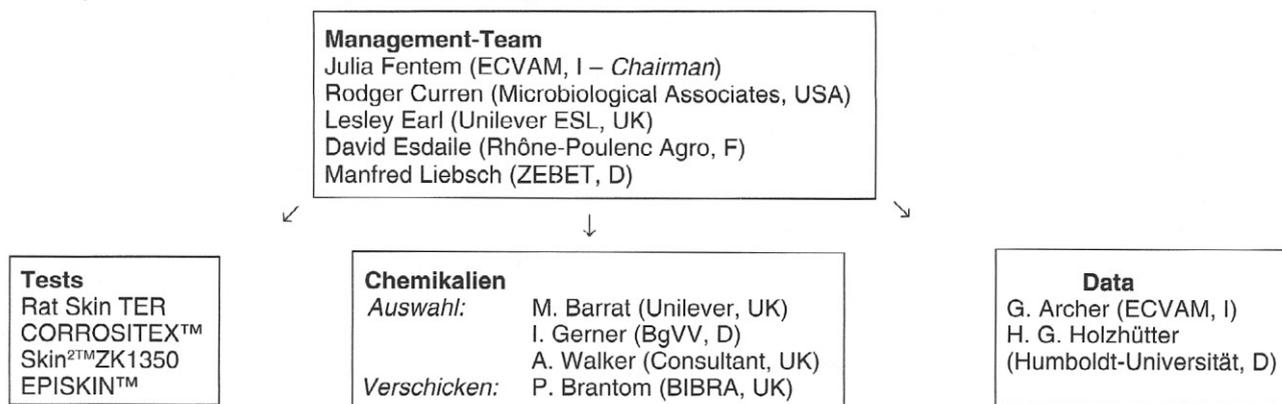
Im August/September 1996 erhielt ECVAM von den teilnehmenden La-

**Tabelle**

**Teilnehmer**

TER Test	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Unilever ESL, UK - <i>Leitlabor</i></li> <li>• Corning Hazleton (Europe), UK</li> <li>• ZENECA CTL, UK</li> </ul>
CORROSITEX™	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Microbiological Associates Inc, USA – <i>Leitlabor</i></li> <li>• Microbiological Associates Ltd, UK</li> <li>• Sanofi Recherche, F</li> </ul>
Skin <sup>2</sup> ™ ZK1350 Korrosivitätstest	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ZEBET, BgVV, D – <i>Leitlabor</i></li> <li>• BASF Aktiengesellschaft, D</li> <li>• Huntingdon Life Sciences Ltd, UK</li> </ul>
EPISKIN™	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Rhône-Poulenc Agro, F – <i>Leitlabor</i></li> <li>• Agence du Medicament, F</li> <li>• INRS, F</li> </ul>
Kodieren und Verschicken der Chemikalien	<ul style="list-style-type: none"> <li>• BIBRA International, UK</li> </ul>
Handling und Auswertung der Daten	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Humboldt-Universität Berlin, D</li> </ul>

Abbildung: Ecvam Skin Corrosivity Validation Study



bors die Daten der ersten 10 Chemikalien zur Analyse. ECVAM hofft, daß die Laborphase der Validierungsstudie – also die praktische Durchführung der Tests – Anfang 1997 abgeschlossen ist und bis Mitte 1997 der Bericht zur Validierungsstudie veröffentlicht werden kann.

Botham, P. A., Hall, T. J., Dennett, R., McCall, J. C., Basketter, D. A., Whittle, E., Cheeseman, M., Esdaile, D. J. and Gardner, J. (1992). The skin corrosivity test in vitro: results of an interlaboratory trial. *Toxicology in Vitro* 6, 191–194.

Botham, P. A., Chamberlain, M., Barratt, M. D., Curren, R. D., Esdaile, D. J., Gardiner, J. R., Gordon, V. C., Hilde-

brand, B., Lewis, R. W., Liebsch, M., Logemann, P., Osborne, R., Ponc, M., Régnier, J. F., Steiling, W., Walker, A. P. and Balls, M. (1995). A prevalidation study on in vitro skin corrosivity testing. The report and recommendations of ECVAM workshop 6. *ATLA* 23, 219–255.

De Wever, B. and Rheins, L. A. (1994). Skin2: an in vitro human skin analogue. *Alternative Methods in Toxicology* 10, 121–131.

ECVAM (1995). ECVAM News and Views. *ATLA* 23, 750–751.

Gordon, V. C., Harvell, J. D. and Maibach, H. I. (1994). Dermal corrosion, the CORROSITEX system: a DOT accepted method to predict corrosivity potential of test materials. *Alternative Methods in*

*Toxicology* 10, 37–45.

OECD (1983). Guide to the classification and labelling of dangerous substances and preparations. Criteria for the choice of chemicals indicating special risks (R phrases) and safety advice (S phrases). *Official Journal of the European Communities* L257, 13–20.

OECD (1992). *OECD Guideline for Testing of Chemicals, No. 404: Acute Dermal Irritation/Corrosion*, July 1992 (updated version of original test guideline adopted in 1981). 6 pp. Paris, France: OECD.

Oliver, G. J. A., Pemberton, M. A. and Rhodes, C. (1988). An in vitro model for identifying skin corrosive chemicals. I. Initial validation. *Toxicology in Vitro* 2, 7–17.

## OECD: Neue Richtlinie zur Bestimmung der Hautpenetration von Chemikalien mit *in vitro* Methoden in Vorbereitung

Gerade im Hinblick auf die EU-Regelung, nach der ab 1998 Kosmetika nicht mehr im Tierversuch geprüft werden dürfen, wenn anerkannte Alternativmethoden zur Verfügung stehen, ist die Nachricht über eine kurz bevorstehende Anerkennung von *in vitro* Methoden zum Ersatz von Tierversuchen von besonderer Wichtigkeit.

Nach einem sehr konstruktiven Treffen zwischen Vertretern von ECVAM, ZEBET und der OECD im Februar 1996 in Brüssel wurde ein Vorschlag formuliert, für die Prüfung auf Hautdeposition und Hautpermeation künftig auch *in vitro* Methoden zu akzeptieren. Die neue Richtlinie wird noch 1996 von Vertretern der OECD-Mitgliedsstaaten verabschiedet. Damit wird von der OECD erstmals eine *in vitro* Me-

thode auf dem Gebiet der Toxikologie akzeptiert.

Bei der *in vitro* Prüfung auf Hautpenetration wird die Testsubstanz, die auch isotope markiert sein kann, gelöst oder ungelöst auf die Oberfläche einer Hautprobe aufgetragen, die die zwei Kompartimente einer Diffusionskammer trennt. Mit hohen Probenkonzentrationen (*infinite dose*) können lagzeit und Penetrationskonstante bestimmt werden. Mit begrenzten Probenmengen (*finite dose*), die der menschlichen Exposition eher nahekommen, wird die Penetration in Prozent der eingesetzten Probenmenge über die Versuchszeit gemessen. Die Diffusionsdauer soll normalerweise 24 Stunden betragen, sie kann jedoch bei sehr schnell oder sehr langsam pene-

trierenden Substanzen von dieser Vorgabe abweichen. Die Integrität der Haut muß durch einen Probelauf mit Standardmolekülen, deren Penetrationscharakteristika bekannt sind, nachgewiesen werden. Die Metabolisierungskapazität kann auch in einem gesonderten Experiment mit frischem Hauthomogenat gemessen werden.

Der Vorteil der *in vitro* Methoden wird darin gesehen, daß Humanhaut verwendet werden kann und daß Mehrfachmessungen am gleichen Subjekt möglich sind. Wegen der limitierten Verfügbarkeit von Humanhaut müssen aber auch – mit dem entsprechenden Interpretationsspielraum – Präparate tierischen Ursprungs in die Tests einbezogen werden. Leider fehlen noch ausreichende pharmakokinetische Da-

ten und Kenntnisse über den Einfluß der peripheren Durchblutung. Sind auch Angaben zur Metabolisierung einer Prüfsubstanz erforderlich, muß stets frisch präparierte Haut verwendet werden. Entgegen dem ursprünglichen

Wunsch der Vertreter der USA und Kanadas kann in allen anderen Fällen aber auch mit konservierten Hautpräparaten gearbeitet werden. Die Einbeziehung künstlicher Hautpräparate ist im vorliegenden Entwurf leider noch

nicht enthalten. Es ist zu hoffen, daß bald künstliche Haut mit einem komplexen Aufbau zur Verfügung steht, die den OECD-Anforderungen genügen kann.

fpg

### Studie zur Notwendigkeit toxikologischer Prüfungen an Hunden bei Pflanzenschutzmitteln

Vor mehr als 10 Jahren erhob Gerhard Zbinden Kritik am Gebrauch von Hunden als zweiter Tierart zusätzlich zu Labornagetieren für die sicherheitstoxikologische Prüfung von Pflanzenschutzmitteln. Damit löste Zbinden eine kontroverse Diskussion zwischen Tierschutzkreisen und Wissenschaftlern in Industrie und Behörden aus. Mittlerweile räumen auf internationaler Ebene die für die OECD-Richtlinien Verantwortlichen dem Thema höchste Priorität ein, weil toxikologische Tests an Hunden in den meisten Industrieländern schlechthin unakzeptabel sind.

Untersuchungen über den wissenschaftlichen Wert von „Hundestudien“ sind kaum durchführbar, da die Prüfungen an Hunden von den Zulassungsbehörden vertraulich behandelt und von den Auftraggebern in der Industrie nicht publiziert werden. In der öffentlich zugänglichen Literatur sind diese

Arbeiten deshalb praktisch nicht zu finden. Das Problem ließe sich nur dadurch lösen, daß entweder die Auftraggeber oder die Zulassungsbehörden ihre „Hundestudien“ offenlegen.

Um dem Geheimhaltungsproblem auf pragmatischem Weg beizukommen, hat die deutsche Stiftung SET (Stiftung zur Förderung der Erforschung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zur Einschränkung von Tierversuchen) auf Anregung der Akademie für Tierschutz in Neubiberg beschlossen, eine Studie im Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV) zu finanzieren, in welcher der wissenschaftliche Beitrag untersucht wird, den Studien am Hund für die sicherheitstoxikologische Prüfung von Pestiziden leisten. Zwei Abteilungen des BgVV sind dabei beteiligt: der Fachbereich Pflanzenschutz- und Schädlings-

bekämpfungsmittel und ZEBET, die Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch. In der Studie werden die Prüfunterlagen von mehr als 200 Pestiziden aus den letzten 10 Jahren untersucht und bewertet.

Da deutsche Firmen zu den maßgeblichen Herstellern von Pflanzenschutzmitteln gehören, ist das erfaßte Spektrum der Zulassungen sicher repräsentativ. Die Studie soll im Verlauf des nächsten Jahres abgeschlossen und nach Vernehmlassung in nationalen Gremien 1997/98 publiziert werden. Obschon es die Vertraulichkeit der Daten nicht erlaubt, die Ergebnisse in allen Einzelheiten zu veröffentlichen, sollen diese den für die OECD-Richtlinien zuständigen Experten zugänglich gemacht werden.

hsp

### AGAATI: Advisory Group on Alternatives to Animal Tests in Immunobiologicals

Ende 1995 hat sich in Utrecht (Niederlande) unter dem Namen AGAATI eine internationale Arbeitsgruppe etabliert, die sich folgende Ziele setzt: „Das 3-R-Konzept zu propagieren und seine praktische Umsetzung voranzutreiben, insbesondere die Entwicklung und Verwendung von Alternativen zu Tierversuchen bei der Produktion und der Qualitätskontrolle von Immunbiologika.“

AGAATI beschränkt ihre Aktivitäten absichtlich auf den Bereich Vakzinen und Immunglobuline in der Human- und Veterinärmedizin. In erster Linie will die Gruppe mithelfen, die Anerkennung von *in vitro* Methoden durch Registrierbehörden zu erleichtern, vorausgesetzt natürlich, daß es sich dabei um wissenschaftlich einwandfreie Testverfahren handelt, die geeignet sind, die hohen Qualitäts- und Sicherheitsstandards für Produkte si-

cherzustellen. Bestehen für gewisse Untersuchungen noch keine Alternativen, so will sich das Gremium dafür einsetzen, daß die Durchführung der vorgeschriebenen Tierversuche höchsten ethischen und wissenschaftlichen Anforderungen genügt.

Die Mitglieder von AGAATI kommen aus verschiedenen europäischen Ländern, sie handeln in erster Linie freiwillig, aus persönlichem Interesse, und nicht als Vertreter ihrer Länder oder Organisationen. Um ihr Ziel zu erreichen, wird die Arbeitsgruppe zeitweise eine spezielle wissenschaftliche Beratung brauchen und deshalb mit offiziellen Organisationen in Kontakt treten.

In Erfüllung der selbstgestellten Aufgabe, der 3R-Forschung neue Impulse zu verleihen, wird AGAATI beispielsweise ein Inventar der gegenwärtigen Forschungsaktivitäten auf diesem Ge-

biet in verschiedenen europäischen Ländern erstellen. Damit soll die Zusammenarbeit zwischen Industrie und Registrierbehörden gefördert werden. In Kooperation mit der europäischen Pharmakopöe-Kommission will das Team jene Aspekte von Monografie-Entwürfen evaluieren, welche Tierversuche vorschreiben.

AGAATI leistet auch gerne Berater-tätigkeit, wenn es um die Anwendung des 3R-Konzepts bei der Produktion und der Qualitätskontrolle von Biomaterialien in der Human- und Veterinärmedizin geht.

Die Gruppe ist erreichbar beim Sekretariat: Margot D. O. van der Kamp  
The Netherlands Centre Alternatives to Animal Use (NCA)  
Yalelaan 17, De /Uithof  
NL-3584 CL Utrecht  
Tel. +3130 2532186, Fax +3130 2539227, e-mail: m.vanderkamp@cc.ruu.nl

## Zytotoxikologisches Labor (CTLU) in Schweden

Björn Ekwall, der sich schon seit 1983 intensiv mit *in vitro* Forschung beschäftigt, hat seine Funktionen an der Universität Uppsala aufgegeben und sich in sein privates Labor für Zytotoxikologie (CTLU) in Pavals zurückgezogen. Seine Forschergruppe wird vor allem die Programme MEIC, MEMO und EDIT weiterbearbeiten.

Das internationale Programm MEIC (*Multicenter Evaluation of In Vitro Cytotoxicity*) entstand 1989 aus der skandinavischen Gesellschaft für Zelltoxikologie, mit dem Ziel, bestehende *in vitro* Methoden und Zytotoxizitätstests zu evaluieren, bzw. zu validieren.

Das MEIC-Programm ist in erster Linie auf die akute systemische Toxizität ausgerichtet, aber andere Toxizitätsprüfungen werden ebenfalls mit einbe-

zogen, so chronische Toxizität, Haut- und Schleimhautreizungen und die verschiedenen organspezifischen Tox-Tests.

Die erhaltenen Resultate werden mit menschlichem Datenmaterial quantitativ verknüpft, um die Relevanz der Systeme zu beurteilen. Empfehlungen über einen möglichen Einbezug von *in vitro* Toxizitätstests in Batterien zum Ersatz von Tierversuchen sind schließlich das Ziel. Gleichzeitig werden vorhandene tierexperimentelle Daten verglichen, um deren Relevanz abzuschätzen.

Weitere Informationen: CTLU, Cytotoxicology Laboratory, Björn Ekwall, M. D., Pavals, När, S-620 13 Stänga, Sweden. Tel.+ 46-498-492259, Fax +46-498-492445

## Kooperationsvertrag zwischen *Triplos Inc.* und *Phase-1 Molecular Toxicology (PMT)*

*Triplos* (St. Louis, USA), der weltweit zweitgrößte Anbieter von computergestützter Modellierungssoftware, hat die Zusammenarbeit mit PMT (Santa Fe, USA) angekündigt. Letztere ist eine Dienstleistungsgesellschaft, die sich auf dem schnell wachsenden Gebiet von *in vitro* und Molekulartoxikologie spezialisieren will. Durch die Zusammenarbeit erhoffen sich beide Partner, Zeit und Kosten während der ersten Entwicklungsstufe von Pharmaka zu sparen und die Anzahl von sonst erst in Tierversuchen gefundenen untauglichen Präparaten zu reduzieren. Die Dienstleistungen, die von PMT angeboten werden, schließen integrierte molekulare und *in vitro* Assays ein. In Zusammenarbeit mit einem bestehenden Konsortium internationaler Gesellschaften, die auf präklinische und klinische Sicherheitstests spezialisiert sind, will PMT demnächst ein Hochleistungs-Screening anbieten und dieses auch auf klinische Tests am Menschen erweitern. Präsident der PMT ist Dr. Spencer Farr, vormals Professor für Toxikologie an der Harvard-Universität.

Ziel von *Triplos* ist es, *in vitro* Daten mit akzeptierten toxikologischen Verfahren zu korrelieren und zu validieren.

Parallel dazu sollen unter Zuhilfenahme von wissenschaftlichen Methoden und Struktur-Aktivitäts-Analysen Datenmodelle erstellt werden, die es erlauben, die erhaltenen Daten einer breiteren Forschung zugänglich zu machen. Aufgrund der durch den Einsatz von kombinatorischer Chemie, CADD und Hochleistungs-Screening erhöhten Rate an synthetisierten potentiellen Pharmaka sind leistungsfähige Tests für unerwünschte Nebenwirkungen essentiell. Diese Tests dauern Jahre und kosten Millionen. Hinzu kommt, daß über 90% der Substanzen, die das Tierversuchsstadium erreichen, „Versager“ sind.

In einem Positionspapier mit entsprechenden ethischen Fragestellungen hat die FDA (*Food and Drug Administration*, USA) verlauten lassen, sie werde alle Anstrengungen zur Entwicklung und Implementierung nicht-tierischer Modelle unterstützen. Außerdem bekräftigte die FDA ihren Glauben, daß solche Verfahren zu einer signifikanten Reduktion von Tierversuchen führen werden (Quelle: *Chemical Design and Automation News* (1996) 11,3, 9–10).

av

## „Der Tierschutz als Unterrichtseinheit“ Projekt der Erna-Graff-Stiftung für Tierschutz, Berlin

Für das Schuljahr 1996/97 fördert die Erna-Graff-Stiftung für Tierschutz in Berlin das Projekt „Der Tierschutz als Unterrichtseinheit“. Der Unterricht wird in Berlin an Gymnasien für die 11. bis 13. Klasse und in Berufsschulen angeboten.

Ziel des Projektes ist es, das Interesse von Jugendlichen am Leben der Tiere zu wecken. Den Schüler/innen soll Wissen über den Umgang mit Tieren vermittelt werden, damit sie sachlich diskutieren können und erkennen lernen, was für eigene Möglichkeiten sie haben, tierschützerisch zu handeln.

Die Erna-Graff-Stiftung für Tierschutz hat für das Projekt eine „Tierschutzlehrerin“ eingestellt. Frau Anke Schiller ist approbierte Tierärztin und Facharbeiterin für Tierproduktion. Sie befaßt sich seit Jahren mit Fragen des Tierschutzes. Das Projekt wird aus zweckgebundenen Spendengeldern finanziert.

Frau Schiller stellte dieses Frühjahr das Projekt in Berliner Schulen vor und stieß auf ein überaus positives Echo bei Schüler/innen und Lehrer/innen. Bei einer Meinungsumfrage zu verschiedenen Themen des Unterrichts äußerten die Schüler/innen besonderes Interesse an den Fragen „Leiden der Tiere“, „Haben Tiere Angst?“, „Was denken die Tiere?“ und „Warum werden Tierversuche durchgeführt und welche Möglichkeiten des Ersatzes gibt es?“ Das Ergebnis der Umfrage wurde bei der Ausarbeitung der Projektskizze berücksichtigt.

Seit vergangenem August führt nun Frau Schiller in Absprache mit den Lehrer/innen Unterricht zu folgenden Themen durch:

Entwicklung des Tierschutzes: wichtige geschichtliche Daten. Entwicklung der Rechtsprechung, deutsches und europäisches Tierschutzgesetz, Modelle der Mensch-Tier-Beziehung.

Kirche und Tierschutz: Stellenwert der Tiere in der christlichen Religion, Darstellung der Ansichten zum Um-

gang mit Tieren, die das abendländische Weltbild prägen

Verhalten der Tiere: verschiedene Richtungen der Verhaltensforschung, Erkennen von Äußerungen des Schmerzes und der Angst bei Tieren, das „Denken“ und „Bewußtsein“ der Tiere, ein IQ-Test für Tiere

Tierversuche und Alternativmethoden: Beispiele für Tierversuche und Alternativmethoden, Positionen von Tierexperimentatoren und Tierversuchsgegnern, Vorschriften des Tierschutzgesetzes zur Durchführung von Tierversuchen, Forschungsaktivitäten zur Entwicklung von Alternativmethoden, Institutionen, die sich für die Anerkennung von Alternativmethoden einsetzen, Vorstellung des Fachs Versuchstierkunde

Haltung von Nutztieren, Heimtieren und Wildtieren: tierartgerechte Hal-

tung, Tierrucht, Tierhygiene, Grenzen der Nutzung von Tieren, Transport und Schlachtung von landwirtschaftlichen Nutztieren, Artenschutz

Aufgrund der positiven Einstellung der Schüler/innen und Lehrer/innen zum Tierschutzunterricht und dem vorhandenen Informationsbedarf läßt das Projekt eine erfolgreiche Entwicklung erwarten. Es wird daher bereits an einer Publikation der Projektskizze und der Unterrichtsvorlagen gearbeitet, für die es dann ein entsprechendes Copyright gibt.

Anke Schiller, Barbara Grune-Wolff, Christian Laiblin, Erna-Graff-Stiftung für Tierschutz

Korrespondenzadresse: Anke Schiller, Erna-Graff-Stiftung für Tierschutz, Sieglindestraße 4, D-12159 Berlin, Telefon: +49 30 852 49 53, Fax: +49 30 852 97 43.

### Ausschreibung für den Felix-Wankel-Tierschutz-Forschungspreis 1997

Der Felix-Wankel-Tierschutz-Forschungspreis wird jedes Jahr in der Ludwig-Maximilians-Universität München für hervorragende wissenschaftliche Arbeiten verliehen, deren Ziel bzw. Ergebnis es ist bzw. sein kann, Versuche am und mit dem lebenden Tier einschließlich Eingriffe zu Aus-, Fort- und Weiterbildung einzuschränken und, soweit möglich, entbehrlich zu machen, sowie für hervorragende wissenschaftliche Arbeiten, die dem Gedanken des Tierschutzes allgemein dienlich und förderlich sein können.

Der Preis ist mit maximal DM 50.000,- dotiert, eine Aufteilung des Preises auf mehrere Preisträger ist möglich. Vorschlagsberechtigt sind wissenschaftliche Institutionen und wissenschaftliche Fachgesellschaften. Vorgeschlagen werden können Personen und Gruppen, die in der Forschung im In- und Ausland tätig sind. Eigenbewerbung ist nicht möglich. Die Arbeiten sollten neueren Ursprungs sein und eigene Forschungsarbeiten enthalten. Sie müssen im Druck vorliegen oder zur Publikation geeignet sein. Bereits anderweitig mit einem Tierschutzpreis ausgezeichnete Arbeiten werden in der Regel nicht berücksichtigt.

Mit dem Vorschlag müssen die Arbeiten in dreifacher Ausfertigung eingereicht werden. Von den Arbeiten ist zusätzlich eine Zusammenfassung von max. 5 Seiten in deutscher Sprache vorzulegen. Ein Exemplar der vorgelegten Arbeiten bleibt bei den Akten des Kuratoriums.

Die Vorschläge mit den Arbeiten müssen bis 31. Januar 1997 beim Dekanat der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität vorliegen. Über die Zuerkennung des Preises entscheidet das Kuratorium des Felix-Wankel-Tierschutz-Forschungspreises; sie erfolgt unter Ausschluß des Rechtsweges.

Weitere Auskünfte erteilt das Dekanat der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität, Veterinärstr. 13, D-80539 München, Tel. +49-89-2180-2512 bzw. das Pressereferat der Universität, Geschwister-Scholl-Platz 1, D-80539 München, Tel. +49-89-2180-3423.

### Förderpreis 1996 der Erna-Graff-Stiftung für Tierschutz

Die Erna-Graff-Stiftung für Tierschutz unterstützt Wissenschaftler bei der Förderung des Tierschutzes und der Entwicklung von Alternativmethoden zu Tierversuchen.

Die Stiftung wendet sich an Studenten und Doktoranden, die in ihrer wissenschaftlichen Arbeit folgende Gesichtspunkte berücksichtigen:

- Förderung des Gedankens einer maßvollen Nutzung von Haustieren  
Grenzen in der Nutzung unserer Haustiere; Argumente und Untersuchungen aus der landwirtschaftlichen und veterinärmedizinischen Forschung
- Entwicklung des Tierschutzgesetzes  
juristische Frage der Verbesserung der Rechtsstellung der Tiere und der Regelung von Tierversuchen in der internationalen Gesetzgebung
- Alternativen zu Tierversuchen  
Möglichkeiten des Ersatzes, der Reduktion von Tierversuchen oder der Minderung des Leidens der Tiere im Experiment

Der Förderpreis 1996 der Erna-Graff-Stiftung für Tierschutz ist mit DM 5000,- festgelegt. Interessierte Wissenschaftler werden gebeten, formlose Anträge bis zum 30.11.1996 bei der Erna-Graff-Stiftung für Tierschutz, Sieglindestraße 4, D-12159 Berlin in zweifacher Ausfertigung einzureichen. Bis zum 31.12.1996 wird über die Anträge entschieden.

Im Antrag sollen die wissenschaftlichen Ergebnisse der eingereichten Arbeit und die tierschutzrechtliche Relevanz diskutiert und dargestellt werden.

## Tagungsberichte

### Linz '96

5. Österreichischer Kongreß über Ersatz- und Ergänzungsmethoden zu Tierversuchen in der biomedizinischen Forschung. 3. Jahrestagung der MEGAT. 22.–24. September, Universität Linz, A-Linz

Trotz des kurz bevorstehenden Weltkongresses in Utrecht kamen in Linz etwa 170 Teilnehmerinnen und Teilnehmer aus den unterschiedlichsten Bereichen zusammen, um über wissenschaftliche, ethische und rechtliche Aspekte bei der Entwicklung und Einführung von Alternativmethoden zu diskutieren. Je ein Drittel kamen von Universitäten und aus der Industrie, das letzte Drittel stammte aus Tierschutzkreisen, Organisationen der Forschungsförderung und staatlichen Institutionen. Neben den 42 Referaten gab es zum Teil sehr innovative Poster zu sehen und zu diskutieren, außerdem beteiligten sich fünf Firmen an einer Unternehmenspräsentation.

Die Zusammenfassungen der naturwissenschaftlich ausgerichteten Vorträge konnten, soweit sie uns bei Redaktionsschluß vorlagen, noch in dieser ALTEX-Ausgabe untergebracht werden. Die Zusammenfassungen der Sektionen Umsetzung von EU-Recht, Tierschutz und Tierversuche – Entwicklungen und Trends sowie Gentechnologie: Recht und Ethik werden im Heft 1/97 folgen.

#### Eröffnungsvorträge:

Brigitte Rusche, D-Neubiberg:

#### Die Entwicklung von Alternativmethoden – kritisch betrachtet

Weltweit werden Tiere in vielfältiger Weise benutzt: um als Stellvertreter des Menschen mögliche Schäden von ihm abzuwenden, um wissenschaftliche Kenntnisse zu erweitern, Krankheiten zu erforschen, Behandlungsmethoden zu entwickeln oder Impfstoffe und andere Produkte herzustellen. Die damit verbundenen Eingriffe und Behandlungen am Tier sind in der Regel mit Schmerzen, Leiden und Schäden verbunden.

Bereits 1959, in einer Zeit, in der die tierexperimentelle Forschung einen Aufschwung erlebte, haben die beiden Wissenschaftler Russel und Burch in ihrem Buch „The principles of human

*experimental technique*“ auf die Notwendigkeit verwiesen, Tierversuche abzuschaffen. Ihrem Konzept der drei R liegt die Idee zugrunde, daß im Sinne des Tierschutzes jeder Beitrag, Versuchstieren Schmerzen, Leiden oder Schäden zu ersparen – sei es als *replacement*, *refinement* oder *reduction* – eine Verbesserung ist. Aus der Sicht des Tierschutzes muß jedoch deutlich gesagt werden, daß allein der Ersatz eines Tierversuches durch eine tierversuchsfreie Methode als echte Alternative anzusehen ist, wobei zuvor geprüft werden muß, ob der zu ersetzende Tierversuch überhaupt einen zuverlässigen Beitrag zur Problemlösung geleistet hat. Gerade in diesem Bereich sind durchgreifende Erfolge bislang ausgeblieben.

Anhand von konkreten Beispielen wird aufgezeigt, daß bei kritischer Betrachtung der Situation hierfür u.a. folgende Gründe auszumachen sind:

Viele Wissenschaftler und Behördenvertreter glauben nach wie vor, daß Tierversuche die am besten geeigneten Methoden zur Problemlösung sind. Während diese kaum kritisch hinterfragt werden, steht man Alternativmethoden von vorneherein skeptisch gegenüber. Bei Sicherheitsprüfungen werden Tierversuche abgehakt, und selbst solche Versuche, mit denen bekanntermaßen keine sinnvolle Aussage getroffen werden kann, sind sogar in rechtsgültigen Vorschriften verankert. Auch neue Tierversuche finden problemlos Eingang in internationale Richtlinien, während für die Einführung und Anerkennung von tierversuchsfreien Methoden schier unüberwindliche und unakzeptable Hürden genommen werden müssen und notwendige politische Entscheidungen ausbleiben.

Um hier einen entscheidenden Schritt voranzukommen, brauchen wir kompetente und engagierte Partner in der Wissenschaft, die für tierversuchsfreie Methoden eintreten, und gut informierte Politiker.

Der Deutsche Tierschutzbund hat darüber hinaus entschieden, selbst aktiv und kompetent seinen Beitrag zur Entwicklung und Anerkennung von tierversuchsfreien Methoden zu leisten. Hierfür gibt es drei Standbeine: die Gremienarbeit, die Datenbank zu Alternativmethoden und das Zellkulturlabor der Akademie für Tierschutz.

#### Hans Peter Gelbke, D-Ludwigshafen: Toxikologische Untersuchungen in der chemischen Industrie; Strategien zum verminderten Einsatz von Versuchstieren

Toxikologische Untersuchungen in der chemischen Industrie sind durch gesetzliche Vorschriften für die Zulassung und Anmeldung chemischer Substanzen eindeutig definiert. Dies betrifft nicht nur die Art der Prüfungen, sondern auch Einzelheiten ihrer experimentellen Ausführung einschließlich des Einsatzes von Versuchstieren. So werden z.B. für die Registrierung eines Pflanzenschutzmittels Prüfungen mit einmaliger bis zu lebenslanger Substanzverabreichung für die verschiedensten toxikologischen Endpunkte verlangt. Dabei müssen, je nach Betrachtungsweise, etwa 2.300 bis 7.100 Säugetiere eingesetzt werden.

Ersatz- und Ergänzungsmethoden zur Minderung des Tiereinsatzes lassen sich nach den 3R einteilen: *refinement*, *reduction* und *replacement*. Aber auch das Einbringen des gesamten toxikologischen Know Hows kann zu einer Einsparung von Tierversuchen beitragen: So können z.B. Struktur-/Wirkungsbetrachtungen einen Verzicht auf Tierversuche oder ein spezifisches maßgeschneidertes Untersuchungsprogramm nahelegen.

Es werden die Möglichkeiten für eine Reduzierung des Tiereinsatzes in der Toxikologie der chemischen Industrie für die verschiedenen Untersuchungstypen dargestellt:

- Akute Toxizität
- Reizwirkung an Haut und Auge
- Subakute bis chronische Toxizität
- Fruchtschädigende Wirkung
- Erbgutverändernde Wirkung
- Resorbierbarkeit durch die Haut

Da toxikologische Untersuchungen in der chemischen Industrie letztlich dem Schutz des Menschen vor möglichen Gefährdungen durch chemische Substanzen dienen, ist die Aussageschärfe

von Ersatz- und Ergänzungsmethoden von besonderer Bedeutung. Es werden die Stärken und Schwächen dieser Prüfverfahren im Vergleich zum klassischen Tierversuch diskutiert.

Martin Kohlpoth, D-Neubiberg:

**Kultivierung von Zelllinien in serumfreien Medien: Generelle Vorteile und spezielle Erfahrungen in einem Zytotoxizitätstest mit Fischzellen**

Den zur Kultivierung von Zelllinien verwendeten Nährmedien werden in der Regel von Tieren gewonnene Seren zugegeben, um die Versorgung der Zellen auch mit den Nährstoffen und Spurenelementen sicherzustellen, die in den Medienrezepturen fehlen. Am häufigsten wird hierfür fötales Kälberserum (FKS) verwendet. Dabei setzte sich das FKS gegenüber anderen Zusätzen nicht aufgrund der besten wachstumsfördernden Eigenschaften, sondern wegen der ständigen Verfügbarkeit und den günstigen Lagerungsmöglichkeiten durch.

Die Verwendung des FKS ist aber mit einer Reihe von Nachteilen verbunden und zudem tierschutzrelevant. Trotz aller Beteuerungen von Herstellern und Lieferanten des FKS, daß es sich ausschließlich um Produkte aus Schlachthöfen handle, wurden auch tierschutzwidrige Methoden der Gewinnung wie die künstliche Einleitung von Frühaborten dokumentiert. Serumchargen unterscheiden sich in der qualitativen und quantitativen Zusammensetzung oft erheblich. Die Zellkultivierung unter definierten und kontrollierten Bedingungen und der biotechnologische Einsatz von Zellkulturen werden so erschwert. Vor allem wegen der letztgenannten Problematik sind bereits für eine Reihe von Zelllinien spezielle serum- und proteinfreie Medien entwickelt worden. Durch die Verwendung dieser Medien werden die Kultivierungsbedingungen der Zelllinien besser standardisiert und damit die Reproduzierbarkeit von Versuchsergebnissen verbessert und die Gewinnung von Bioprodukten aus Zellkulturen erleichtert.

Die Akademie für Tierschutz ist an der Evaluierung und Validierung eines Zytotoxizitätstests mit Fischzellen als Ersatzmethode für den Fischtest im Abwasserabgabengesetz beteiligt. Bei der Prüfung von industriellen Abwas-

serproben tritt die besondere Problematik auf, daß nicht nur im Kälberserum, sondern besonders im Abwasser unbekannte Substanzen enthalten sein können, die durch unerkannte Wechselwirkungen die Ergebnisse im Test verfälschen können. Dies erschwert die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zwischen dem Fischtest und dem Zytotoxizitätstest.

Aus diesem Grund wurde die Fischzelllinie RTG-2, die als Standardzelllinie für den Zytotoxizitätstest verwendet wird, an zwei verschiedene Serumersatzlösungen adaptiert und anschließend charakterisiert. Diese Ergebnisse sowie die unterschiedlichen Reaktionen im Zytotoxizitätstest mit Referenzchemikalien und toxischen Abwasserproben werden vorgestellt.

Gleichzeitig wurde ein vollsynthetisches Medium für die RTG-2 Zellen entwickelt. Dazu wurden verschiedene Konzentrationen von Einzelkomponenten in Wachstumsversuchen geprüft und bei proliferationsfördernder Wirkung in die Medienrezeptur aufgenommen. Die RTG-2 Zellen wurden anschließend an dieses synthetische Medium adaptiert. Erste Ergebnisse der Charakterisierung werden vorgestellt.

**Gentechnologie: Transgene Tiere**

Kurt Schellander, A-Wien:

**Transgene Tiere – Herstellung, Zucht und Haltung**

Die Zusammenfassung lag bei Redaktionsschluß nicht vor

Kurt Zatloukal, A-Graz:

**Transgene Tiere für die verbesserte Erforschung von Krankheiten**

Die Zusammenfassung lag bei Redaktionsschluß nicht vor

Christoph A. Reinhardt, CH-Bertschikon-Zürich und CH-Basel:

**Der Stellenwert transgener Tiere und Zellen im Sinne der 3R**

Gentechnologische Eingriffe an Tieren und Zellen sind heute weltweit ein zentraler Bestandteil des biomedizinischen Forschungsalltags. Trotz intensiver Gespräche über Nutzen und Gefahren der Gentechnologie sind die beiden hier zu erörternden Fragen kaum ausdiskutiert.

Zur ersten Frage „Sind transgene Tiere den herkömmlichen Tierver-

suchs-Modellen vorzuziehen, im Sinne eines *refinements*?“ gibt es die zwei polarisierenden Antworten: ein eindeutiges JA aus Forscherkreisen insbesondere den USA, und ein eindeutiges NEIN aus der Sicht des Tierschutzes.

Bei der zweiten Frage „Sind transgene Zellen als Alternativen zu Tierversuchen einsetzbar?“ gibt es weniger Gegnerschaft, die Kritiker meinen, diese Technologie müsse sich jedoch noch in der Praxis bewähren. Im Bereich der Alternativen zu Tierversuchen existieren in allen deutschsprachigen Ländern sowie in der EU (DG XI Sicherheitsprüfungen, Bereich ECVAM; DG XII Forschung, Bereiche Biomedizin und Biotechnologie) verschiedene, z.T. großzügige Förderprogramme. Die Gentechnologie wurde jedoch bisher erst in Ansätzen berücksichtigt.

In einem dritten Teil wird ein Klassifizierungsmodell vorgestellt, das transgene Tiermodelle und Zellmodelle in sogenannte 3R-Klassen – von minus-3R bis plus-3R – einstuft. Zur Beurteilung des Nutzens oder wissenschaftlichen Wertes für die Gesellschaft müssen von den Projekten unabhängige, paritätisch zusammengesetzte Entscheidungsgremien gebildet werden, die ein wohldefiniertes Vetorecht von kritischen Minderheiten zulassen.

Dieser Beitrag soll aus der polarisierten Diskussion bezüglich transgener Tiere herausführen und einen konstruktiven Beitrag zur Güterabwägung zwischen Tierbelastung und menschlichem Nutzen leisten, analog zu der im englischen Sprachraum geläufigen Kosten-Nutzen-Analyse (*cost-benefit-analysis*).

**Prüfung von Biomaterialien mit *in vitro* Methoden**

Dieter Dannhorn, D-Memmingen:

**Strategien bei der biologischen Beurteilung von Medizinprodukten**

Das primäre Anliegen aller Medizinproduktehersteller ist es, möglichst schnell ein technisch ausgereiftes und in der Anwendung funktionales und sicheres Produkt auf den Markt zu bringen. Die meisten Medizinproduktehersteller sind sich auch darüber im klaren, daß ihre Produkte spätestens ab dem 14. Juni 1998 ein CE-Zeichen tragen müssen.

Im Vorfeld hierzu muß jedes Produkt einer sorgfältigen biologischen Beur-

teilung unterzogen werden, um mögliche Risiken zu erkennen und im Rahmen der Nutzen-Risiko-Abschätzung angemessen zu berücksichtigen.

Anhand der Richtlinie 93/42/EWG (Medizinprodukterichtlinie) ist es möglich, eine grundlegende Strategie zu entwerfen, die es Medizinprodukteherstellern ermöglicht, ihre bereits im Markt befindlichen Produkte oder auch neue Entwicklungsprodukte systematisch einer biologischen Beurteilung zu unterwerfen. Ausgangspunkt dieser Strategie sind Artikel 3 (Erfüllung der „Grundlegenden Anforderungen“ aus Anhang I), Artikel 5 (Verweis auf Normen und Monographien), Artikel 11 (Konformitätsbewertung in Verbindung mit den Anhängen II bis VII) und Artikel 15 (klinische Prüfungen in Verbindung mit den Anhängen VIII und X) der o.g. Richtlinie.

Es wird der Vorschlag unterbreitet, bereits in einer frühen Entwicklungsphase anhand der einschlägigen Normen und Richtlinien die Grundlegenden Anforderungen für das zu beurteilende Medizinprodukt zu erarbeiten und eine erste Risikoanalyse durchzuführen. Anschließend sollte versucht werden, durch gezielte Literaturrecherchen offene Fragen bezüglich der Sicherheit des Produktes zu klären. Erst wenn weder eigene Daten der Herstellerfirma noch übertragbare Literaturdaten vorhanden sind, sollte die Durchführung geeigneter *in vitro* oder *in vivo* Untersuchungen veranlaßt werden, um schließlich alle Grundlegenden Anforderungen abzudecken und um möglichsten, in der Risikoanalyse festgestellten biologischen Risiken angemessen zu begegnen.

Bei der Entscheidung über durchzuführende chemisch-physikalischen, biologischen und klinischen Untersuchungen ist die Beachtung der Normenreihe EN ISO 10993 sicherzustellen. Es werden Hinweise zum besseren Verständnis dieser Normen gegeben und mögliche Schwierigkeiten bei der Interpretation angesprochen.

Gottfried Schmalz, D-Regensburg:

#### **Biologische Prüfung von Dentalwerkstoffen in der Zellkultur**

Dentalwerkstoffe kommen mit lebenden Geweben von Patient und zahnärztlichem Personal in Kontakt und können eine Vielzahl von unerwünschten

Reaktionen hervorrufen. So kann die Pulpa eines Zahnes durch Füllungswerkstoffe geschädigt werden, lichenoid Veränderungen an der Mundschleimhaut können auftreten oder allergische Reaktionen ausgelöst werden. Daher ist die biologische Prüfung dieser Werkstoffe vor ihrer Anwendung in der Praxis erforderlich. Seit dem 1.1.1995 unterliegen Dentalwerkstoffe innerhalb der EU der Medizinprodukte-Direktive 93/42 und müssen nun auch formal im Rahmen einer Risikoabschätzung gegebenenfalls biologischen Prüfungen unterzogen werden. Dabei werden verschiedene *in vivo* und *in vitro* Testverfahren angewendet, wobei gemäß einem Stufensystem in der Regel Zellkulturverfahren am Beginn der Prüfungen stehen. Anzuwendende Standards sind u.a. die ISO 10993/EN-30 993-Serie, von *in vitro* Verfahren werden *tests for genotoxicity, carcinogenicity and reproductive toxicity* und *tests for cytotoxicity: in vitro methods* beschrieben. Für zahnärztliche Werkstoffe sind spezialisierte *in vitro* Tests in die Norm ISO 7405 für Dentalwerkstoffe aufgenommen worden.

Bei den Zytotoxizitätstests werden als Standardverfahren der Agar-Overlay-Test und der Filter-Test eingesetzt, andere Verfahren (z.B. Mikrotiterplatten-Tests) sind möglich, wenn sie den Rahmenrichtlinien der ISO 10993-5 entsprechen. Ergebnisse mit diesen Verfahren haben u.a. gezeigt, daß die meisten plastischen Füllungswerkstoffe vor dem Erhärten zytotoxisch, danach nicht oder gering zellschädigend sind. Ausnahmen stellen z.B. manche Werkstoffe dar, die am Dentin haften. Auch der Werkstoff Zinkoxid/Eugenol ruft in der üblichen Zellkultur eine ausgeprägte Reaktion hervor, im Zahn bei geschlossener Dentindecke schädigt er die Pulpa jedoch nicht. Daher wurden zur Beurteilung einer Pulpa-schädigung durch Füllungswerkstoffe Tierversuche (an Affen, Schweinen etc.) für erforderlich gehalten, wobei Pulpreaktionen nach Liegezeiten von bis zu mehreren Monaten histologisch untersucht wurden. Diese zeitaufwendigen und kostenintensiven Versuche werden auch aus Gründen des Tier-schutzes zunehmend kritisch diskutiert. Daher wurden sog. Dentinbarriere-Tests entwickelt, bei denen eine Dentinscheibe zwischen Füllungswerkstoff

und Zielzelle in das Testverfahren inkorporiert wurde. Allerdings können auch mit diesen Methoden kombiniert toxische und bakteriell vermittelte Langzeitwirkungen, wie sie am Patienten auftreten, bislang nicht erfaßt werden.

Entsprechend dem Konzept einer möglichst weitgehenden Simulation der *in vivo* Verhältnisse in Zellkulturen wurden Cokulturen von menschlichen Fibroblasten und Epithelzellen als Modell der Mundschleimhaut zu Testzwecken verwendet. Die Erfahrungen mit dieser Methode, wie auch beim Dentinbarriere-Test, sind jedoch noch sehr gering, und weitere Untersuchungen im Sinne einer Validierung sind erforderlich, ehe sie für die routinemäßige Anwendung empfohlen werden können.

*In vitro* Mutagenitätstests können als Gen-Mutationstest (z.B. Rückmutationstest an Bakterien, Gen-Mutationstest an Säugetierzellen), als Chromosomen-Mutationstest (z.B. Schwester-Chromatid-Austausch) oder als Genom-Mutationstest (z.B. zytogenetischer Test an Säugetierzellen) durchgeführt werden. Ergebnisse mit Dentalwerkstoffen haben gezeigt, daß sog. Dentinkleber, welche Glutaraldehyd oder andere Substanzen (Boran-Derivate oder bestimmte Comonomere) enthalten, die Mutationsrate bei Bakterien und/oder Säugetierzellen erhöhen. Eine Abschätzung der erforderlichen Konzentrationen läßt eine Gefährdung für den Patienten als eher unwahrscheinlich erscheinen, zahnärztliches Personal sollte jedoch besondere Sicherheitsmaßnahmen beim Umgang mit diesen Substanzen einhalten.

Zellkulturen haben sich in den letzten 30 Jahren als ein bewährtes Verfahren zur Abschätzung der Verträglichkeit von Dentalwerkstoffen bewährt. Allerdings ist auch durch weitgehende Simulation der *in vivo* Verhältnisse in modernen *in vitro* Tests ein vollständiger Ersatz von Tierversuchen bislang noch nicht möglich. Weitere Untersuchungen sind hier erforderlich und erfolgversprechend. Im Rahmen einer strukturierten Risikoabschätzung können Zellkulturen zudem wichtige Informationen liefern, indem sie vor allem eine mechanistische Beurteilung der Verträglichkeit von Dentalwerkstoffen ermöglichen.

Anja Bauer, Frank Bauerdick, Albrecht Poth, D-Planegg:

### Charakterisierung von Materialien als Referenzstandards für Zytotoxizitätsuntersuchungen

Materialien, die bei der Herstellung von Medizinprodukten benötigt werden, müssen toxikologisch untersucht werden. Hierfür existieren Richtlinien (z.B. ISO 10993), die den Herstellern helfen sollen, eine adäquate Aussage über die Biokompatibilität ihrer Materialien zu treffen. Der Schutz der Menschen, bei denen diese Produkte angewendet werden, ist das primäre Ziel dieser Richtlinien. Die von der Internationalen Organisation für Standardisierung (ISO) erstellten Vornormen und Normen beinhalten aber auch als ein weiteres wichtiges Ziel die Einschränkung von Tierversuchen bei der biologischen Sicherheitsprüfung von Medizinprodukten. Deshalb ist ein essentieller Bestandteil dieser Prüfungen der Gebrauch von *in vitro* Methoden, die kosteneffektive und flexible Systeme darstellen, um in einer frühen Phase der Biokompatibilitätsprüfung eine Aussage zu erhalten.

Ein wichtiger Punkt bei der Biokompatibilitätsprüfung ist die Aussage zur Toxizität. Hier existieren eine Reihe von *in vitro* Prüfverfahren (u.a. Direkt-Zell-Kontakt-Test, Agar-Diffusions-Test und Wachstumsinhibitions-Test), die mit unterschiedlichsten Zellen (Primärkulturen, permanente Zellen [z.B. V79, L929 und Balbc/3T3]) durchgeführt werden. Bei den Wachstumsinhibitions-Tests wiederum existieren unterschiedliche Bestimmungsmethoden, wie der Neutralrot-Test, der MTT-Test und die Proteinbestimmung.

Die verschiedenen Prüfsysteme sowie die unterschiedlichen Bestimmungsmethoden des Wachstumsinhibitions-Tests wurden vergleichend mit unterschiedlichen Materialien (darunter auch die zur Zertifizierung anstehenden Negativ- und Positivreferenzmaterialien für Zytotoxizitäts-Testsysteme) untersucht. Zusätzlich wurden bei den Wachstumsinhibitions-Tests, die mit den Extrakten der Prüfmateriale durchgeführt wurden, unterschiedliche Extraktionsbedingungen (in Anlehnung an die ISO 10993-12) ausgetestet. Auch die Zelllinien wurden vergleichend untersucht.

Die Ergebnisse zeigen, daß sich die verwendeten Prüfsysteme (Direkt-Zell-

Kontakt-Test, Agar-Diffusions-Test und Wachstumsinhibitions-Test) als auch die unterschiedlichen Wachstumsinhibitions-Tests (Neutralrot-, XTT- und Proteinbestimmungs-Test) materialabhängig in ihrer Sensitivität unterscheiden. Auch die verschiedenen Zelllinien zeigen materialabhängig unterschiedliche Effekte.

Die Ergebnisse belegen ebenfalls, daß die bei der ISO zur Zertifizierung anstehenden Positiv- und Negativreferenzmaterialien sich in den durchgeführten Zytotoxizitäts-Testsystemen als geeignet erweisen.

Hans Peter Klöcking, Kathrin Hoffmann, Silke Reif, Renate Klöcking, D-Erfurt:

### Grundlagen für die Anwendung des [<sup>3</sup>H]Arachidonsäurefreisetzungstests bei der Prüfung von Biomaterialien

Die zur Beurteilung der Kompatibilität von Biomaterialien bisher genutzten Zellproliferations- und Zytotoxizitätstests erlauben nur eine summarische Aussage über die Vitalität der Zellen. Zur Spezifizierung der Testaussage im Hinblick auf den Schädigungsmechanismus ist die Membrantoxizität von besonderer Bedeutung, da der Abbau von Membranphospholipiden über die Arachidonsäurekaskade zur Bildung von Entzündungsmediatoren führt, die als Ursache irritativer Gewebeschädigungen gelten.

Im Rahmen der Entwicklung biochemisch-toxikologischer Funktionstests zur Untersuchung von Biomaterialien wurden daher Grundlagen für die Anwendung des [<sup>3</sup>H]Arachidonsäure(AA)-Freisetzungstests erarbeitet.

Verwendung finden mit [<sup>3</sup>H]Arachidonsäure (AA) markierte U937-Zellen, die mit dem Biomaterial in Kontakt gebracht und nach definierten Inkubationszeiten auf die Freisetzung radioaktiven Materials untersucht werden. Das Testergebnis wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst, die bei der Bestimmung der [<sup>3</sup>H]AA-Freisetzung zu berücksichtigen sind, insbesondere von Markierungsbedingungen, Inkubationszeit und -temperatur, Qualität der Reaktionsgefäße sowie von der „Biomaterialdosierung“. Von besonderem Interesse sind die Beteiligung enzymatischer und/oder nichtenzymatischer Reaktionen an der [<sup>3</sup>H]AA-Freisetzung sowie die mögliche Diffusion von Stoff-

fen aus dem Biomaterial bei Langzeitinkubation über 24 Stunden.

Ergebnisse, die mit dem [<sup>3</sup>H]AA-Freisetzungstest an handelsüblichen Biomaterialien (Prothesekunststoffe, Gefäßschlingen, Drainageschläuche, Hüftersatz, Laparotomiekatheter und Meniskusersatz) erhalten wurden, werden vorgestellt und anhand eines Zytomembrantoxizitätsfaktors bewertet.

### Miroslav Cervinka, Vladimír Puza, Zuzana Cervinková, CS-Hradec Králové In vitro toxicity testing of biomaterials used in stomatology

The quality of medical devices within EU is regulated by Directive 93/42/EEC, which came into effect on 1 January 1995. Among more than 400.000 items covered by this Directive are also thousands of different stomatological materials. Biocompatibility is one of the main prerequisites for their clinical use. Central to the testing of biocompatibility is the estimation of cytotoxicity, which can be assessed *in vitro* by using a variety of different cell lines. Despite some inherent limitations of the cell culture techniques, they are an accurate and reliable method of predicting the cytotoxicity. The effect of materials on cellular functions and cell viability can be characterised primarily by reduced cellular proliferation, alteration in cellular morphology, and cell death. In our laboratory we are using direct, indirect and extraction methods and a brief review of our results is presented. We will introduce our new assay in 96 well plates based on subsequent measurement of cell proliferation, metabolic activity and morphology in one plate (XTT, Brilliant Blue and Giemsa staining).

### Andreas Schedle, A-Wien: Entwicklung einer Datenbank über die Biokompatibilität von Dentalwerkstoffen

Die Biokompatibilität von zahnärztlichen Substanzen findet zunehmendes Interesse bei Zahnärzten, Patienten, Sozialversicherungen, zuständigen Behörden, Normungsausschüssen, Zahn Technikern, Herstellern und benannten Stellen und wird von der Direktive 93/42/EEC über Medizinprodukte in Verbindung mit den europäischen Normen der Serie EN 30993 angesprochen.



Trotz vermehrten öffentlichen Interesses sind die Forschungsergebnisse über die Biokompatibilität von zahnärztlichen Substanzen noch immer widersprüchlich. Dies wurde auch durch zwei Forschungsprojekte (unterstützt durch das Österreichische Bundesministerium für Gesundheit und Konsumentenschutz) gezeigt: Es wurde ein Review der erhältlichen Literatur über Zellkultur- und Tierversuche zur Biokompatibilität von zahnärztlichen Substanzen durchgeführt und als strukturierte Datenbank angelegt. In dieser Studie wurde gezeigt, daß mit verschiedenen Versuchssystemen widersprüchliche Ergebnisse produziert wurden. Diese oft gegensätzlichen Biokompatibilitätsdaten von zahnärztlichen Substanzen wurden zumeist durch nicht harmonisierte und daher nicht vergleichbare Versuchsansätze ermittelt. Die Ergebnisse der meisten *in vitro* Studien sind nicht für die Risikoabschätzung von zahnärztlichen Substanzen für den Patienten verwertbar.

Die Einrichtung einer Europäischen Datenbank über die Biokompatibilität von zahnärztlichen Substanzen würde als Werkzeug dienen, um eine harmonisierte Biokompatibilitätsprüfung zu ermöglichen. Das Ziel dieses Projektes wäre, daß alle Informationen, die für die Biokompatibilitätsprüfung von zahnärztlichen Substanzen notwendig sind, als strukturierte Datenbank zur Verfügung stehen. Diese Datenbank würde wichtige Hintergrundinformationen zur Weiterentwicklung der Normen der Serie EN 30933 hinsichtlich Validierung und Standardisierung der Biokompatibilitätsprüfung im Bereich der Europäischen Gemeinschaft liefern. Durch die Weiterentwicklung und Validierung von *in vitro* Methoden hinsichtlich ihrer Einsatzfähigkeit für die Risikoabschätzung von zahnärztlichen Substanzen kann schrittweise auf Tierversuche verzichtet werden.

Zusätzlich können die im Rahmen der Studien des BMfGK ermittelten Biokompatibilitätsdaten (Zellkultur- und Tierversuche) für das europäische Zulassungssystem von Dentalmaterialien zur Verfügung gestellt werden, wodurch unnötige Tierversuche vermieden werden können.

Manfred Liebsch und Horst Spielmann, D-Berlin:

#### **Empfehlungen des ECVAM Workshops zur biologischen Prüfung von Biomaterialien gemäss der *medical device directive 93/42/EEC***

Medizinprodukte sind Stoffe, Stoffzubereitungen, Gegenstände oder Software zu medizinischen Zwecken (Diagnose, Therapie, Prävention), die überwiegend auf physikalischem Wege ihre Zweckbestimmung erreichen (z.B. Herzschrittmacher, künstliche Gelenke, Verbandmittel, ärztliche Instrumente, Bestrahlungsgeräte, mit Arzneimitteln kombinierte Medizinprodukte). Zu den Medizinprodukten gehören künftig auch *in vitro* Diagnostika.

Das Inverkehrbringen und die Inbetriebnahme von Medizinprodukten wird durch die Richtlinie 93/42/EEC neu geregelt. Inzwischen wurden in den EU Ländern mit der Richtlinie konforme, nationale Gesetze verabschiedet, z.B. in Deutschland das Medizinproduktegesetz (MPG) vom 9. August 1994. Gemäß §6 des MPG erfüllt ein Medizinprodukt die Bestimmungen des Gesetzes, wenn es den Anforderungen der jeweiligen, harmonisierten Europäischen Normen oder der diesen Normen gleichgestellten Monographien des Europäischen Arzneibuches entspricht.

Neue Medizinprodukte müssen klinisch am Menschen geprüft werden. Dies ist ethisch nur vertretbar, wenn eine Abschätzung des Risikos für die Probanden getroffen werden kann. Dazu können auch präklinische, biologische Prüfungen (*in vitro* und im Tierversuch) erforderlich sein. Normen, die diese biologischen Prüfungen für spezielle Medizinprodukte regeln (sog. Vertikal-Normen), existieren jedoch noch nicht oder sind nicht harmonisiert. Bisher wurden nur Teile der allgemeinen Horizontal-Norm EN 30933 „*Biological evaluation of medical devices*“ für die Anwendung mit der Richtlinie 93/42/EEC harmonisiert. Es besteht daher Unsicherheit, welche biologischen Prüfungen für welches Medizinprodukt erforderlich sind.

Im November 1995 fand deshalb in Dänemark der ECVAM Workshop „*Alternatives to animal testing of medical devices*“ statt. An dem Workshop beteiligten sich Vertreter der ISO-, CEN- und DIN-Gremien, Wissen-

schaftler, die in Prüfinstituten oder als zuständige Sachverständige (*notified bodies*) tätig sind, sowie ZEBET und die Akademie für Tierschutz des Deutschen Tierschutzbundes.

Neben einer ausführlichen Abwägung der Aussagekraft einzelner, speziell bei der biologischen Prüfung von Biomaterialien eingesetzter Tierversuche und der Möglichkeiten, diese durch *in vitro* Methoden zu ersetzen, wurde vor allem festgestellt, daß der derzeitige Teil 1 der EN 30933 „*Guidance for the selection of tests*“ nicht deutlich darstellt, daß es unter bestimmten Rahmenbedingungen sinnvoll ist, auf biologische Prüfungen ganz zu verzichten. Zur Vermeidung unnötiger Tierversuche wurde in dem Workshop die Erstellung einer Negativliste biologisch verträglicher Rohmaterialien und eine rasche Harmonisierung vertikaler Normen angeregt. Ständig wiederholte Tierversuche zur Chargenprüfung, insbesondere die Prüfung von Eluaten aus Biomaterialien auf anomale Toxizität, lehnten die Teilnehmer des Workshops grundsätzlich ab. Da in der EU Richtlinie 93/42/EEC Tierversuche nicht erwähnt sind, findet sich auch kein Verweis auf die anzuwendenden Bestimmungen des Tierschutzes (Richtlinie 86/609/EEC). Es wurde daher eine unverzügliche Harmonisierung des Teils 2 der EN 30933 („*Animal welfare requirements*“) gefordert.

#### **Gentechnologie: *in vitro* Methoden**

Johannes Doehmer, D-München:

#### **Gentechnologie und die 3Rs: *reduce, refine, replace***

Für präzise Antworten auf präzise Fragen bedarf es präziser Werkzeuge. Eine Forderung, die für viele Wissenschaftsbereiche gelten sollte, so auch im Bereich der Arzneimittel-Entwicklung und Arzneimittel-Sicherheit, sowie der Prüfung des toxikologischen Potentials von Schadstoffen in der Umwelt und in Nahrungsmitteln. Wie präzise Werkzeuge sein können, richtet sich in erster Linie nach den technologischen Möglichkeiten in einer gegebenen Zeit. Deshalb waren und sind Tierversuche oder Versuche mit nativem Gewebe zur toxikologischen und pharmakologischen Prüfung von Chemikalien nicht selten die einzige gegebene Möglichkeit. Erfahrungen und

Unfälle haben aber gelehrt, daß am Tier gewonnene Ergebnisse aus vielen Gründen in den meisten Fällen nicht linear auf den Menschen übertragen werden können.

Zwischenzeitlich hat sich die Gentechnologie methodisch in vielen Wissenschaftsbereichen und in der Industrie etabliert. Mit gentechnischen Verfahren ist es heute möglich, neuartige Werkzeuge zu konstruieren, die in ihrer Präzision, Verfügbarkeit und in ihrem Aussagewert für den Menschen dem Tierversuch überlegen sein können. Dies ist deshalb möglich, weil im Prinzip jede zu prüfende biologische Eigenschaft dem Grunde nach genetischen Ursprungs ist und daher unabhängig von Tierspezies und Mensch durch gentechnologische Verfahren verfügbar wird. Im Bereich der Arzneimittel-Entwicklung und -Sicherheit ist es insbesondere der Metabolismus, der darüber entscheidet, unter welchen Umständen ein Medikament wirksam, unwirksam, giftig oder nicht giftig ist. Deshalb müssen Kenntnisse über die am Metabolismus beteiligten Enzyme gewonnen werden, die Metabolite identifiziert und ihr pharmakologisches und toxisches Potential bestimmt werden. In erster Linie geht es um Cytochrome P450, die initial die Metabolisierung einleiten und deren Produkte die primären Metabolite liefern. Besser als in jedem Tiermodell lassen sich die Cytochrome in sogenannten heterologen Expressionssystemen untersuchen. Dazu ist deren Klonierung erforderlich, die Konstruktion eines Expressionsvektors und der Transfer in eine geeignete kultivierte Zelle, die sowohl Bakterien-, Hefe-, Insekten- oder Säugtier-Zelle sein kann. Die Art der gentechnologischen Konstruktion und die Biologie der Wirtszelle bestimmen, wie und wozu dieses System eingesetzt werden kann. Daher ist jedes dieser Systeme ein optimales Werkzeug für bestimmte Fragen. Allen heterologen Expressionssystemen gemeinsam ist die Verfügbarkeit der Cytochrome P450 in unbegrenzten Mengen. Dies ist besonders wichtig für die Cytochrome P450 des Menschen, für deren Präparation aus praktischen und ethischen Gründen qualitativ hochwertiges Gewebe, wie beispielsweise Leber, für experimentelle Zwecke nur in sehr begrenztem Maße verfügbar ist. We-

gen zum Teil gravierender Unterschiede im katalytischen Verhalten tierischer und humaner Cytochrome P450 sind humane Cytochrom P450 exprimierende Systeme besonders geeignet, Ergebnisse mit hohem prädiktivem Wert für den Menschen liefern zu können.

Mit der Entwicklung gentechnologischer Testsysteme und im Vergleich zu Tierversuchen hat sich an mehreren Beispielen gezeigt, daß es nicht nur eine ethische, sondern auch eine wissenschaftlich begründete Forderung zum Ersatz von Tierversuchen gibt. Die Anwendung der Gentechnologie zielt dabei ganz besonders und originär auf das anspruchvollste der 3R, das *replace*, in seiner Absolutheit, Tierversuche gänzlich zu vermeiden. Visionär ist die Vorstellung, daß eine integrale Verknüpfung verschiedener gentechnologisch und nicht gentechnologisch entwickelter Testsysteme die Frage nach der *in vivo* Situation am Menschen ohne Tierversuche ersetzen kann. Dabei sind noch zwei wesentliche Forderungen in Zukunft zu erfüllen. Zum einen verfügen wir noch nicht über eine ausreichend umfangreiche Palette gentechnologisch entwickelter Systeme und zum anderen sind die Schnittstellen zwischen verschiedenen Systemen noch lange nicht von allen Beteiligten akzeptiert. So wird immer wieder behauptet, mit primären Hepatozyten – und seien es auch humane – könnten alle wissenschaftlichen Probleme zum Arzneimittel-Metabolismus und zur Toxizität gelöst werden. Abgesehen von ihrer örtlich und zeitlich äußerst beschränkten Verfügbarkeit, kann der native Differenzierungszustand von Hepatozyten in Kultur aus fundamentalen biologischen Grundsätzen nicht zeitlich und umfänglich unbegrenzt aufrecht erhalten werden. Mit einem einzigen System, wie den primären Hepatozyten, können nicht alle Fragen beantwortet werden.

Die anderen beiden Forderungen der 3R, *reduce* und *refine*, implizieren immer noch die Verwendung von Tieren. Hier stellt sich die Frage, inwiefern durch gentechnologische Verfahren Tiere mit besonderen Eigenschaften „konstruiert“ werden dürfen und sollen, mit denen unter Umständen die Anzahl der Versuchstiere reduziert und trotzdem aussagekräftige Ergebnisse

erzielt werden können. Die Notwendigkeit dieser Überlegung ergibt sich in dem Maße, wie Eigenschaften immer noch *in vivo* getestet werden müssen, weil die *in vitro* Methoden noch zu wenig entwickelt sind, um die *in vivo* Situation beurteilen zu können.

Hille Gieschen und M. Hildebrand, D-Berlin:

#### **Humane Cytochrom P450 exprimierende V79 Zellen als angewandtes Modell im Arzneimittelmetabolismus**

Die Identifikation von Abbauprodukten eines neuen Wirkstoffs sowie der dafür verantwortlichen Enzyme ist ein wichtiger Teil der Arzneimittelentwicklung. Ein Großteil dieser Abbauprodukte (Metaboliten) wird durch verschiedene Cytochrom P450 Enzyme (CYP) in der Leber gebildet. Eine stabile heterologe Expression bietet die permanente Verfügbarkeit individueller Enzyme. Dieser Gesichtspunkt kommt insbesondere bei humanen Enzymen sowie bei CYP von aufwendig zu haltenden Großtieren zum Tragen.

Der frühzeitige Einsatz solcher Systeme wie die von uns verwendeten V79 Zelllinien hilft einerseits bei der Planung von Probandenstudien im Hinblick auf Interaktionen mit anderen Wirkstoffen, andererseits auch bei der Auswahl geeigneter Tierspezies für toxikologische und pharmakokinetische Studien, denn die hier eingesetzten Tierspezies sollten ein dem Menschen ähnliches Metabolitenspektrum bilden. Eine zusätzliche Einsatzmöglichkeit solcher Expressionssysteme ist die Metabolitenproduktion zur Identifikation von Metaboliten.

Expressionssysteme für bestimmte CYP450 können nur Informationen über einzelne Schritte im Biotransformationsweg sowie über Interaktionen auf molekularer Ebene geben. Das Zusammenspiel verschiedener Leberenzyme in der Biotransformation kann durch andere *in vitro* Systeme, z.B. isolierte Zellfraktionen, Hepatozyten oder Leberschnitte, untersucht werden. Die tatsächlichen Verhältnisse im gesamten Organismus können aufgrund ihrer Komplexität andere Ergebnisse liefern als die *in vitro* Untersuchung.

In diesem Beitrag werden Beispiele aus der Anwendung von humanen CYP exprimierenden V79 Zelllinien im Arzneimittelmetabolismus gezeigt. Ein be-

sonderer Schwerpunkt ist die Identifikation von Substraten für CYP2D6, da 5-10% der weißen Bevölkerung für dieses Enzym eine genetische Defizienz aufweist. Bei betroffenen Menschen können im empfohlenen Dosierungsbereich eines CYP2D6-abhängig metabolisierten Wirkstoffs deutliche Nebenwirkungen auftreten.

Zusätzlich wird die Untersuchung von Interaktionen zwischen Modellsubstraten und Entwicklungssubstanzen sowie die Aufklärung von Inhibitionsmechanismen an einzelnen Enzymen gezeigt. Durch Inhibition können die Wirkdauer und der therapeutische Effekt eines Arzneimittels verstärkt sowie die Verweilzeit im Organismus verlängert werden. Dieser Effekt erlangt bei Langzeitanwendung eines Wirkstoffs Bedeutung, wenn dieser seinen eigenen Metabolismus hemmt oder bei gleichzeitiger Applikation eines zweiten Arzneistoffs, der dann nur verlangsamt abgebaut werden kann.

Vor der Etablierung eines solchen Modells sind zusätzlich noch folgende Punkte zu überdenken. Die Herstellung und Validierung solcher Zelllinien ist sehr zeit- und kostenaufwendig. Zusätzlich ist die Akzeptanz solcher Expressionssysteme bei den Zulassungsbehörden erst in der Diskussion.

CYP450-exprimierende V79-Zellsysteme sind im Bereich der Arzneimittelbiotransformation ein neuartiges Werkzeug mit Möglichkeiten, die *in vivo* nicht gegeben waren. Dieses *in vitro* Modell ist mit *in vivo* Systemen nicht direkt vergleichbar und daher kein Ersatz. Eine sinnvolle Kombination mit anderen *in vitro* Systemen und *in vivo* Studien kann in einer frühen Phase der Arzneimittelentwicklung hinsichtlich Strukturaufklärung, Voraussage von zu erwartenden Hauptmetaboliten und Interaktionen relevante Erkenntnisse liefern, die zur Reduktion von Tierversuchen beitragen.

Uwe Fuhr und M. Zaigler, D-Köln:  
**Prüfung metabolisch bedingter Arzneistoff-Interaktionen mit *in vitro* Systemen**

Wechselwirkungen zwischen Arzneistoffen auf der Ebene des Metabolismus sind die häufigste Ursache für pharmakokinetische Interaktionen. Solche Interaktionen können, wenn sie unerwartet auftreten, im Einzelfall le-

bensbedrohliche Intoxikationen oder aber die Wirkungslosigkeit einer Therapie verursachen. Daher müssen zur Zulassung eines neuen Wirkstoffes entsprechende Informationen verfügbar sein. Wenig untersucht, aber vielleicht ebenso bedeutsam sind akut nicht offensichtliche metabolisch bedingte Interaktionen, die das langfristige Nutzen/Risiko-Profil eines Therapieschemas, z.B. in der Onkologie, in interindividuell unterschiedlichem Maß beeinflussen können.

Die Prüfung auf metabolisch bedingte Interaktionen kann prinzipiell an isolierten Enzymen oder an Enzymgemischen, an zellulären Systemen mit einzelnen oder vielen Enzymen, an Organen bzw. Organteilen oder aber am intakten Organismus vorgenommen werden. Diese Hierarchie steigender Komplexität gilt gleichermaßen für Versuchstiere wie für den Menschen. Durch die raschen Fortschritte der Gentechnologie hat sich die Verfügbarkeit von humanen Enzymen und das Verständnis der Interaktionsmechanismen wesentlich erweitert. Während früher oft genug das Auftreten von metabolischen Interaktionen beim Patienten der Anlaß für eine Erforschung der Ursachen in weniger komplexen Systemen war, oder im Tierversuch beobachtete Interaktionen hinsichtlich ihrer Übertragbarkeit auf den Menschen bewertet werden mußten, kann dieser Lernprozeß heute meist umgedreht werden.

So kann bei der Entwicklung einer neuen Substanz primär unter Verwendung spezifischer *in vitro* Systeme geprüft werden, ob diese Substanz eine Wirkung auf die Aktivität der wesentlichen fremdstoffmetabolisierenden Enzyme haben kann. Dabei können zur Prüfung auf eine hemmende Wirkung zellfreie Zubereitungen eingesetzt werden, wogegen zur Prüfung einer Induktion zelluläre Systeme mit intakten Regulationsmechanismen verwendet werden müssen. Mit derartigen *in vitro* Versuchen kann zumindest ein wichtiger Hinweis auf mögliche metabolische Interaktionen *in vivo* mit denjenigen Arzneistoffen erhalten werden, die Substrate der untersuchten Enzyme sind. Dazu ist für die Beurteilung einer beobachteten Inhibition die Berücksichtigung der Enzymkinetik für Substrat und Hemmstoff von wesentlicher

Bedeutung. Vergleiche unserer Arbeitsgruppe zwischen der inhibitorischen Wirkung von Pharmaka auf das Cytochrom P450-Enzym CYP1A2 in humanen Lebermikrosomen und dem Ausmaß pharmakokinetischer Interaktionen *in vivo* zeigen darüber hinaus, daß negative *in vitro* Befunde den Verzicht auf *in vivo* Untersuchungen rechtfertigen können. Umgekehrt ist durch die heute routinemäßig durchgeführte Identifikation der für den Abbau einer neuen Substanz kompetenten Enzyme der Einfluß bekannter Inhibitoren und Induktoren dieser Enzyme auf die Kinetik dieser Substanz ableitbar.

Der Einsatz gentechnologisch hergestellter isolierter Enzyme oder mikrosomaler Enzymgemische mit spezifischen Markerreaktionen ist dabei im Einzelfall abzuwägen. Erwartungsgemäß werden nach bisherigen Erkenntnissen in der Regel für beide *in vitro* Systeme ähnliche Affinitäten der Substrate oder Inhibitoren zu den Enzymen nachgewiesen. Die Erfahrung zeigt jedoch, daß in der Vergangenheit als spezifisch beschriebene Methoden zur Aktivitätsbestimmung einzelner Enzyme in mikrosomalen Enzymgemischen oft nur deshalb spezifisch waren, weil nicht alle möglicherweise beteiligten Enzyme geprüft werden konnten.

Ausgeprägte Speziesunterschiede in den Abbauwegen von Fremdstoffen, in der Expression und in der Substratspezifität einzelner fremdstoffmetabolisierender Enzyme lassen die Übertragbarkeit von Daten zu metabolisch bedingten Arzneistoffinteraktionen aus Tierversuchen auf den Menschen ohnehin als problematisch erscheinen. Bei konsequenter Anwendung der verfügbaren *in vitro* Systeme mit humanen Enzymen können heute Tierversuche zu metabolischen Arzneistoffinteraktionen in den meisten Fällen als entbehrlich eingestuft werden.

Heyo K. Kroemer, D-Stuttgart  
**Predictive value of expression systems for drug metabolism in man: comparison to other *in vitro* methods**  
 It is widely accepted that drug metabolism introduces a great deal of variability to the dose concentration relationship in man. Identification and characterisation of the enzymes involved using *in vitro* experiments contributes to our understanding of interindividual

variability in drug response and may in the long term enable individualisation of doses. Moreover, *in vitro* drug metabolism studies may enhance safety during drug development since the metabolic pattern of a new compound and the contribution of various pathways to total clearance can be assessed prior to the first administration to man.

Numerous techniques are available to study *in vitro* drug metabolism. Human liver microsomes allow to estimate oxidative metabolism in a quantitative manner. A clear disadvantage of this system is the lack of non-microsomal drug metabolising enzymes. Moreover, regulation aspects (eg induction) cannot be studied in this system. A particular powerful tool for the latter aspects are human hepatocytes. This system, however, is not widely available and has several problems in handling. Finally, human drug metabolising enzymes can be expressed in suitable systems giving the unique opportunity to study the enzyme kinetics of a single enzyme. From our point of view the different *in vitro* systems are complementary in their results and should therefore be used simultaneously.

Predictive studies of drug metabolism in man using *in vitro* experiments have so far been restricted to oxidative metabolism. Future investigations should address the potential of predicting phase-II (eg glucuronidation) and phase-III (action of  $\beta$ -glucuronidase) drug metabolism using the above techniques. In summary *in vitro* studies are a useful tool to predict drug metabolism in man.

### **Ist ein Verzicht auf Tierversuche für Kosmetika ab dem 1.1.1998 in der EU möglich?**

Irmela W. Ruhdel, D-Neubiberg:  
**Tierversuchsfreie Kosmetik: Die Positivliste des Deutschen Tierschutzbundes und andere Listen**

Als der Deutsche Tierschutzbund vor ca. 16 Jahren die Kosmetik-Positivliste zur Abschaffung weiterer Tierversuche für Kosmetik ins Leben rief, war vielen Verbrauchern noch unbekannt, daß auch für Kosmetika und deren Inhaltsstoffe Millionen von Tieren in Versuchen ihr Leben lassen müssen. Mittler-

weile brachte der Großteil der Bevölkerung durch viele Aktionen und Proteste klar zum Ausdruck, daß er kosmetische Produkte, für die immer noch zahlreiche Tiere gequält und getötet werden, nicht akzeptiert. Doch solange es kein vollständiges gesetzliches Verbot von Tierversuchen im Bereich der Kosmetik gibt, kann sich der tierschutzbewußte Verbraucher beim Kauf nur an dem orientieren, was Kosmetikfirmen oder Tierschutzorganisationen, die sich dieser Problematik angenommen haben, aussagen.

Verbraucher werden häufig von wohlklingenden Werbeaussagen verwirrt, die jedoch meist nur die halbe Wahrheit enthalten. So schließt z.B. die Aussage „Produkt nicht im Tierversuch getestet“ nicht aus, daß die verwendeten Inhaltsstoffe oder andere Produkte des Herstellers in Tieren geprüft wurden bzw. werden.

Für Verbraucher ist es daher besonders wichtig, von wirtschaftlich unabhängigen Institutionen wie Tierschutzorganisationen Orientierungshilfen für den Kosmetikkau an die Hand zu bekommen.

Der Deutsche Tierschutzbund begann vor mehr als 16 Jahren als erste Tierschutzorganisation weltweit mit der Erstellung einer Positivliste für Kosmetika, um einen Beitrag zur Abschaffung der ethisch nicht vertretbaren Tierversuche zu leisten und um dem Tierschutz zugetanen Verbrauchern die Möglichkeit zu geben, kosmetische Mittel zu wählen, die ab einem bestimmten Zeitpunkt tierversuchsfrei entwickelt und hergestellt wurden.

Inzwischen haben auch andere Tierschutzorganisationen Listen in Umlauf gebracht, wobei sich zwei verschiedene Bewertungsprinzipien für die Erstellung etabliert haben: zum einen die Festsetzung eines Stichtages, ab dem keine Tierversuche für das Produkt und die Rohstoffe durchgeführt werden dürfen, und zum anderen eine flexible Regelung, bei der der Hersteller nur in den jeweils letzten fünf Jahren tierversuchsfrei herstellen muß.

In dem Vortrag wird ein Überblick über die unterschiedlichen Kosmetik-Positivlisten gegeben, es werden die unterschiedlichen Kriterien beleuchtet, die zur Erstellung dieser Listen herangezogen werden, und eine Wertung aus

der Sicht des Tierschutzes und der Verbraucher vorgenommen.

### **Jochen Spengler, D-Darmstadt: Möglichkeiten und Grenzen der Prüfung von Kosmetika mit *in vitro* Methoden aus der Sicht der kosmetischen Industrie**

Aus Sicht der Körperpflegemittelindustrie sind Tierversuche zu Prüfungen der Haut- und Schleimhautirritation, der perkutanen Penetration, der *in vitro* Genotoxizität und der Photoirritation ersetzbar. Andere toxikologische Prüfparameter, insbesondere zum Ersatz des Draize-Tests, zur Sensibilisierung, zur Langzeittoxizität, zur Reprotoxizität, zum Metabolismus, zur *in vivo* Genotoxizität sind zur Zeit nicht oder nur zum Teil ersetzbar. Die Körperpflegemittelindustrie verzichtet auf Tierversuche zur Absicherung der kosmetischen Fertigprodukte. Dies setzt voraus, daß Chemikalien ausreichend toxikologisch-dermatologisch charakterisiert sind. Eine Chemikalie kann nur dann als geeigneter kosmetischer Inhaltsstoff angesehen werden, wenn die Sicherheit und die Eignung für den Einsatzzweck nachgewiesen wurden. Dafür sind die Rohstoffhersteller im Rahmen ihrer chemikalien- und gefahrstoffrechtlichen Prüfverpflichtungen und gemäß Produkthaftung verantwortlich.

Zur Absicherung des kosmetischen Fertigprodukts und zur Rohstoffauswahl verwendet die Körperpflegemittelindustrie routinemäßig *in vitro* Testmethoden. Das irritative Potential kann zuverlässig im RBC-, NRU-, HET/CAM-Test oder durch Prüfungen an rekombinierten Hautkulturen oder Organkulturen erkannt werden. Bei Prüfungen im NRU-Test mit definierter ultravioletter Bestrahlung lassen sich auch mögliche phototoxische Reaktionen erkennen. Zusätzliche genotoxische Fragestellungen können mit den verfügbaren *in vitro* Mutagenitätstests abgeklärt werden. Mit der perkutanen Permeationsprüfung an isolierten Säugerhäuten ist eine Risikoabschätzung zur systemischen Belastung möglich. Mit dem Nachweis, daß keine Inhaltsstoffe, bzw. nur geringe unwirksamen Mengen, durch die Haut penetrieren, werden weiterführende toxikologische Prüfungen überflüssig. Wenn hautreizende, sensibilisierende, systemtoxi-

sche, fruchtschädigende und erbgutverändernde Wirkungen sicher ausgeschlossen werden können, wird empfohlen, unter Berücksichtigung der GCP-Grundsätze, die Lokalverträglichkeit des kosmetischen Mittels an Humanprobanden zu prüfen. Die Grenzen der *in vitro* Prüfungen von Kosmetika liegen weniger in den chemisch-physikalischen Eigenschaften der Fertigprodukte als vielmehr in der fehlenden offiziellen Anerkennung der Prüfmethoden und der aufgezeigten Prüfstrategie.

Wolfgang Pittermann, Claudia Molitor, Manfred Kietzmann und Fatima Sterl, D-Düsseldorf und D-Leipzig:

**Der Einsatz von *in vitro* Toxizitätsprüfungen (Bovine Udder Skin Model, „isolierte Rinderkornea“)**

Ersatzmethodenkonzepte unter Verwendung von Hautgewebszellen und abiotischen Systemen zur Beurteilung der Hautverträglichkeit wurden in den letzten Jahren mit unterschiedlichem Erfolg entwickelt. Eine besondere Schwierigkeit liegt einerseits in den komplexen Strukturen des *stratum corneum* und seiner differenzierten Penetrationsfähigkeit, aber auch im pathophysiologischen Ablauf von Hautreizungen. Eine Voraussetzung für den Start jeder Hautreaktion stellt bis zu einem gewissen Grad die Keratolyse dar, d.h. eine oberflächliche Veränderung des *stratum corneum*. Das Endergebnis der topischen Einwirkung von Fremdstoffen auf die Haut wird jedoch in unterschiedlichem Umfang von physikochemischen Substanzeigenschaften, der Einsatzkonzentration sowie der lokalen Bereitstellung von Mediatorsstoffen im betroffenen Gewebe bestimmt.

Unter den bekannten *in vitro* Modellen verfügen das „isoliert perfundierte Rindereuter“ (Bovine Udder Skin – BUS-Modell) als natürliches Hautmodell und die „isolierte Rinderkornea“ (oder Korneabildungen anderer Tierespezies) über echte bzw. modellhafte Hornschichtstrukturen.

Im BUS-Modell laufen die toxischen Hautreaktionen komplex und unter Beteiligung verschiedener Zellsysteme quasi unter *in vivo* Bedingungen ab. Das Modell der „isolierten Rinderkornea“ (exp. Durchführung: Scantox Germany, D-Osteroda) basiert hinge-

gen, wie viele andere *in vitro* Tests auf einem phänomenologischen Ansatz, ist also nicht „mechanistisch“. Diese Untersuchung ist bisher als Ersatzmethode für die Beurteilung der Schleimhautverträglichkeit bekannt.

Beurteilt werden jedoch nicht – wie in den Ringversuchen „isolierte Rinderkornea“ – allein die Korneatrübung, sondern bevorzugt die oberflächlichen Kornealstrukturen. Die Bewertung wird zunächst in klinischer Adspektion unter Verwendung von Fluoreszeinlösung und später mit histologisch präparierten (H&E-gefärbten) Schnitten durchgeführt. Der Vorteil dieser Vorgehensweise liegt in einer möglichen Differenzierung der Korneaveränderungen, der Dokumentation sowie der Vergleichbarkeit der einzelnen Ergebnisse unter verschiedenen Applikationsbedingungen.

Im Referat werden das BUS-Modell und sein Einsatz zur Bestimmung der Hautverträglichkeit wie auch die Biologie und Morphologie der Reaktionen der „isolierten Rinderkornea“ als organische Zellsysteme im Zusammenhang mit Substanzprüfungen vorgestellt.

Grazyna Kempka, Hans-Werner Vohr, Hans-Jürgen Ahr, Eckhard von Keutz, Gerhard Schlüter, D-Wuppertal:

**Phototoxizität von Fluorochinolonen im *in vitro* 3T3 Zellmodell im Vergleich zu *in vivo* Experimenten**

Phototoxische und photoallergische Reaktionen finden zunehmend Interesse in der Dermatologie und bei der Entwicklung neuer Pharmaka und Kosmetika. Eine Vielzahl von *in vivo* und *in vitro* Modellen wurde zur präklinischen Untersuchung des phototoxischen Potentials neuer Wirkstoffe vorgeschlagen. Bei Fluorochinolonen, einer wichtigen Klasse hochwirksamer Antibiotika, sind phototoxische Reaktionen eine bekannte Nebenwirkung sowohl im Tiermodell als auch bei Patienten. Es bestehen jedoch erhebliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Fluorochinolonen in der Ausprägung dieser Effekte. Zur Auswahl neuer Entwicklungskandidaten aus dieser Stoffklasse war es somit entscheidend, in einem einfachen *in vitro* Modell nicht nur eine qualitative, sondern auch eine quantitative Bestimmung des phototoxischen Potentials der Substanzen durchzuführen.

Aus diesem Grund wurde das bereits validierte Maus 3T3-Modell benutzt. In diesem wurde eine Vielzahl von Kandidaten vergleichend untersucht und nach zwei Kriterien eingeordnet: nach EC<sub>50</sub>-Wert und nach der UV-Dosis.

Einige Fluorochinolone wurden zur Validierung auch *in vivo* bezüglich der Photoreaktion an Meerschweinchen und Ratten getestet. Es ergab sich eine gute Übereinstimmung zwischen der *in vitro* und der *in vivo* ermittelten Rangordnung. Die Experimente *in vivo* an Ratten ergaben weiterhin, daß die untersuchten Fluorochinolone kein photoallergisches Potential besitzen.

Somit steht mit dem 3T3-Test ein *in vitro* System zur Verfügung, das auch eine zuverlässige quantitative Einstufung des phototoxischen Potentials von Fluorochinolonen erlaubt und erfolgreich bei der Kandidatenauswahl eingesetzt werden kann.

Jürg Meier, CH-Basel:

**Kosmetika ohne Tierversuche – ist das Wünschbare auch machbar?**

Die 6. Änderung der EG-Kosmetik-Richtlinie (76/768/EWG) vom 14. Juni 1993 (93/35/EEC) untersagt, bei verschärften Sicherheitsanforderungen, ab dem 1. Januar 1998 den Einsatz von Inhaltsstoffen und Kombinationen von Inhaltsstoffen in kosmetischen Mitteln, falls diese nach jenem Datum in Tierversuchen geprüft wurden. Sollten bis zu diesem Zeitpunkt keine wissenschaftlich validierten Alternativmethoden zu Tierversuchen zur Verfügung stehen, kann das Verbot für einen Zeitraum von mindestens zwei Jahren hinausgeschoben werden. Die EG-Kommission wacht (nach Artikel 4 Absatz 1, i der Richtlinie) „insbesondere über die Entwicklung, Validierung und rechtliche Anerkennung der Versuchsmethoden, für die keine lebenden Tiere verwendet werden“. Weil die erhobene Forderung aus der Sicht von Politikern, Verbraucherschutz- und Tierschutzorganisationen von Seiten der Industrie nicht wunschgemäß rasch in die Praxis umgesetzt wird, sieht sich letztere dem Vorwurf ausgesetzt, mit mangelndem Einsatz an der zugewiesenen Aufgabe zu arbeiten. Der Vortrag zeigt auf, welche zum Teil sich diametral entgegenstehenden Forderungen und Erwartungen der beteiligten Interessengruppen die zur Zeit bestehende Polarisierung

rung hervorgerufen haben und welche Rahmenbedingungen geändert bzw. welche Positionen geräumt werden müßten, damit das Wünschbare – der Verzicht auf Tierversuche für Kosmetikprodukte – auch machbar wird.

Thomas M. Bayerl, D-Würzburg:

**A highly sensitive *in vitro* method for measuring dermal delivery and percutaneous absorption kinetics of unlabelled chemicals: The time-resolved infrared ATR-technique**

A novel *in vitro* method for studying the permeation kinetics of all components of a pharmaceutical or cosmeceutical formulation through excised human skin or through keratinocyte layers on a solid support is presented, employing time resolved attenuated total reflection infrared spectroscopy. The method allows a fast simultaneous determination of the complete permeation kinetics of all formulation components without relying on any labelling of the chemicals. The experimental setup is designed to give the experimenter complete control over external parameters like temperature, humidity and nutrition medium composition. Furthermore, qualitative and quantitative information about the metabolism of the applied chemicals on their way through the skin can be obtained. Some examples will be discussed that demonstrate the sensitivity of the method to measure the permeation kinetics of unilamellar vesicles through human skin and through cultured keratinocyte layers. Other examples will show the effect of permeation enhancers and of different formulations of pharmaceutically active substances.

Karin Müller-Decker, Thomas Heinzlmann, Gerhard Fürstenberger, Friedrich Marks, D-Heidelberg:

**Proinflammatory eicosanoid release in irritated human skin and human keratinocytes *in vitro*: Validation of an *in vitro* skin irritancy test**

Based on the concept of keratinocyte activation an *in vitro* skin irritancy test has been developed. As test parameters the release of proinflammatory eicosanoids and interleukin-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ) from human keratinocytes is measured. To validate these endpoints for their relevance and reliability, a clinical study was performed.

In an initial phase, individual response doses of chemicals such as sodium dodecylsulfate, benzalkonium chloride, triethanolamine, phenol, cyclohexanol, ethanol, glycerol, tween 80, and propylene glycol leading to intense erythemas were determined by applying the chemicals under occlusion onto the volar aspect of the forearms of 12 healthy volunteers. In a subsequent challenge phase the chemicals were applied onto untreated skin of the upper forearms and the profiles of proinflammatory mediators (arachidonic acid, prostaglandins E<sub>2</sub>, D<sub>2</sub>, F<sub>2 $\alpha$</sub> , LTB<sub>4</sub>, 5-, 12-, 15-Hetes, and IL-1 $\alpha$ ) were determined in suction blister fluids. IL-1 $\alpha$  was quantitated by enzyme-immuno-assay, eicosanoids by gas chromatography/mass spectrometry using [<sup>18</sup>O]<sub>2</sub>-eicosanoids as internal standards. Erythema formation and changes of trans-epidermal water loss indicating a disturbed barrier function were measured for all nine compounds. Our results indicate that irritation of human skin apparently corresponds to AA mediator release from human keratinocyte cultures. Therefore, this parameter may be suitable for the development of a novel *in vitro* test which is based on mechanistic considerations.

Horst Spielmann, D-Berlin

**Sind Tierversuche für die sicherheitstoxikologische Prüfung von Kosmetika nach dem 1.1.1998 in der EU noch erforderlich?**

Die 6. Änderung der EU Kosmetik Richtlinie (76/768/EEC) vom 14. Juni 1993 sieht ein generelles Verbot des Inverkehrbringens von kosmetischen Mitteln vor, bei denen Bestandteile oder Kombinationen von Bestandteilen nach dem 1. Januar 1998 im Tierversuch geprüft worden sind. Bis zum Wirksamwerden des Verbotes müssen die erforderlichen Ersatzmethoden entwickelt und diese sowie bereits vorhandene Methoden auf internationaler Ebene validiert werden. Falls Entwicklung und Validierung bis zum 1.1.1998 nicht erreicht werden können, sieht die 6. Änderung der Kosmetikrichtlinie vor, das Datum für das Inkrafttreten des Verbotes nach Anhörung des Wissenschaftlichen Kosmetikausschusses (*Scientific Committee on Cosmetology/ SCC*) zu verschieben.

Seit 1993 hat die EU über das europäische Validierungszentrum ECVAM verschiedene Validierungsstudien mit dem Ziel des Ersatzes sicherheitstoxikologischer Tierversuche für den Kosmetikbereich gefördert. Das geschah in enger Kooperation mit dem Europäischen Herstellerverband für Kosmetika (COLIPA) in Brüssel und mit nationalen Zentren für die Entwicklung und Validierung von Alternativmethoden wie z.B. FRAME und ZEBET. Die für den Verbraucherschutz zuständigen DG XXIV der EU in Brüssel muß dem Europäischen Parlament und dem Ministerrat der EU bis Ende 1996 bzw. vor dem 1.1.1997 darüber Rechenschaft geben, ob und welche Tierversuche zur sicherheitstoxikologischen Prüfung von Kosmetika vom 1.1.1998 an durch validierte, tierversuchsfreie Methoden ersetzbar sind. Auf zwei Expertenanhörungen, die im Februar und Juli 1996 bei der DG XXIV in Brüssel stattfanden, zeichnete sich folgende Lösungsmöglichkeit ab:

Vom 1.1.1998 an dürfen Kosmetik-Fertigprodukte, die in der EU vermarktet werden, nicht mehr im Tierversuch geprüft werden. Obwohl dies der rechtlichen Lage in Deutschland seit 1987 entspricht, ist diese Regelung innerhalb der EU als Fortschritt zu werten, da nach Informationen der DG XXIV im Jahre 1995 noch in England, Frankreich und Österreich Tierversuche mit Kosmetik-Fertigprodukten durchgeführt wurden. Zum Ersatz der für Kosmetika üblichen Tierversuche wird für die einzelnen Tierversuche der folgende zeitliche abgestufte Rahmen angestrebt:

- Hauptpenetration 1998
- Hautreizung, Korrosivität und Phototoxizität 1998/99
- Augen- und Schleimhautreizung nicht vor dem Jahr 2000.

Dieser Zeitplan ist nur bei erfolgreichem Abschluß der derzeit laufenden Validierungsstudien einzuhalten. Bei den übrigen toxikologischen Tests wird die Entwicklung und Validierung tierversuchsfreier Methoden noch länger dauern, das gilt auch für die Prüfung auf sensibilisierende Eigenschaften an der Haut.

## INVITOX 96-Workshop: *In vitro* Methoden in der Toxikologie

Papendal/NL, 24.–28.6.1996

Alle zwei Jahre treffen sich *in vitro* Toxikologen an einem internationalen INVITOX-Workshop zum wissenschaftlichen Gedankenaustausch. Auch diesmal waren es gut 100 Teilnehmer, die sich im niederländischen Sportzentrum Papendal bei Arnhem einfanden. Das Rahmenprogramm hatte der Hauptorganisator Bas Blaauboer traditionsgemäß den lokalen Begebenheiten und Sehenswürdigkeiten angepaßt. Dabei waren der Apero in der kalifornischen Wüste und ein im wörtlichen Sinne rauschendes Festessen im tropischen Regenwald (des Zoos von Arnhem!) denkwürdige Höhepunkte.

Am ersten Abend trat **Aalt Bast** (Amsterdam) als Eröffnungsredner mit einer kritischen Analyse des allgemeinen Tagungsthemas unter dem Titel „Warum *in vitro*?“ auf. Seine treffende Anekdote über das Wesen von *in vitro* Toxikologen ist nennenswerter als sein fachlicher Beitrag zur Herztoxikologie von Elektroden-implantierten Mäusen: Beim Anblick eines über seinem Haus vorüberziehenden Ballons und einem kurzen Frage-Antwortspiel mit den Balloninsassen schloß er messerscharf, daß dies *in vitro* Toxikologen sein mußten, denn: Sie wußten nicht, wo sie sind; sie wußten nicht, wohin sie treiben; und sie hatten vergessen, woher sie kamen!

Die wissenschaftlichen Beiträge konzentrierten sich diesmal auf folgende Themen: 1. Biotransformation, 2. Biokinetisches Modellierung, 3. Neurotoxikologie, 4. Neue Technologie-Anwendungen, 5. Zelluläre Streßreaktion und Apoptose und 6. Menschliche Hautkulturen für die Kosmetikprüfung.

1. Die von José Castel (Univ. Valencia) kompetent geleitete Session über Biotransformation begann mit einem interessanten Beitrag von **Sonja Beken** (Vrije Univ. Brüssel). Sie stellte mit dreidimensionalen Leberzellkulturen in Gelatine, mit sogenannten Immobilization- und Sandwich-Kulturen fest, daß die Stoffwechselfähigkeiten (Glutathion-S-Transferase) über mehrere Wochen erhalten bleiben. Für eine breitere Anwendung als Routinetest, zum Ersatz etwa von chronischen Prüfungen zur Leberschädigung, müssen jedoch

noch die Applikations- und Waschprobleme gelöst werden. **Eva Brittebo** (Univ. Uppsala) gab dann eine Übersicht über *in vitro-in vivo* Korrelationen und die Voraussagekraft von *in vitro* Metabolismusstudien. Die Bindung der Metaboliten einiger halogenierter Benzene an verschiedene Zielgewebe (z.B. Lunge, Riechepithel, Herz, Blutgefäße) kann im allgemeinen gut vorausgesagt werden; für die Abschätzung der gewebe-spezifischen Empfindlichkeit müssen jedoch mindestens die lokalen Konzentrationen der Aktivierungs- bzw. Inaktivierungsenzyme, die Enzymkinetik und der Glutathiongehalt bekannt sein. In zehn weiteren Beiträgen und Posters wurde der Stoffwechsel in Leber-, Blasen- und Hautzellen detailliert dargestellt.

2. Die Session Biokinetisches Modellierung, moderiert von Annalaura Stammati (Gesundheitsamt Rom), befaßte sich mit den heutigen Möglichkeiten der Berechnung von Verteilungsmustern verschiedener Stoffe im Körper. Eingangs brachte **John Frazier** (US Air Force) die damit verbundenen Schwierigkeiten auf den Punkt, indem er eine Verwendung von *in vitro* Daten für das *in vivo* Modellierung noch als verfrüht einstufte, da die Extrapolation (am Beispiel von Cadmium in Leberzellen) von *in vitro* zu *in vivo* mathematisch noch kaum faßbar sei. Er plädierte deshalb für eine empirische Vorgehensweise, blieb der Zuhörerschaft aber die Erklärung schuldig, wie dies denn praktisch machbar wäre. **Brian Houston** (Univ. Manchester) sprach demgegenüber von Erfolgen bei den sogenannten *physiologically-based pharmacokinetic* (PB-PK) Modellen. Für eine stetig wachsende Anzahl von Chemikalien und Arzneimitteln kann nun aus verschiedenen *in vitro* Systemen mittels eines Extrapolationsfaktors (scaling step) eine Voraussage der Leberbelastung (*clearance*) im Rahmen von 50–200% des Realwertes gemacht werden. Eine quantitative Angabe ist bei hoher Belastung (*low clearance*) jedoch noch schwierig. **Michael Gülden** und **Hasso Seibert** (Univ. Kiel) entwickelten ein PB-PK-Modell mittels Daten über Proteinbin-

dung, Fettlöslichkeit und Fett/Wasser-Partition, das erlaubt, die effektiven *in vivo* Wirkkonzentrationen aus *in vitro* Daten (EC<sub>50</sub>-Werte aus Zytotoxizitätstests) für einige wenige Testsubstanzen abzuschätzen. Ganz konkret zeigten **Joost de Jongh** und **Bas Blaauboer** (Univ. Utrecht) anhand von Toluene, wie aufwendig die Simulation der *in vivo* Belastung wird, wenn man die Datenbasis aus verschiedenen *in vitro* Systemen vergleicht. Ihr PB-PK-Modell konnte in fünf von sechs Fällen die *in vivo* Belastung (Aufnahme und Metabolismus in der Ratte) erfolgreich aus den *in vitro* Daten simulieren.

3. Die Session Neurotoxikologie wurde von Christoph Reinhardt betreut und begann mit drei Übersichtsreferaten. Zur Spezies-Spezifität nikotinischer Acetylcholin-Rezeptoren zeigte **Henk Vijverberg** (Univ. Utrecht) die verwirrende Vielfalt verschiedener Subtypen und deren Empfindlichkeit auf Blei und verschiedene Insektizide. Dank gentechnologischer Methoden kann er diese Rezeptoren aus Hirnzellen des Menschen oder der Heuschrecke jetzt in Frosch-Eizellen studieren. Er betonte einschränkend, daß wir im Falle von chronischen Bleivergiftungen über die neurotoxische Wirkung auf Rezeptoren in verschiedenen Regionen des Gehirns noch kaum etwas wußten und eine Extrapolation aus seinen *in vitro* Studien deshalb noch lange nicht möglich sei. Als Ziel für neurotoxische Wirkung wurde von **Marina Marinovich** (Univ. Milano) das zelluläre Zytoskelett in Abhängigkeit von Kalzium studiert. Das zytosolische freie Kalzium moduliert dabei die Actinfilamente und damit wohl auch das Auswachsen der Nervenfortsätze und die Neurotransmitter-Abgabe. Die als Neurotoxine bekannten Organozinne (etwa aus Bootsfarben) scheinen diese Prozesse so zu stören, daß ein Teil der Neurone *in vitro* abstirbt. Ein Screening-System für solche Gifte ließe sich damit aufbauen. **Christoph Reinhardt** (SAAT, Swiss Alternatives to Animal Testing, Zürich) gab anschließend eine Übersicht über eigene und weitere neue Ansätze, um die Blut-Hirnschranke in Zellkulturen zu simulieren. Die hoch-

spezialisierten Blutgefäßzellen des Gehirns lassen nur gezielt Nährstoffe und Ionen durch, um die Homöostase des Gehirns zu gewährleisten. Diese Barriere wird durch Gliazellen und wohl auch Nervenzell-Faktoren aufrechterhalten. Speziell das MDR-System (*Multi Drug Resistance*) ist von besonderer pharmakologischer und toxikologischer Bedeutung; durch aktives Ausschleusen werden Fremdstoffe, aber auch potentielle Therapeutika vom Gehirn ferngehalten. Eine *in vitro* Simulation dieser Barriere steht nun kurz vor der Praxisreife.

4. Neue Technologie-Anwendungen bildeten das Thema einer heterogenen Session, die von Diethmar Schiffmann (Univ. Rostock) und Greet Schoeters (Vito, Belgien) geleitet wurde. Fluoreszenz-Methoden zur Bestimmung von pH, Membranpotential und Kalziumgehalt wurden vorgestellt, genauso wie Oberflächen-Antigene von Zellen des Immunsystems, Zytokinen und Zellkommunikationssystemen. Letztere wurden im hervorragenden Vortrag von **Hiroshi Yamasaki** (*Internat. Agency for Research on Cancer, Lyon*) speziell in Zusammenhang mit der Krebsentstehung gebracht. Schon lange wußte man, daß Krebszellen ihre interzelluläre Kommunikation aufgeben, d.h. keine sogenannten *Gap junctions* (GJ) mehr besitzen. Heute ist die ganze Kaskade vom GJ-Gen bis zum GJ-Kanalprotein für einige Gewebetypen bekannt. Nicht zuletzt dank gentechnologischer Methoden ist nun eine Gentherapie in Sicht, die defekte GJ in Krebszellen heilen soll. Für andere toxikologische Probleme wie Mißbildungen und Neuropathien könnten ähnliche Mechanismen eine zentrale Rolle spielen.

5. Für Aussenstehende waren die beiden Hauptvorträge dieser von Franceline Marano geleiteten Morgensession über Zelluläre Streßreaktion und Apoptose schlicht ungenießbar. **Marc Pallardy** (INSERM Paris) berichtete mehrheitlich im Abkürzungs-Fachjargon über seine offensichtlich erfolgreichen Studien über glucocorticoide Streßproteine, die verschiedene Streßgene (*Heatshock*-Proteine, GC-GR, p59, CYP-40), Onkogene (c-fos, c-jun) und sogenannte Killergene (CT LL-2, c-myc) einschalten. Diese Kaskade führt zu einer besonderen Form von

programmiertem Zelltod, der Apoptose, die bei entwicklungsbiologischen Prozessen, bei der Krebsentstehung und in der zellulären Toxikologie grundlegend wichtig ist. Der nächste Redner, **Wilfried Bursch** (Universität Wien), kam aus der Hochburg der Apoptoseforschung und malträtierte die Ohren seiner Zuhörer derart, daß man seinen Ausführungen besser draußen vor der Tür folgte. Er studierte die krebsauslösenden Faktoren TNF-a und TGF-b1 beim Lebertumor der Ratte, einem Tiermodell, das zwar seit Jahrzehnten in der Toxikologie gebraucht wird, dessen Relevanz für das Verständnis menschlicher Tumore aber zweifelhaft ist. Eine Erholung war danach der Vortrag von **Miroslav Cervinka** (Medizin, Fakultät, Hradec Králové, Tschechien), der zwei einfache Zellmodelle (HepG2-Hepatomazellen, L929-Fibroblasten) einsetzt, um ein Screeningsystem für Apoptose-auslösende Arzneimittel wie Zytostatika aufzubauen.

6. Die mit Spannung erwartete Schluß-Session über Menschliche Hautkulturen für die Kosmetikprüfung leitete Dianne Benford souverän. **Roland Roguet** (L'Oréal, Paris) gab zuerst eine Übersicht über die heutigen, weit fortgeschrittenen Kulturmöglichkeiten von menschlichen Hautzellen wie Keratinozyten, Melanozyten, Langerhanszellen, sowie von organotypischer Haut. Letztere bereitet in längerfristigen Kulturen noch größere Probleme, wenn alle wichtigen Zelltypen in ihrer Funktion erhalten bleiben sollen. **Jacqueline Southee** (*Microbiological Associates, Stirling U.K.*) sprach dann von den technischen, juristischen und ethischen Problemen, die bei der Verwendung von menschlicher Haut (gespendet aus Amputationen und von Verstorbenen) anstehen. Die WHO und der Europarat haben kürzlich Richtlinien dazu herausgegeben, und die EU-DGXII fördert diese Forschungsrichtung namhaft. Dies nicht zuletzt um durchzusetzen, daß nach der EU-Richtlinie 76/768/EEC eine Prüfung von Kosmetika ab 1.1.1998 doch noch ohne Tierversuche realisiert werden könnte. Auf dem Gebiet der Hautreizung und Penetration sollte dies mittels menschlicher Hautpräparationen nun möglich sein.

Die meisten Tagungsteilnehmenden stellten eigene Kurzbeiträge und Poster vor, die traditionsgemäß einen wichtigen Teil der Fachdiskussionen ausmachten. Die besten drei Poster wurden auch diesmal prämiert, wobei infolge der sehr hohen Qualität der rund 80 Poster die Auswahl wirklich schwer fiel. Ein Teil der wissenschaftlichen Beiträge wird in einem speziell redigierten Tagungsband publiziert (Benford et al., 1997).

Anläßlich dieses INVITOX-Workshops fand erstmals eine Jahrestagung der neuen Dachgesellschaft der europäischen *In vitro* Toxikologen, ESTIV, statt. Die zukünftigen INVITOX-Workshops werden nun unter der Ägide von ESTIV durchgeführt, aber mit demselben wissenschaftlichen Komitee; ein Wiedersehen wird also beim nächsten INVITOX-Workshop 1998 in England, diesmal unter der Leitung von Diane Benford, möglich sein.

Weitere Auskünfte über den INVITOX 98-Workshop und über ESTIV (*European Society for In vitro Toxicology*) bei Dr. D. Benford, ESTIV-Secretariat, Robens Institute, University of Surrey, Guildford, Surrey GU2 5XH, U.K. (Tel. +44-1483-25 92 04; FAX +44- 1483-50 35 17, e-mail D.Benford@surrey.ac.uk).

Benford, D., Castell, J., Marano, F. and Reinhardt C.A. (Eds.)(1997). INVITOX 96 Special Issue. *Toxicology In vitro* Vol 9/2 (in press).

car

## Buchbesprechungen

### SATIS-Studie '95. Erfassung des Tierversuchs und des Einsatzes von Alternativmethoden im Studium an deutschen Hochschulen

Corina Gericke, Birgit Völlm, Timo Rieg, Markus Keller, Bundesverband SATIS e.V. (Hrsg.). Stuttgart, 1996, 367 Seiten im DIN A4 Format. Preis DM 98,-.

Dieses umfangreiche Werk liefert eine detaillierte Dokumentation obligatorischer Pflichtpraktika in den Fachbereichen Biologie, Human- und Veterinärmedizin, in denen mit Tierversuchen gearbeitet wird bzw. wurde (Stand 1993/94). Gleichzeitig gibt es einen Überblick über Verzicht- und Ausweichmöglichkeiten, sowie über konkret angebotene tierversuchsfreie Praktika oder Praktikusteile in den Fächern Morphologie, Physiologie, Chirurgie und Versuchstierkunde. Die Studie kann als Basis für ergänzende und aktualisierende Folgeuntersuchungen dienen. Vor allem aber will sie die breite Diskussion zum Thema „Tierversuche und Tierversuch in der Ausbildung“ beleben und versachlichen.

In Deutschland sind „Eingriffe oder Behandlungen zur Aus-, Fort- oder Weiterbildung“ von der Genehmigungspflicht ausgenommen; entsprechend entfällt eine behördliche Begutachtung, insbesondere hinsichtlich der Unerläßlichkeit eines Versuches. Obwohl die wissenschaftliche und rechtliche Verantwortung für Tierversuche allein bei den Lehrenden liegt, teilen die Lernenden doch die moralische Verantwortung (siehe dazu die ethischen Richtlinien der schweizerischen Akademien der medizinischen Wissenschaften und der Naturwissenschaften, 1995). Das Experimentieren mit zuvor getöteten Tieren gilt nicht als Tierversuch; dennoch findet auch hier ein Tierversuch statt, der moralisch begründungsbedürftig ist. Diese Situation hat in den letzten 10 Jahren dazu geführt, dass ca. 30 Gerichte zur Frage der studentischen Beteiligungspflicht an Tierversuchen beschäftigt wurden.

Der Respekt vor der Gewissensfreiheit einzelner müßte eigentlich die Möglichkeit zur tierversuchsfreien Ausbildung und ein Angebot an Alternativkursen beinhalten; dies jedenfalls meint die Hessische Landestierschutzbeauftragte in ihrem Grußwort zum vorliegenden Buch. Wie aber sieht die Wirklichkeit aus?

Mit Fragebögen wurden 262 Praktika der Studiengänge Biologie (171), Human- (68) bzw. Veterinärmedizin (23) erfaßt und untersucht. Befragt wurden die Praktikumsleiter, teilweise auch Studierende. Damit wurden 86% aller relevanten Pflichtpraktika berücksichtigt und das Schicksal von jährlich 78'856 Tieren nachgezeichnet: 4'023 (ca. 5%) werden lebend eingesetzt und fallen potentiell unter den Schutz von § 10 TierSchG (Anzeigepflicht, Beschränkung auf das unerläßliche Mass). 60'276 Tiere werden vor dem Versuch eigens für das Praktikum getötet (ca. 75 %, davon 1/4 Wirbeltiere, 3/4 Wirbellose), 14'557 werden aus anderen Gründen getötet (ca. 20%).

Das Buch gliedert sich in 4 Kapitel plus Anhang. Im ersten kurzen Kapitel (8 Seiten) werden methodische Angaben bezüglich der Datenerhebung und der Auswertung gemacht. Kapitel 2 (40 Seiten) gibt einen statistischen Überblick über bundesweite Ergebnisse; dieser rein quantitative Teil ist besonders aufschlußreich für diejenigen, die sich für den zahlenmäßigen Tierversuch an deutschen Hochschulen interessieren und für den prinzipiellen Aufbau biomedizinischer Studiengänge (bezogen auf Tierversuche) sowie für einen groben Vergleich der Fachbereiche Biologie, Medizin und Tiermedizin. In 13 übersichtlichen Tabellen wird man erstaunlich umfassend ins Bild gesetzt.

Kapitel 3 bildet den Hauptteil der Studie (ca. 200 Seiten). Er dient v.a. denjenigen, die sich für eine konkrete Studienrichtung bzw. Institution interessieren. Das Kapitel ist nach Fachbereichen gegliedert (Biologie, Humanmedizin, Tiermedizin): Pro Bereich wird einleitend eine 2- bis 5-seitige Zusammenfassung in Textform gegeben, in der die wichtigsten Ergebnisse hervorgehoben werden (als Lektüre für allgemein Interessierte ausreichend). Es folgen für jede Hochschule 2 Übersichtstabellen (Praktika bzw. jährlicher

Gesamttierverbrauch), sowie die einzelnen Beschreibungen jedes erfaßten Praktikums mit vielfältigen Detailinformationen, inklusive angebotenen Ausweichmöglichkeiten, angebotenen und geplanten Alternativmethoden (teilweise Tabellen, teilweise Text). Trotz immenser Datenfülle ist dieses Kapitel sehr übersichtlich gestaltet und bezüglich der Entstehung jeder Information transparent. Dank ausführlicher Tabellen-Legenden, Kopfzeilen und Marginalien, sowie farblicher Hervorhebungen ist dieses Kapitel gut als Nachschlagewerk zu benutzen.

Kapitel 4 (55 Seiten) enthält unter dem Titel „Ausblick“ eine Auflistung bereits angewandter und möglicher Alternativmethoden. Die Gliederung folgt den Lerninhalten (Morphologie, Herz-/Kreislauf-Physiologie, Pharmakologie, Operationsübungen etc.). Hier läßt die Übersichtlichkeit etwas zu wünschen übrig, man muß sich durchblättern. Nützlich hingegen sind die Bezugsadressen, sowie Angaben über Institute oder Hochschulen, die eine bestimmte Methode als Ersatz oder Ergänzung eingeführt haben. Der Appendix enthält die beiden Fragebogen (Morphologie, Physiologie), Hochschuladressen, eine Tiersystematik und ein Glossar.

Die Diskussion der Ergebnisse beansprucht in diesem dicken Buch gerade gut 2 Seiten, so viel oder so wenig wie die selbstkritische Beurteilung der Studie im Epilog. Der Schluß, den die Autorinnen und Autoren pauschal ziehen, lautet sinngemäß: „Der Tierversuch im Studium ist weniger dramatisch als befürchtet; vieles könnte und sollte aber verbessert werden. Vorbilder sind in allen Bereichen bereits vorhanden.“ Der Verzicht einer detaillierteren Beurteilung wird damit begründet, daß die notwendige Diskussion nicht als Monolog stattfinden sollte, sondern als konstruktiver Dialog innerhalb der Hochschulen.

Die Satis-Studie '95 ist nicht nur ein „Monumentalwerk“, das von außerordentlichem Fleiß zeugt; sie ist ein höchst brauchbares Arbeitsinstrument für Lehrkörper und Studierende und bietet wertvolle Denkanstöße und Entscheidungshilfen (allenfalls auch für übergeordnete Entscheidungsträger). Das Buch sollte in allen Bibliotheken betroffener Fakultäten und Fachberei-

che zur Verfügung stehen und als Grundlage für Diskussionen dienen. Außerdem sollte es Basis für eine periodische Aktualisierung sein, die von den Universitäten selbst durchzuführen und zu finanzieren wäre.

Claudia Mertens  
Zürcher Tierschutz

### Zelltests in der Ökotoxikologie

Thomas Braunbeck, Karlsruhe (1995). 205 Seiten. ISBN: 3-88251-224-5. Preis

DM 18,-. Das Buch ist der 11. Band einer Publikationsreihe der Landesanstalt für Umweltschutz des Landes Baden-Württemberg, in welcher Forschungsergebnisse im Rahmen des Förderprojektes „Angewandte Ökologie“ dargestellt werden.

In diesem Band werden die Resultate aus drei Forschungsprojekten, die am Zoologischen Institut I der Universität Heidelberg durchgeführt wurden, zusammengefaßt.

Ziel dieser Forschungsprojekte war es, neuartige *in vitro* Testsysteme mit Fischzellen zur Ermittlung der kurz- und mittelfristigen Toxizität von Umweltschadstoffen zu entwickeln und auf ihre Tauglichkeit für den Routineeinsatz zu überprüfen. Angesichts der Tatsache, daß von über 100.000 chemischen Verbindungen nur von wenigen hundert Substanzen Daten hinsichtlich ihres ökologischen Gefährdungspotentials vorliegen, besteht unzweifelhaft ein großer Bedarf an empfindlichen Biotests. Zu diesen Biotests gehört auch der Fischtest, der zumeist in Form eines akuten Toxizitätstests zur Ermittlung des LD<sub>50</sub>-Wertes durchgeführt wird.

Die in dem Band vorgestellten Ergebnisse zeigen, daß Zellkulturen als schmerzfreie suborganismische Testsysteme auch in der Ökotoxikologie eine vielversprechende Alternative zum klassischen Tierversuch darstellen.

Es werden mehrere permanente Fischzelllinien und primäre Hepatozyten aus der Forelle und dem Aal in

umfangreichen Versuchen charakterisiert und miteinander verglichen.

Neben mehreren Zytotoxizitätstests werden dazu die Aktivitäten ausgewählter Stoffwechsel- und Biotransformationsenzyme biochemisch bestimmt und die morphologischen Veränderungen der Zellorganellen elektronenmikroskopisch untersucht. Die Verwendung von permanenten und primären Zellkulturen und die Kombination von zytologischen, biochemischen und analytischen Untersuchungen ermöglichen es, auch auf der zellulären Ebene einen Einblick in die grundlegenden Wirkungsmechanismen von substanzspezifischen Schädigungen zu bekommen.

Aufgrund der vorgelegten Ergebnisse der einzelnen Prüfsysteme wird abschließend ein mehrstufiges Konzept zur Abschätzung von ökotoxikologischen Schadstoffen vorgestellt:

Auf der ersten Stufe erfolgt im Screeningverfahren die Prüfung auf akute Toxizität mit permanenten Zellkulturen mit einem einfachen Zytotoxizitätstest.

Auf der zweiten Stufe folgen Kurzzeittests mit permanenten und primären Zellkulturen mit komplexeren Endpunkten wie z.B. den Enzymmessungen.

In der dritten Stufe erfolgt eine Prüfung auf subletale Effekte in permanenten Fischzellen und/oder primären Hepatozyten mit einer Exposition über mehrere Tage.

Diese drei Stufen des Testsystems sind hierarchisch so angeordnet, daß ein positives Ergebnis in einer der Stufen die Klassifikation der Substanz als toxisch erlaubt, während ein negativer Befund eine Prüfung in der nächsten, empfindlicheren Stufe erforderlich macht.

Die Demonstrationen dieses Prüfkonzeptes mit der Modellsubstanz 4-Chloranilin und zwei Deponiesickerwässern verdeutlichen, daß diese Testbatterie in der Lage ist, sowohl akute als auch subletale Effekte von Chemikalien und komplexen Schadstoffgemischen nachzuweisen.

Sollte allerdings auch in der 3. Stufe kein eindeutiger Effekt zu erkennen sein, ist weiterhin als Option die Prüfung am Ganztier vorgesehen, da befürchtet wird, daß sonst systemische Wirkungen im Organismus unerkannt bleiben.

Eine routinemäßige Ermittlung der Toxizität von chemischen Substanzen mit Hilfe dieses Prüfkonzeptes würde trotzdem zu einer drastischen Reduktion der Zahl von Testfischen führen.

In einem kurzen Kapitel wird auch die Herstellung, Charakterisierung und Anwendung von einem S-9 Mix aus der Leber der Regenbogenforelle beschrieben. Wegen der Problematik der regelmäßigen Beschaffung wird in der Schlußdiskussion auch die Anwendung des kommerziell erhältlichen S-9 Mix von Ratten angeregt. Hier ist eine Verknüpfung von Metabolisierungswegen von zwei in der Systematik weit auseinanderliegenden Tierklassen für die spätere Übertragbarkeit der Ergebnisse riskant, da erhebliche Unterschiede zwischen den Enzymreaktionen bei der Ratte und beim Fisch existieren dürften. Des weiteren erschwert der Einsatz eines S-9 Mix bei der Prüfung von Abwasserproben durch unbekanntes Wechselwirkungen und unerkannte Chargenvariabilitäten die Reproduzierbarkeit und Interpretation von Testergebnissen deutlich.

Ansonsten sind die detaillierten Methodenbeschreibungen und der ausführliche Literaturteil für den interessierten Wissenschaftler mit Sicherheit eine Anregung, sich verstärkt der Möglichkeit der Chemikalienprüfung mit Zellkulturen zuzuwenden.

Dr. Martin Kohlpoth  
Akademie für Tierschutz  
Spechtstraße 1  
D-85579 Neubiberg

## Meinungen und Kommentare

### Maximum Likelihood Prinzip und ATC Methode

An die Herausgeber von ALTEX

Sehr geehrte Damen und Herren, erlauben Sie uns einige Bemerkungen zu der Publikation von S. Glaser und H. Hecker: Maximum Likelihood Klassifikationsregel zur Bestimmung der akuten Toxizität. *ALTEX* 13, 2 (1996), 88–94.

In dieser Publikation wurde ein alternatives Verfahren zur oralen Akuten-Toxischen-Klassen-Methode (ATC-Methode) vorgestellt und hinsichtlich Klassifikationswahrscheinlichkeiten und erwarteten Tierzahlen mit dieser Methode verglichen.

Zunächst einmal muß festgestellt werden, daß die ATC-Methode zwischenzeitlich – d.h. nach einer OECD-Expertensitzung Anfang 1994 – leicht modifiziert wurde und insbesondere die Wahl zwischen zwei Optionen ermöglicht. Zwei der jüngsten Publikationen beziehen sich auf diesen neuesten Stand, wovon sich eine mit der Auswertung des hierzu durchgeführten internationalen Ringversuches befaßt (Schlede et al., 1995) und die andere die biometrischen Grundlagen bereitstellt (Diener et al., 1995). Die ATC-Methode wurde von der OECD und von der EU 1996 als offizielles Prüfverfahren akzeptiert (OECD, 1996; EU, 1996).

Im folgenden sollen einige Punkte aufgeführt werden, die aus unserer Sicht für das Verständnis der ATC-Methode wichtig sind und im Zusammenhang mit der vorliegenden Publikation nicht unerwähnt bleiben können.

- Die ATC-Methode ist mit dem Ziel entwickelt worden, möglichst vergleichbare oder bessere Klassifikationswahrscheinlichkeiten als der klassische LD<sub>50</sub>-Test bei einer gleichzeitigen drastischen Reduzierung der Versuchstierzahlen zu liefern. Das bedeutet nicht nur, daß der Anteil der richtigen Klassifikationen besonders hoch sein soll, sondern dies ist auch stets in Verbindung mit den falsch

eingestuften Substanzen zu sehen. Um den Aspekten des Gesundheitsschutzes für den Menschen Rechnung zu tragen, sollten diese Stoffe dann zum großen Teil wenigstens in eine giftigere Klasse eingestuft werden. Nach dem ML Prinzip – übrigens genau wie beim klassischen LD<sub>50</sub>-Test – gäbe es immer Substanzen mit einem wahren LD<sub>50</sub>-Wert etwas unterhalb der Klassengrenzen, die praktisch zu 50% in eine zu harmlose Toxizitätsklasse eingestuft würden, unabhängig von der Steigung  $\beta$ . Dies ist bei der ATC-Methode nicht der Fall. Hier erreichen die Wahrscheinlichkeiten für eine Einstufung in eine zu harmlose Klasse beim System der Chemikalien in der EU einen Maximalwert von 25% für eine Steigung  $\beta > 1$ . Dies stellt im Vergleich mit dem ML Prinzip einen eindeutig besseren Beitrag zum vorbeugenden Gesundheitsschutz dar.

- Bei der ATC-Methode werden substanzbedingte unterschiedliche Empfindlichkeiten der beiden Geschlechter berücksichtigt. Zwar sollte stets mit dem vermutlich sensibleren Geschlecht gestartet werden, jedoch ist dies nicht immer von vornherein bekannt. Selbst wenn die Testprozedur mit dem weniger empfindlichen Geschlecht beginnt, wird beim Überleben der Tiere die gleiche Dosis entsprechend dem Prüfverfahren noch einmal mit dem anderen Geschlecht getestet. Nach dem ML Prinzip kann es vorkommen, daß eine giftige oder sehr giftige Substanz mit dem unempfindlichen Geschlecht getestet wird, wodurch diese dann fälschlicherweise nicht eingestuft werden könnte.
- Die Klassifikationsregeln nach dem ML Prinzip liefern unseres Erachtens Einstufungen, die zum Teil von den wahren Toxizitätsklassen weit entfernt sind. Dies betrifft insbesondere Responsekombinationen, deren Auftreten sehr unwahrscheinlich ist. So würde intuitiv eine Substanz mit der

Responsekombination (3,1,0) in die Klasse ATC3 eingestuft, obwohl die Klassifikationsregel ATC1 besagt. Ebenso z.B. die Kombination (2,0,0), die nach der Regel sogar zu ATC0 führt.

- Die ATC-Methode ist auf alle international gültigen Klassensysteme ausgeweitet worden, und sie läßt durch die Wahl einer zweiten Option eine weitere Verfeinerung bei der Einstufung zu, ohne die Tierzahlen übermäßig stark zu erhöhen. Dem Vorschlag über die Aufstellung jeweils eigener Regeln für die übrigen Klassensysteme mit entsprechend anderen Testdosen kann hier nicht zugestimmt werden. Es war gerade bei der ATC-Methode ein wesentlicher Punkt, daß ein einmal durchgeführter Test nicht wiederholt zu werden braucht, wenn später einmal bezüglich eines anderen Klassensystems eingestuft werden soll. Dies galt bereits beim klassischen LD<sub>50</sub>-Test und sollte so beibehalten werden. Anderenfalls könnte die Einsparung an Versuchstieren durch Wiederholungen von unterschiedlichen Testprozeduren verloren gehen.
- Bedingt durch die Modifizierung des Testverfahrens der ATC-Methode bezüglich der Dosis 2000 mg/kg (Diener et al., 1995) ergeben sich deutlich bessere Korrekturklassifikationswahrscheinlichkeiten für nicht-einstufungspflichtige Substanzen. Da es sich hier um eine sehr sensible Klassengrenze handelt – es ist die Grenze zwischen nicht-einstufungspflichtig und einstuftungspflichtig schlechthin –, muß darauf geachtet werden, daß nicht zu viele eigentlich einstuftungspflichtige Substanzen aufgrund des Tests nicht eingestuft werden. Dies kann bei Substanzen mit einem wahren LD<sub>50</sub>-Wert etwas unter 2000 mg/kg nach dem ML Prinzip in 50% der Fälle geschehen, nach der ATC-Methode jedoch nur in maximal 25% der Fälle.
- Ein weiterer Aspekt sollte noch erwähnt werden. Die erwarteten Tierzahlen hängen bei der ATC-Methode stark von der Startdosis und von der wahren LD<sub>50</sub> der untersuchten Substanz ab. Ein Labor, welches routinemäßig viele derartigen Untersuchungen durchführt, wird aufgrund langjähriger Erfahrungen häufiger mit

der „optimalen“ Startdosis beginnen, d.h. mit derjenigen, die zu einem Minimum an Tierzahlen führt. So genügt die Testung von 6 Tieren für nicht einstuftungspflichtige Stoffe bei einer Startdosis von 2000 mg/kg oder auch von nur 3 Tieren für sehr giftige Stoffe bei einer Startdosis von 25 mg/kg. Die Tierzahlreduktion kann also noch einmal erheblich sein. Das Leiden der Tiere ist nach dem ML Prinzip im Gegensatz zur ATC-Methode für giftige und sehr giftige Stoffe besonders hoch, da drei Tiere immer mit der höchsten Dosis von 2000 mg/kg behandelt werden.

Die Prüfverfahren und Einstufungsregeln der ATC-Methode orientieren sich im wesentlichen auf die mit Hilfe der Maximum-Likelihood-Methode berechneten  $LD_{50}$ -Werte, die sich jeweils durch Zusammenfassung aller Testergebnisse des Ablaufplanes ergeben, wobei im Zweifelsfalle in die giftigere Klasse eingestuft wird. Unter Beachtung dieser Tatsache war es das Ziel, die Ablaufpläne trotzdem übersichtlich und für die Benutzer gut anwendbar zu gestalten. Insofern ist auch hier die Maximum-Likelihood-Methode, basierend auf dem Probitmodell, ein Bestandteil der Methode. Der Nachteil, daß es sich hierbei um ein gruppensequentielles Verfahren handelt und demzufolge einen größeren Zeitaufwand als das beschriebene ML

Prinzip erfordert, ist bei den aufgezeigten Eigenschaften ohne Bedeutung.

Insgesamt gesehen handelt es sich bei der Publikation um einen weiteren durchaus zu begrüßenden Versuch, mit wenig Tieren aussagekräftige Ergebnisse zur akuten Toxizität einer Substanz zu erhalten. Das ML Prinzip erreicht unseres Erachtens jedoch nicht die Wirksamkeit und Zuverlässigkeit der ATC-Methode.

Dr. Wolfgang Diener und  
Dr. Eva Schlede  
Bundesinstitut für gesundheitlichen  
Verbraucherschutz und Veterinär-  
medizin, BgVV  
Thielallee 88-92, D-14191 Berlin

#### Literatur

- Diener, W., Mischke, U., Schlede, E. und Kayser, D. (1995). The biometrical evaluation of the OECD modified version of the acute toxic class method (oral). *Archives of Toxicology* 69, 729–734.
- EU, (1996). *Acute Toxicity (Oral) – Acute Toxic Class Method*. B.1 tris. Off. J. Europ. Comm.
- OECD, (1996). *Guideline for Testing of Chemicals, No. 423. Acute Oral Toxicity – Acute-Toxic-Class Method*. Paris: OECD.
- Schlede, E., Mischke, U., Diener, W. und Kayser, D. (1995). The international validation study of the acute-toxic-class method (oral). *Archives of Toxicology* 69, 659–670.

kann, und daß der Bürger, aber auch Tier- und Konsumentenschutzorganisationen gegenüber kraß gesetzwidrigem Verhalten des Bundesrates und der Bundesverwaltung faktisch keine Rechtsmittel besitzen (fehlendes Klagerecht, Immunität des Bundesrates). Die Einstellung, diese Situation müßte man mit demokratischen Mitteln zu ändern versuchen, ist naiv und kann nur von jemandem vertreten werden, der so sehr zum Establishment gehört, daß er dessen Willkür noch nie selbst erlebt hat. Sollen wir etwa eine Verfassungsinitiative lancieren mit der Forderung „Die Regierung hat sich an Gesetze und Volksbeschlüsse zu halten“ oder „Das Tierschutzgesetz ist anzuwenden“? Auch das Wahlrecht ist kein taugliches Mittel gegen das gesetzwidrige Verhalten der Regierung und des parlamentarischen Interessenzilzes; „links“ oder „rechts“ zu wählen bringt keine Lösung. Der Abschirmung des Volkes von der politischen Steuerung des Landes dient auch die absichtliche Intransparenz der Geschehnisse im Parlament. Mit der heutigen elektronischen Abstimmung wäre es z.B. einfach, einen jährlichen Rechenschaftsbericht herauszugeben, worin nachgesehen werden kann, welcher Parlamentarier wann wie gestimmt hat. Eine solche Transparenz wird aber verhindert. Es ist leichter, die Demokratie auf eine kurze, schlagwortartige Wahlpropaganda zu beschränken und dann wieder vier Jahre lang tun und lassen zu können, was dem Politfilz am meisten dient. Die Ausübung des Stimm- und Wahlrechtes ist heute derart frustrierend geworden, daß nur noch eine Minderheit davon Gebrauch macht, und diese Minderheit wird ständig kleiner.

Schon Goethe hatte eine klare Meinung, was in einer solchen Situation zu tun ist: Wo Recht zu Unrecht wird, wird Widerstand zur Pflicht.

Dr. Erwin Kessler  
Präsident VgT Verein gegen  
Tierfabriken Schweiz  
CH-9546 Tutwil

## Entgegnung zu „Tierschutz zwischen Demokratie und Lobbyismus“ von Jean-Claude Wolf, in ALTEX 13, 3/96

### Rechtsnotstand im Tierschutz

Durch die ganze Arbeit von Jean-Claude Wolf hindurch werden Handlungen von Behörden dem Volkswillen (Souverän) gleichgestellt und als demokratischer Ausdruck des Volkswillens gedeutet. Das ist ein unhaltbar theoretischer Standpunkt, weil er von der Theorie, nicht von der Praxis des demokratischen Rechtsstaates ausgeht. Dadurch, daß z.B. der Bundesrat rechtmäßig vom Parlament gewählt ist, welches seinerseits rechtmäßig vom Volk gewählt ist, ist noch lange nicht garantiert, daß auch die Handlungen des Bundesrates rechtmäßig sind. Der Bun-

desrat ist zwar formell rechtmäßig an der Macht, gleichzeitig kann er es sich aber immer wieder leisten, sich offen über den Volkswillen hinwegzusetzen. Eklatant kommt dies bei der Mißachtung des Volkswillens zur Alpeninitiative zum Ausdruck, aber auch – und ganz besonders – beim Nichtvollzug des Tierschutzgesetzes. Der Einfluß des Volkes ist auf raffinierte Art so beschränkt und ausgetrickst, daß der demokratische Volkswille vom herrschenden Regime ungestraft mißachtet werden kann. Typisch hierfür ist, daß ausgerechnet der Bundesrat, dessen Tätigkeit im Volk am besten bekannt ist, nicht vom Volk gewählt werden

## Sachregister subject index

(1/96: 1–48; 2/96: 49–108; 3/96: 109–164; 4/96: 165–246;  
Supplementband: S1–S88)

- 3D-QSAR 124ff  
3R-Konzept 56, 96, 103, 184ff, S5  
ABM-Adjuvans S22ff  
*abnormal toxicity* 7ff  
*acaricide* 76ff  
*accomodation* 136ff  
Adjuvantien S26ff, S30ff  
*affinity chromatography* S36, S66ff  
*affinity maturation* S24  
Agar 133  
Aggression 51  
*allantois* S15  
*alternative adjuvants* S22ff  
*alternative test* 140ff  
Alternativmethoden 102, 152, 224  
Aluminiumhydroxid 14  
*Amblyomma* 76ff  
Ammoniumsulfatfällung S58  
*amnion* S15  
*animal experiments* 55ff  
*animal liberation* 111ff  
*animal research controversy* 43f  
*animal welfare requirements* 136ff  
*Anoplura* 130ff  
Anthropozentrismus 149  
*antibodies, monoclonal* 36f, 182  
*antibody, diversity* S13  
*antibody, purification* S66ff  
*anti-troponin I-antibody* S45ff  
Arroganz des Humanismus 117  
*artificial dog* 133f  
*artificial membrane* 76ff  
Arzneimetabolismus 229ff  
*Ascaris suum* antigens S62ff  
Aspekte, pädagogische 199  
*Aspergillus sp.* 84  
ATC-Methode 88, 92, 147, 238  
ATLA, *Alternative to Laboratory Animals* 29, 95  
ATT, anomale Toxizität 7ff, 28  
Ätzwirkung 32  
*Avian antibody* S1ff, S51  
*avian vitellin antibodies* S1ff  
Aviäre Antikörper 32, S1ff  
*avidity* S23  
Baudruche-Membranen 76, 83  
BCOP, *Bovine Cornea Opacity* 168  
Bedarfsgegenstände 168  
Belastung 55ff  
Bernoulli-Experiment 89  
Biomaterialien 225ff  
Biometrische Methodik 154  
*biotechnology* 175ff  
Biozentrismus 149  
*birds* S10  
*bloodmeal identification* S74  
BMBF, Bundesministerium für Bildung, Forschung und Technologie 49, 55, 98, 190  
BMG-Forschungspreis 145  
Bodenhaltung 137f  
*Boophilus microplus* 76ff  
*Bordetella bronchiseptica* S70ff  
Botenstoffe 17ff  
BUS, *Bovine Udder Skin Model* 232  
CAAT, *Johns Hopkins Center for Alternatives to Animal Tests* 39, 101  
CADD, *Computer Assisted Drug Design* 26f, 124ff, 222  
*cancer cell motility* 118ff  
*cancer research* 118ff  
*capture-ELISA* 68ff  
*catch antibody* 180ff  
CCK-8, *cholecystokinin octapeptide* S80  
CCLTOP, *Catalogue of Cell Lines in Toxicology & Pharmacology* 96  
CD 14 S77f  
Cellophan 133  
Chemotherapie 119  
*chicken antibodies* 179ff, S1ff, S52  
*chicken egg embryonated* 37  
*chicken housing* 136ff, S6  
*chickens* S5ff  
*cigarette smoke* 175ff  
*Clostridium perfringens* 68ff  
COLIPA, *The European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association* 39, 104, 169ff  
Computer-Simulationen 186  
*copro antigens* S62ff  
CORROSITEX 33, 98, 218ff  
*cosmetics toxicology* 44  
CSSC, *Chemicals Selection Subcommittee* 33  
*Ctenocephalides* 130ff  
CTLU, Labor für Zytotoxikologie 222  
Cytochrom P450 229  
*Cytokine mediated* 29  
*cytokines* 17ff  
DAB, Deutsches Arzneibuch 7  
Demokratie 111ff  
Dentalwerkstoffe 226ff  
Deontologie 149  
*Dermacentor nuttalli* 78  
*dermal delivery* 233  
DG XI/E/2 95  
DG XII/E/4 95  
DG XXIV 39f, 95, 171  
Dickdarmkrebs 120  
Diphtherie-Impfstoff 8  
Divergenz, innertheologische 197  
DOE, *US Department of Energy* 169  
Dogmatismus 14  
Dosis-Wirkungsbeziehung 141f  
DOT, *US Department of Transportation* 98, 169  
Dotterantikörper 98  
DPT, Diphtherie-, Pertussis-, Tetanusimpfstoff 10f  
Draize-Test 141, 167  
*drug metabolism* 229ff  
DTB, Deutscher Tierschutzbund 146f  
EAB, Europäisches Arzneibuch 8, 28, 68ff  
ECB, *European Chemical Bureau* 95  
ECETOC, *European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals* 95  
ECMDD, *EC Medival Devices Directive* 37  
ECVAM Corner 32f, 95f, 144f, 218ff  
ECVAM Verträge 144  
ECVAM Workshop 37f  
ECVAM, *Europ. Centre for the Validation of Alternative Methods* 39f, 73, 101, 167ff  
*education* 184ff, 190ff  
EEMS, *Environmental Mutagen Society* 34  
EFPIA, *European Federation of Pharmaceutical Industries Association* 95  
Egalitarismus 115  
*egg yolk antibodies* S5ff, S66ff, 179ff  
Ehrfurcht vor dem Leben 3ff, 53  
EIA, *Enzymimmunassay* S57ff, S62ff  
Eigeninteressen, von Tieren 111ff  
ELISA 68ff, 179ff, S18ff, S27  
ELISA, *capture* 68ff, 179ff  
ELISA, *competitiv* S67  
Endotoxin 13, 17ff  
Entzündung 17ff  
EP, *Europäische Pharmakopöe* 8, 28, 68ff  
EPA, *US Environmental Protection Agency* 169  
Episkin 33, 221f  
*epitope scanning* S52  
ERGATT, *Europ. Research Group for Alternatives in Toxicology Testing* 95, 101, 167ff  
Erna-Graff-Stiftung für Tierschutz 222f  
Ersatz von Tierversuchen 55ff  
ESAC, *ECVAM Scientific Advisory Committee* 95  
*ethical philosophy* 51ff  
Ethik 51ff  
Ethik, ökologische 197ff  
Ethische Aspekte 43, 195ff  
Ethologie 150

- EUROGROUP 95  
 Europäische Kommission 104f  
 Europäische Pharmakopöe 8, 15  
 Europäisches Parlament 104f  
*Europe against cancer* 118ff  
*evolution of immunoglobulins* S10  
 Exposition 141  
*FACS analysis* S40  
 FDA, *US Food and Drug Administration* 169  
 FDP, Fixed Dose Procedure 147  
 Feldversuche 149  
 Felix-Wankel-Tierschutz-Forschungspreis 223  
 FFVFF, Fonds für versuchstierfreie Forschung, Zürich 29, 99f  
*finite dose* 220  
 Fischzellen 225  
 FISEA 97  
*fleas* 130ff  
 Fleckfieber 131  
 Flöhe 130ff  
 Forschungsförderung 55ff  
 Forschungsfreiheit 200f  
*Forskning utan djurförsök* 30  
 FRAME 49  
*freedom of information act, Sweden* 30  
*freedom of information act, USA* 38  
 Freiwillige 190ff  
 Friends Adjuvans 148, S22ff, S26ff, S30  
*frog experiments* 190ff  
 Futtermittel 168  
*gap junctions* 122  
 Gefährlichkeit 141  
 Gelbe Listen 193  
 Gentamicin 79  
 Gentechnologie 204ff, 228ff  
 Gerbu-Adjuvans S22ff  
 Gewalt 51, 209f  
 Gewässermonitoring 148  
 GLP, *Good Laboratory Practice* 7, 9  
 GMP, *Good Manufacturing Practice* 7, 9  
*grant programme* 55ff  
 Graz, tierversuchsfreie Universität 31  
 Grund, vernünftiger 194  
 Grundlagenforschung 55ff  
 Grundsätze, ethische 3ff  
 GUM, Gesellschaft für Umweltmutatonsforschung 34  
 Gutta percha 131, 133  
 Haltung, tiergerecht 136ff  
*hard ticks* 76ff  
 Haut- und Schleimhautreiztest 101  
 Haut, Penetration 167ff, 220f  
 HET-CAM Test 143  
 Holismus 149  
*hollow fiber system* 37  
 Hühnererei S15  
 Hühnerembryonen 35  
*human cell-associated antigens* S76ff  
*human-animal relations* 51ff  
 Humanblut 186  
 Humanität 207f  
 Hunde 221  
*Hyalomma* 78  
 ICCVAM, *Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods* 95, 101f, 167, 169  
 ICH, *International Conference on Harmonization* 36  
 IgA S15  
*IgB in birds* S12  
 IgG S10, S15  
 IgM S15  
 IgY 179ff, S1ff  
*IgY determination of concentration* S36  
*IgY-binding activity* S35  
*IgY-diagnostic application* S70ff  
*IgY-extraction* 7, S23, S35  
 IgY-IgG-Vergleich S57ff, S80  
*IgY-kinetics* S18ff  
*IgY-preparation* S52  
*IgY-purification* S66ff  
*IgY-routine diagnostic work* S73ff  
*IgY-structure* S11  
 IgY-Technologie 98, S5ff  
 Immunglobuline 7ff  
*immunisation* S18ff, S51ff  
*immunisation protocol* S7, S76  
 Immunisierung 70, S23, S26ff, S58  
*immunoglobulins, developmental aspects* S10  
 Immunotherapie 119  
 Immunsera 28  
 Impfstoffe 7ff, 28, 68ff, 100  
*in vitro feeding* 76  
*in vitro pharmacology* 17ff  
 Industrie 224f  
 Industriechemikalien 168  
*infarction* S45  
*infinite dose* 220  
*inflammation* 17ff  
*innocuity-test* 13  
 Integrin 122  
*international harmonization* 150f  
 INVITOX 234  
 Ivermectin 76, 84  
*Ixodex ricinus* 76ff  
 JAAWS, *Journal of Applied Animal Welfare Science* 31  
 Käfighaltung 138f  
*killing of animals* 111ff  
*kinetics* 17ff  
 Klassifikationsregel 88f  
 Konsistenz 115  
 Konzentrations-Wirkungs-Beziehung 8, 919  
 Kosmetika 100, 231f  
 Kosmetikindustrie 104f, 231f  
 Kosmetikrichtlinie 104, 155  
 Kraftfeldmethoden 126  
 Krebsforschung 34f, 100, 118ff  
 Kuheuter 232  
 Kupffersche Zellen 17  
 LAL, *Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test* 15  
 Larven 76  
 Latexagglutinationstest S58  
 Läuse 130ff  
*laying hens* 136ff  
 LD<sub>50</sub> 29, 88ff  
 Lebensmittel 168  
 Leberkrebs 120  
 Leberzellkulturen 36  
 Legehennen 136ff, S26ff, S30  
 Lehrmittel Tierversuche 155ff  
 Lehrveranstaltungen 184ff  
 Leitsubstanzoptimierung 27  
*lice* 130ff  
 Lipopeptide S26ff, S30  
*liver fibrosis* S51  
*liver macrophages* 17ff  
 Lobbyismus 111, 239  
*mammals* S10  
 Mäuseneutralisationstest 68ff  
*Maximum Likelihood* 88ff, 238  
*Medical Device Directive 93/42/EEC* 228  
*medical devices* 37f  
 Medien, serumfrei 225  
 Medizinprodukte 225ff  
 MEGAT, *Mitteuropäische Gesellschaft für Alternativen zu Tierversuchen* 33, 49, 224  
 MEIC, *Multicenter Evaluation of in vitro Toxicology* 222  
 Melanome 120  
*membrane feeding* 130ff  
 Mensch-Tier-Beziehung 51f, 149, 196  
 Metastasen 118ff  
 MIC, *Minimal invasive Chirurgie* 31  
 Microbizide 76  
 Minusheet 19  
 Mitgeschöpflichkeit 53, 195ff  
 Modell, molekulares 124ff  
 Moral 51ff  
*murine IgG subclasses* S66ff  
 Mutationsforschung 34f  
*myocardial injury* S45ff  
 Myograph 98, 190ff  
 Myositis S30ff  
 NCA, *Netherlands Centre Alternatives to Animal Use* 95, 221  
 NCI, *US National Cancer Institute* 169

- Negativliste 151  
 Nerv-Versuch 190ff  
 Neurotoxikologie 172  
*Nicotiana sylvestris* 175ff  
 NIH, *National Institute of Health* 8, 14, 169  
 Nomenklatur der Immunglobuline S16  
 NRC, *National Research Council* 173  
 NTE, *Neuropathy Target Esterase* 172  
 NTP, *US National Toxicology Program* 169  
 Nutztiere, transgen 43, 204ff  
 Nymphen 76  
 Nystatin 79  
 Ochratoxin 124ff  
 OECD, *Organisation for Economic Cooperation and Development* 49, 88, 95, 100ff, 147, 167ff, 218, 220f  
 Ohnmacht 51ff  
 Ökotoxizität 29  
 Operationssimulator 145  
 Optimierung versuchstierfreier Methoden 55ff  
*Orchopeas howardii* 133  
 OSHA, *US Occupational Safety and Health Administration* 169  
 Östrogen 145  
 P.O.P., Pulsierende Organperfusion 31, 145  
 p23 S77  
 p53 120f  
 Parafilm 131, 133  
*parasitic arthropods* 76ff  
 Patentierung von Lebewesen 206  
 Pathozentrismus 111ff, 149  
*Pediculus* 130ff  
 Penicillin 79  
*percutaneous absorption kinetics* 233  
 Pflanzenschutzmittel 168, 221  
 Pharmakokinetik 32, 75  
 Pharmakophor 26  
 PharmaSim 75  
 Phototoxizität 101, 171, 232  
 Physiozentrismus 149  
 Pollen Test 175ff  
*pollen tube growth assay* 175ff  
 Polnisch-Deutsches Symposium 146f  
 Positivliste des Deutschen Tierschutzbundes 231  
 Primärscreening 35  
 Probitmodell 89  
*procollagen type III* S51  
 Profil, didaktisches 190  
*protein A* 179  
*protein antigens* S18ff  
*protein G* S66, 179  
 Protein-Ligand-Komplex 24  
*pseudoreceptor modelling* 124ff  
 Pseudorezeptor 24ff, 125f  
 PTFE (Teflon-) Membranen 83  
 QSAR, *Quantitative Structure Activity Relationship* 170  
 Qualitätskontrolle 7ff, 68ff  
 Qualzucht 208f  
*radioimmunoassay* S51ff  
*radioimmunotherapy* 118ff  
*rat liver cell cultures* 29  
*rat liver macrophages* 17ff  
 Reaggregatkulturen 35  
*receptor mediated toxicity* 124ff  
 Rechtsfragen 210  
*reduction of animal tests* 7ff, 43, 102  
*refinement* 44  
*regulatory acceptance* 167ff  
 rekombinante Wachstumshormone S27  
*research on alternatives* 55ff  
 Resignation 51  
 Rezeptor, cannabinoide 26  
*rheumatoid factors* S57ff  
*Rhipicephalus appendiculatus* 79  
 Richtlinie 93/35/EWG 29  
 Richtlinie (Änderung der 76/768) 93/35/EWG 39  
 Richtlinie 76/768/EWG 44  
 Richtlinie 86/609/EWG 37  
 Richtlinie 93/42/EWG 37  
 Richtlinien, ethische 3ff  
 Rinderblut 76ff  
 Rinderkornea 232  
 Rinderseuche 206f  
 Rinderseuche 76ff  
 Risikobewertung 140ff  
*risk assessment* 140ff  
*risk management* 140ff  
 Risikofaktoren 118ff  
*roller bottles* 37  
 Rous Sarkom Virus 122  
*safety test* 7ff  
 Saponin 14  
 SCC, *Scientific Committee on Cosmetics* 39f, 49, 171  
 Schädlinge 209  
 Schildzecken 76ff  
 Schlachthofmaterial 186  
 Schloß-Schlüssel-Prinzip 24, 100  
 Schweizerische Akademie der Naturwissenschaften 156ff  
 Schweregrade 147  
 Screening 145, 222  
 Selbstversuche 186  
 Sentienismus 114  
 Septischer Schock 100  
 Sera 7ff  
 Serum-CRP S57ff  
 set, Stiftung zur Förderung von Ersatzmethoden zum Tierversuch 55, 221  
 Silikon-Membran 76ff  
*Siphonaptera* 130ff  
 Skelettmuskel-Versuch 190ff  
*skin irritancy test, in vitro* 233  
 Skin<sup>2</sup> 33, 218ff  
 Solvationsenergie 126f  
*species specific needs* 136ff  
 Startdosis 93  
*stomatology* 227  
 Straußenhaltung 206f  
 STS, Schweizer Tierschutz 155ff  
 Swedish Fund for Research 30  
 Talin 122  
 TEA, *Tissue Equivalent Assay* 39  
 Teleologie 149  
 TER, *Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance Test* 218ff  
 TER, *Transcutaneous Electrical Resistance* 33  
 Tetanustoxin 8  
 theologische Positionen 196f  
 Thiomersal 14  
 Tiere, transgene 102, 150, 225  
 Tierschutz 98f, 111ff, 210  
 Tierschutz als Unterrichtseinheit 222  
 Tierschutz und Demokratie 111ff, 239  
 Tierschutz und Ökologie 198  
 Tierschutzbeauftragter 149  
 Tierschutzgesetz, Novellierung 148f, 210  
 Tiertötung 203  
 TiterMax S22ff  
 TNF, Tumor-Nekrose-Faktor 17ff  
*toxicology, in vitro* 140ff, 175ff  
 Toxinneutralisationstest 68  
 Toxizität 124ff  
 Toxizität, akut 88ff  
 Toxizität, anomale 7ff, 28  
 Toxizitätsklasse 88ff  
 Trichotomie Sache-Tier-Mensch 111ff  
 Troponin I S45ff  
 Umweltpolitik 197f  
 Unerläßlichkeit 151  
 Unterricht 75, 155  
*vaccines* 7ff, 68ff  
 Validierung 33, 55ff, 100ff, 141, 167ff, 190ff  
 Verbreitung von Alternativmethoden 32  
 Verminderung der Belastung im Tierversuch 147ff  
 Versuchstiere 103  
 Verzicht auf Erkenntnis 5  
 Vinkulin 122  
*violence* 51ff, 111ff  
 Vollzugsdefizit 211  
 Vorschaltung versuchstierfreier Methoden 55ff  
 WHO, Weltgesundheitsorganisation 8, 68

Würde der Kreatur 3ff, 53ff, 152f,  
 204ff, 211f  
*Xenopsylla cheopis* 132  
 Xenotransplantation 200, 202  
*yolk-sack* S1ff  
 ZEBET 40, 168, 220  
 Zelllinie RUCA-I 145  
 Zelllinien, gentechnisch verändert 32  
 zet, Zentrum für Ersatz- und Ergän-  
 zungsmethoden, Graz 96  
 Zytokinese 122  
 Zytotoxizität 227

### Autorenregister *authors index*

(1/96: 1–48; 2/96: 49–108; 3/96: 109–  
 164; 4/96: 165–246;  
 Supplementband: S1–S88)

Ahr, Hans-Jürgen 232  
 Ambrosius, Herwart S10  
 Appl, Helmut 184  
 Bartels, Thomas S70  
 Bauer, Anja 227  
 Bauerdick, Frank 227  
 Bayerl, Thomas M. 233  
 Behn, Ingrid S18, S40  
 Bertschinger, Hans U. 155  
 Bessler, Wolfgang S26  
 Bruinink, Arend 124  
 Bürger, Wolf S57  
 Cervinka, Miroslav 227  
 Cervinková, Zuzana 227  
 Claas, Silke S45  
 Claros, Marina S70  
 Cußler, Klaus 7, 28, 68  
 Dannhorn, Martin 225  
 Diener, Wolfgang 238  
 Doehmer, Johannes 228  
 Doth, Margit S40  
 Duchow, Karin 7  
 Ebert, Elvira 68  
 Erhard, Michael H. S26, S30, S66  
 Fentem, Julia H. 39  
 Fischer, Matthias 179  
 Fuhr, Uwe 230  
 Fulda, Ekkehard 43  
 Fürstenberger, Gerhard 233  
 Gaus, Wilhelm 154  
 Gelbke, Hans P. 224  
 Gerl, Martin S51  
 Gieschen, Hille 229  
 Givel, Jean-Claude R. 6  
 Glaser, Sabine 88

Goll, Susi 103, 159  
 Gruber, Franz P. 1, 55, 109, 190  
 Günzel, Peter 55  
 Günzler, Volkmar S51  
 Hansson, Ulrika 30  
 Hartung, Thomas 17  
 Hauschildt, Sunna S18, S40  
 Hecker, Hartmut 88  
 Heinzelmann, Thomas 233  
 Henklein, Peter S80  
 Hepp-Reymond, Marie-Cl. 6  
 Hermening, Stephan 17  
 Hess, Robert 6  
 Hiepe, Falk S57  
 Hiepe, Theo 130, S62  
 Hildebrand, M. 229  
 Hlinak, Andreas 179, S5, S70, S76,  
 S80  
 Hoffmann, Kathrin 227  
 Hofmann, Andrea S26, S30, S66  
 Högel, Josef 154  
 Holderegger, Adrian 6  
 Hommel, Undine S18, S40  
 Jenny, Mark 6  
 Kappler, Rolf 175  
 Kempka, Grazyna 232  
 Kessler, Erwin 239  
 Keutz, Eckhard von 232  
 Kietzmann, Manfred 232  
 Klöcking, Hans P. 227  
 Klöcking, Renate 227  
 Kohlpoth, Martin 225, 236  
 Krämer, Beate 7  
 Kristen, Udo 175  
 Kroemer, Heyo K. 230  
 Krüger, Monika S70, S76  
 Kuhnert, Frank 76  
 Kusch, Manuela 68  
 Lang, Thomas 159  
 Liebsch, Manfred 228  
 Lösch, Uli S15, S26, S66  
 Marks, Friedrich 233  
 Matthes, Hans-Frieder 130  
 Matsyjak, Rolf S45  
 Mauron, Alex 6  
 Meier, Jürg 104, 232  
 Mertens, Claudia 237  
 Molitor, Claudia 232  
 Moll, Rita 159  
 Müller, Peter 104  
 Müller-Decker, Karin 233  
 Nagel, Margit 7  
 Oertel, Michael S18  
 Öppling, Volker 68  
 Piguet, Pierre F. 6  
 Pittermann, Wolfgang 232  
 Poth, Albrecht 227  
 Puza, Vladimir 227  
 Quint, Manfred S51  
 Reif, Silke 227

Reinhardt, Christoph A. 167, 225  
 Rieger, Antje S57  
 Ruh, Hans 6  
 Ruhdel, Irmela 155, 231  
 Rusche, Brigitte 55, 224  
 Sasse, Mirko S70  
 Sauer, Achim 17  
 Schade, Rüdiger S5, S40, S51, S57,  
 S62, S70, S76, S80  
 Scharmann, Wolfgang 136  
 Schedle, Andreas 227  
 Schlede, Eva 238  
 Schlüter, Gerhard 232  
 Schmahl, Wolfgang S30  
 Schmalz, Gottfried 226  
 Schmidt, Peter S26, S30, S66  
 Schniering, Anne S62  
 Schöffl, Harald 184  
 Schöffl, Sigrid 184  
 Schrödl, Wieland S76  
 Schwabenbauer, Karin 55  
 Schwanig, Michael 7  
 Schwarzkopf, Christine S22, S35  
 Schweizer, Alfred 152  
 Sigg, Hans 6  
 Spengler, Jochen 231  
 Spielmann, Horst 49, 140, 167, 190,  
 228, 233, S1  
 Staak, Christian S73  
 Stangassinger, Manfred S26, S66  
 Steiger, Andreas 6  
 Steinbusch, Harry S80  
 Steinert, Cornelia S51  
 Sterl, Fatima 232  
 Deutsch, Gotthard M. 51, 195  
 Thiele, Bernhard S22, S35  
 Thomann, Peter E. 6  
 Tritthart, Helmut A. 118, 184  
 Vedani, Angelo 27, 124  
 Vente, Jan de S80  
 Vohr, Hans-Werner 232  
 Wanke, Rüdiger S30  
 Wendel, Albrecht 17  
 Werner, Esther 68  
 Witt, Sabine S76  
 Wolf, Jean-Claude 111, 151  
 Zaigler, M. 230  
 Zinsmeister, Pia S26  
 Zypen, Eugen van der 6