



## Perspektiven zur Entwicklung von Alternativmethoden in der Toxikologie

**Andrew N. Rowan**

Assistant Dean for New Programs  
Tufts University School of Veterinary Medicine  
203, Harrison Avenue, Boston, MA 02111

Zusammenfassung und Uebersetzung: Susi Goll, FFVFF

### Neue Techniken haben es schwer

Bernhard Dixon, ein bekannter Wissenschaftsjournalist, zurzeit Europa-Redaktor des "Scientist", schrieb kürzlich, der wissenschaftliche Erfolg hänge von vier Faktoren ab: vom Denk- und Vorstellungsvermögen, von strenger Selbstkritik (inkl. experimenteller Prüfung der Ergebnisse), von Glück und von geeigneter Technik (1). Von diesen vier Faktoren wird den Techniken für gewöhnlich am wenigsten Bedeutung beigemessen, und auch nur wenige Studien befassen sich mit ihrem Stellenwert für den Fortschritt.

Der Geld-, Zeit- und Arbeitsaufwand, der zur Entwicklung einer neuen Technik notwendig ist, scheint wenig attraktiv und verleitet viele Wissenschaftler und Wissenschaftsteams dazu, so lange beim Gewohnten zu verharren, bis ein ungewöhnlicher Umstand oder gar eine Krise ein Umdenken erfordert. Es ist ganz einfach ein Märchen, zu behaupten, Wissenschaftler seien stets auf der Suche nach besseren Untersuchungsmethoden. Jeder, der in Forschungslaboratorien gearbeitet hat, weiss das.

Die Alternativmethoden zu Tierversuchen machen hierin keine Ausnahme. Es bedarf eines besonderen Anstosses, damit sie entwickelt und in die Praxis eingeführt werden. Die Initiative muss von aussen kommen, sei es von Regierungsstellen oder von privaten Geldgebern. Nichts wirkt auf die wissenschaftliche Kreativität so befeuernd wie die Aussicht auf Forschungsgelder!

### Alternativmethoden in der Toxikologie

Die Toxikologie ist nun generell ein Fachbereich, der solchem Druck von aussen immer wieder ausgesetzt ist. Da die Toxikologie eng mit dem Erläss von Sicherheitsvorschriften verbunden ist, muss sie sich auf ihre Testmethoden verlassen können. Die Forderung nach Alternativmethoden stösst in diesem Milieu, wo man sich laufend mit Testverfahren und Validierungen befasst, auf relativ fruchtbaren Boden, ganz im Gegensatz zur Biomedizin. Hinderlich – und für die Tierschützer frustrierend – wirkt sich in diesem Bereich die Schwerfällig-



keit der Bürokratie aus.

Auf Druck der Tierschutzorganisationen, die anfänglich mit diffusen Forderungen protestierten, wurden seit Mitte der Siebzigerjahre konkrete Projekte gefördert. Es wurden Expertengruppen gebildet, die eigentliche Forschungsprogramme zur Entwicklung und Validierung von Alternativtests aufstellten.

Die gebräuchlichsten Alternativen sind heute Zell- und Organkulturmethoden (in-vitro Methoden), sowie nicht-invasive Untersuchungsverfahren an Tieren und Massnahmen zur Leidensverminderung (Refine). Alle diese Möglichkeiten sind noch längst nicht ausgeschöpft, im Gegenteil, sie werden teils erst entwickelt.

Aus diesem Grund müssen die neuen Untersuchungsmethoden, speziell die in-vitro Techniken, aber vorsichtig in die Praxis eingeführt werden. Ganz offensichtlich kann ein einzelner Zelltest niemals die komplizierte Reaktionsweise eines Organismus simulieren. Stoffwechselfvorgänge können nur bis zu einem gewissen Grad in der Zellkultur erfasst werden, komplexe Interaktionen wie Hormon- und Immunreaktionen sind an Zellen nicht zu simulieren.

Zellkulturen sind zudem relativ statische Systeme. Sie zeigen in Verbindung mit Chemikalien oft andere Reaktionsweisen als der lebende Organismus und bieten bezüglich Löslichkeit, Stabilität und biophysikalischen Effekten noch Probleme. Andererseits können mit Zellkulturtechniken gezielt hochspezifische Fragen beantwortet werden. Die statische Natur begünstigt präzise Messungen. Dosierung und Testzeit können genau festgelegt werden, zudem werden nur geringe Mengen der Testsubstanz benötigt. Zelltests sind daher leicht zu quantifizieren. Ein grosser Vorteil ist, dass direkt mit menschlichem Gewebe experimentiert werden kann. Das ist relativ neu, denn lange Zeit war es für viele Zelltypen nicht möglich, normales Zellwachstum und Zelldifferenzierung ausserhalb des Organismus zu gewährleisten. Doch diese technischen Probleme werden allmählich überwunden, Medien, Kulturschalen und Überwachung laufend verbessert. Nach Nardone & Bradlow (2) spielen in-vitro Techniken heute für folgende Anwendungsbereiche eine praktische Rolle: Für Vortests (Screening), Studien zur Abklärung von Mechanismen, für die Diagnostik und zur Risikoabschätzung von Chemikalien.

#### Gegenwärtige Anwendungsmöglichkeiten

##### LD 50-Test

Die bisher anerkannten Alternativen zum klassischen LD 50-Test sind modifizierte Tierversuche, sie benötigen alle weniger Tiere. Je nach Art der Prüfsubstanz eignet sich die eine oder andere Testanordnung. Der Tierverbrauch beim LD 50-Test ist dank diesen neuen Methoden um rund 90 Prozent zurückgegangen. Neben der Reduktion spielt auch die Verfeinerung der Tests eine wesentliche Rolle. Dazu gehören spezifischere Endpunkte als der Tod, dafür



bessere Ueberwachung der Tiere und genaue Beobachtung von Vergiftungssymptomen.

Eine eigentliche Ersatzmethode gibt es bisher nicht, wohl aber Ansätze dazu. Eine mögliche Alternative ist die Berechnung von Struktur-Aktivitätsbeziehungen aus der Molekülstruktur mit Hilfe des Computers (3). Doch diese Methode ist noch lange nicht ausgereift. Mit der fortlaufenden Entschlüsselung der Beziehungen zwischen Molekülstruktur und Toxikologie werden diese mathematischen Systeme zur Vorhersage der Giftigkeit jedoch zunehmend interessanter.

Verschiedentlich wurden Vergleichsstudien zwischen zelltoxischen Untersuchungen und LD 50-Werten angestellt. Nach bisherigen Erkenntnissen wird es kaum gelingen, einen wirklich aussagekräftigen Zelltest zur Bestimmung der akuten Toxizität zu entwickeln. Die zelltoxikologische Forschung und, damit verbunden, die Etablierung verlässlicher Messsysteme muss aber unbedingt gefördert werden.

### Augen-Irritation

Der gebräuchliche Test am Kaninchenauge (Draizetest) ist seit langem unter öffentlichem Beschuss, er wurde jedoch auch von wissenschaftlicher Seite schon scharf kritisiert. Unter dem Druck der Tierschutzorganisationen wurden verschiedene Forschungsprojekte in Angriff genommen, um den in-vivo Test ganz oder doch teilweise zu ersetzen. Die möglichen Alternativen umfassen sowohl Verfeinerungsmethoden (Refine) wie auch eigentliche Ersatztests in-vitro.

Bei den Refine-Varianten wird entweder Anästhesie angewandt oder das Testvolumen gesenkt (0,01 ml statt 0,1 ml ins Auge pro Testeinheit). Eine kürzlich beendete Studie zeigte, dass Tests mit niedriger Dosierung gut mit den bekannten Werten aus der Humanmedizin korrelieren. Die Belastung der Kaninchen war sichtlich geringer. Bei einer weiteren Testvariante werden die abgelösten Zellen vom exponierten Auge in regelmässigen Abständen mit destilliertem Wasser weggespült und gezählt. Diese Messmethode ergibt ähnliche Werte wie der herkömmliche Draizetest.

Weitere Verfeinerungsmöglichkeiten sind: Der Verzicht auf Augentests aufgrund von Hauttestergebnissen und aufgrund physikalischer Eigenschaften der Prüfsubstanz, d.h. bei pH-Werten unter 3,0 oder über 11,5. Es ist allerdings zu bemerken, dass manche Chemikalien zwar hautreizend, nicht aber Schleimhautreizend sind.

Als eigentliche Ersatzmethoden wurden verschiedene in-vitro Verfahren entwickelt. Mangels ausreichender Validierung hat sich noch nicht herauskristallisiert, welcher Test oder welche Testbatterie am besten für den praktischen Gebrauch geeignet ist. Vermutlich wird eine Kombination von verschiedenen

Tests zur Abschätzung der Reizwirkungen vonnöten sein. Zurzeit scheint es, dass zelltoxikologische Untersuchungen mit verschiedenen Endpunkten am besten taugen.

Eine weitere bekannte Alternative ist der Test am bebrüteten Hühnerei. Er scheint geeignet, zwischen mittlerer und schwererer Schädigung zu unterscheiden. Vor kurzem wurde ein Modell entwickelt, das imstande ist, die Wundheilung im Epithelgewebe zu simulieren, was Rückschlüsse auf das Heilungsgeschehen zulässt. Damit könnte ein Haupteinwand gegen die Verwendung von Alternativen entkräftet werden. Unter den rund 30 möglichen Testvariablen wird sich wahrscheinlich eine Prüferie herauskristallisieren lassen, die den Draizetest wenigstens teilweise ersetzen kann. Dazu sind umfangreiche Ringversuche aber unumgänglich.

#### Literaturhinweise:

- 1) B.D. Dixon, "What is Science for?", Penguin Books, London (1979)
- 2) R.M. Nardone and J.A. Bradlow, J. Toxicol. Cut. Ocol. Toxicol. 2,81 (1983)
- 3) R.K. Enslein und P.N. Craig, J. Environ. Toxicol., 2, 115 (1978)

