



**Möglichkeiten von Zellkulturmethoden  
und  
von Alternativen zu Tierexperimenten in der Toxikologie**

Christoph A. Reinhardt\*

Vortrag (leicht gekürzt) gehalten am 19. Nov. 1987  
im Institut für Toxikologie  
der ETH & Universität Zürich, Schwerzenbach

**ZUSAMMENFASSUNG**

Grundlegende Verschiebungen in der ethischen, wissenschaftlichen und kommerziellen Einstellung zu Alternativmethoden werden beschrieben als Vorbedingung zu deren stärkerem Durchbruch in der Praxis. Eine Übersicht über die verschiedenen Alternativmethoden mit Betonung von Zellkultursystemen und Toxikologie wird gegeben. Im Ausblick werden vielversprechende Möglichkeiten herausgegriffen und die bekannten Grenzen von in vitro Methoden diskutiert im Vergleich mit tierexperimentellen Möglichkeiten und im Zusammenhang mit Sicherheitsprüfungen in der Toxikologie.

**SUMMARY**

A current basic shift in the ethical, scientific and commercial engagement for alternatives to animal experimentation is described which is a prerequisite for their stronger use in practice. A review on the various alternatives is given with emphasis on cell culture methods and toxicology. The most promising alternatives are prospectively summarized and some known limits of in vitro systems are discussed in comparison with the value of results from animal experimentation and in the context of safety evaluations in toxicology.

**EINLEITUNG**

Wenn wir von Zellkulturmethoden und von Alternativen zu Tierexperimenten gesondert reden, hat dies seinen besonderen Grund. Dahinter verbergen sich nicht einfach terminologische Überlegungen, z.B. ob Zellkulturen nun ein Teil der Alternativmethoden seien oder nicht, sondern verschiedene Ebenen in der grundsätzlichen Problematik um Tierversuche und mögliche Alternativen im Sinne der 3R. Als Voraussetzung müssen für die anschliessenden Überlegungen Definitionen der beiden Begriffe gegeben sein.

\* Neue Adresse: Vergl. Physiologie & Verhaltensbiologie, ETH-Zentrum,  
Turnerstr. 1, 8092 Zürich.



"Zellkulturmethoden" sind Methoden, welche in bestehenden Forschungsrichtungen wie etwa Zellbiologie, Biochemie oder Mikrobiologie mit klarer wissenschaftlicher Begründung als das richtige System zum Studium ihrer Forschungsziele verwendet werden. Diese Systeme sind dabei in den seltensten Fällen Ersatz für Experimente an Tieren und können deshalb nicht mit gutem Gewissen als Alternativmethoden bezeichnet werden.

"Alternativen zu Tierexperimenten" sind an der Zielsetzung orientiert. Diese Definition will klar abgrenzen zwischen Methoden, welche wirklich weg vom lebenden Tier führen, und Methoden, die einfach wissenserweiternd und ergänzend sind und dadurch überhaupt keine Tierversuche ersetzen. Der Begriff "Alternativmethoden zu Tierexperimenten" soll nämlich eine dauernde Herausforderung sein, um bestehende tierexperimentelle Methoden zu hinterfragen (Reinhardt 1985).

#### BEWEGGRÜNDE FÜR ALTERNATIVMETHODEN

Ethische, wissenschaftliche und kommerzielle Gründe – in dieser Reihenfolge der Gewichtung – sind auseinanderzuhalten, wenn die Möglichkeiten und Grenzen beim praktischen Einsatz von Alternativmethoden (im Sinne der 3R) durchschaut werden sollen (Reinhardt 1987). Bei den ethisch motivierten Beweggründen spielt die Grundregel der Güterabwägung zwischen menschlichem und tierischem Wohlergehen eine zentrale Rolle, bei der man es sich nicht zu leicht machen soll (Höffe 1984, Ruh 1985). Bei jedem einzelnen Tierversuch müsste dies grundsätzlich überdacht werden, sonst kann nicht von einer echten Güterabwägung gesprochen werden. In der Schweiz und auch in andern Ländern sind die personell unterdotierten Kontrollbehörden kaum fähig, Prüfungen auf die Notwendigkeit von Tierversuchen, geschweige denn ethische Abwägungen zu machen. Wir müssen hier von einer echten Krise des Vollzugs im Tierschutz reden.

Neuerdings werden die **wissenschaftlichen Gründe** für Alternativmethoden ins Zentrum gestellt, welche aber auf einer mechanistischen Denkweise beruhen, wo einfach das aussagekräftigste Testsystem ausgewählt wird. Naturwissenschaftlich-philosophisches Denken geht aber weit über das hinaus und beinhaltet auch ein Nachdenken darüber, was sinnvoll und vertretbar ist. Dadurch müsste immer hinterfragt werden, ob ein Tierversuch an und für sich sinnvoll und vertretbar sei, oder ob mit einer Alternativmethode auch eine genügende Antwort zu erhalten wäre. Solche Entscheidungen über Tierversuche und Alternativmethoden sollten sicher nicht den ausführenden Wissenschaftlern überlassen werden.



**Kommerzielle** Beweggründe für Alternativmethoden sind in der praktischen Anwendung ausschlaggebend, nicht nur weil die Alternativmethoden weitaus billiger sind als Tierversuche, sondern auch, weil sie meist rasch Resultate erbringen. Deshalb sind entsprechende Tests für frühzeitige Auswahlverfahren (Screening) gesucht. Bei Sicherheitsprüfungen (z.B. für Industriechemikalien) dürften solche Tests je länger je mehr auch für eine grobe Klassierung der potentiellen Risiken ausreichend sein .

## ÜBERSICHT ÜBER MOMENTAN VERFÜGBARE ALTERNATIVMETHODEN

Die folgende Aufzählung soll einen Überblick über Methoden geben, welche bei geeigneter Anwendung Tierversuche ersetzen können. Hier werden also nur die im Sinne des REPLACE brauchbaren Methoden aufgeführt, obwohl sie fast in jedem Fall auch für ein Einschränken oder REDUCE auf wenige, letztlich doch noch zu verbrauchende Tiere (Screening) einsetzbar sind. REFINE ist ein weiteres sehr wichtiges, hier aber nicht behandeltes Thema, denn Probleme wie Schmerz- und Stressvermeidung und optimale Versuchstierhaltung sind nach wie vor ein zentrales Anliegen des Tierschutzes und sind ausserdem für einen guten Versuchsablauf zwingende Voraussetzung. Weiterführende Literatur kann im OTA-Report (1986) und in dessen kritischer Analyse (Balls und Mitarbeitern 1987) gefunden werden.

Ich verzichte hier bewusst auf eine allzu vereinfachende Darstellung einiger klarer Fälle als überzeugende Beispiele des Wertes von Alternativmethoden, wie dies gerne beim "Nachweis" der allgemeinen Unerlässlichkeit von Tierversuchen gemacht wird.

### 1. Datenverarbeitung

Für jede Versuchsplanung und zur Vermeidung von Paralleluntersuchungen wird heute dank weltweiten Computernetzen eine rasche Literaturübersicht vorausgesetzt. Nicht zur Publikation gedachte Tierversuche sind ethisch nicht vertretbar und sollten nicht mehr bewilligt werden. Dass Theorie und Praxis bei gewinnorientierten Unternehmen hier speziell auseinandergehen, soll ein weiterer Anreiz sein, gerade dort Alternativmethoden zuerst zu fördern. Dank raffinierten Computerprogrammen können aber auch epidemiologische Untersuchungen (Verbreitung von Krankheiten und Schäden in der Bevölkerung) gemacht werden, welche deutlicher als jegliche Tierversuche Hinweise auf schädigende Substanzen in unserer Umwelt bringen können.



Vielversprechende Lehrprogramme zur interaktiven (durch den Studenten beeinflussbaren) Demonstration von Tierversuchen sind in der Pharmakologie, Physiologie und Toxikologie entwickelt worden. Computerprogramme werden zur Voraussage von toxikologischen und pharmakologischen Wirkungen von Molekülen entwickelt, wobei die Aussagekraft immer im Bereich der eingegebenen Daten bleiben muss, also neue und unerwartete Wirkungen hier kaum erfasst werden können. Molecular Modelling (Molekül-Aufbau per Comuter) wird hingegen bereits von grossen Pharmafirmen erfolgreich zur Auswahl vermutlich pharmakologisch wirkungsvoller Moleküle eingesetzt, was dann eine gezieltere Synthese im chemischen Labor zur Folge hat, sodass weniger wirkungslose Substanzen an Tieren getestet werden.

## 2. Untersuchungen direkt am Menschen

Solche Studien sind aus der Sicht des Pharmakologen und Toxikologen natürlich besonders gefragt, lösen aber offensichtliche ethische Probleme aus. Hier eröffnet die medizinische Technologie mit raffinierten nichtinvasiven Methoden (nicht eindringend oder verletzend) neue Wege; deren Einsatz ist aber gerade wegen der damit verbundenen Grosstechnologie leider nur auf wenige Zentren beschränkt. Dank der modernen Spurenanalytik können heute Abbau und Umbau von Arzneimitteln direkt im Körper von Patienten oder Freiwilligen verfolgt werden. In der Lehre und Ausbildung von Medizinern sind elegante elektrophysiologische Experimente an sich selbst statt an Fröschen vorgeschlagen worden, welche je länger je mehr Erfolg bei Studenten und Dozenten zeigen.

## 3. Niedere Tiere statt höhere Tiere

Hier besteht der unumgängliche Konflikt, dass die wissenschaftliche Aussagekraft für den Menschen mit der Komplexität des untersuchten Tieres abnimmt. So muss für jede dieser Tierarten genau bekannt sein, wo die Grenzen des Vergleichs liegen, und damit sind wir beim Problem der Verlässlichkeit von Alternativmethoden angelangt (siehe unten: Validierung). Die Verwendung von sogenannt niederen Tieren anstelle von Wirbeltieren ist ethisch aber sicher gerechtfertigt, solange eine echte Güterabwägung stattfindet. Dies kann nicht mit dem Argument der "letzten ethischen Konsequenz" wediskutiert werden.

Die Fruchtfliege Drosophila wird wegen ihrer gut bekannten Erbmasse für Mutagenitätstests (Tests auf Erbschädigungen, Würgler 1987) eingesetzt, und das in unsern noch sauberen Seen vorkommende Hohltier Hydra wird wegen seiner auffallenden Regenerationsfähigkeit bei Tests für entwicklungsschädigende Substanzen gebraucht. Andere niedere Tiere und auch Pflanzen (Daphnien, Kresse) sind schon für die Überprüfung der Wasserqualität oder für allgemeine Schadstoffnachweise in der Umwelt empfohlen worden.



#### 4. Organsysteme statt intakte Tiere

Kleine intakte Gewebestückchen aus einzelnen Organen bieten Probleme bei Zell-Ernährung und Sauerstoffversorgung und sind deshalb nur schwer zu kultivieren. Sie werden aber seit langem zur Erforschung von Organbildung und Organfunktionen eingesetzt. Lebend-Schnittpräparate haben sich als Alternativmethode besser bewährt, so z.B. Hirnschnitte für neuropharmakologische Fragestellungen. Grössere Gewebestückchen können für einige Stunden intakt gehalten werden, so z.B. Augen und Hautstücke (aus dem Schlachthof) zum Studium des Eindringvermögens von Salben und kosmetischen Produkten. Ganze Organe (Herz, Darm, Leber) werden für gewisse pharmakologische und physiologische Untersuchungen mit Nährlösungen und Testsubstanzen durchspült, wobei aber kaum Tiere eingespart werden. Hühnerembryonen werden vor allem in Deutschland als Alternative zum Augenreiztest am Kaninchen vorgeschlagen, wobei hier berechtigte Zweifel aufkommen, ob von einer tierversuchsfreien Methode gesprochen werden darf.

#### 5. Einzel-Zellsysteme

Frisch isolierte Zellen aus Wirbeltieren (inklusive Mensch) verändern sich rasch in der Kulturschale und werden deshalb zum Studium von kurzfristigen Zellvorgängen verwendet. Langzeitkulturen sind "unsterbliche", aber anormal rasch wachsende Zellen, welche wegen ihrer Ähnlichkeit mit Krebszellen intensiv erforscht werden. Als Alternativmethode sind diese Zellen nur bei relativ groben Gifttests einsetzbar, wie etwa für den Augenreiztest nach Draize (siehe unten) oder für Gewebeverträglichkeitstests.

Mikroorganismen (Protozoen, Bakterien, Hefen) werden seit Jahren beispielsweise für den Nachweis von Erbschädigungen (Mutagenitätstests) eingesetzt, obwohl die Grenzen allzu einfacher Systeme und deren Übertragbarkeit auf den Menschen dann offensichtlich werden.

#### 6. Komplexere Zellsysteme

Mehrschichtige Zellrasen, Co-Kulturen verschiedenartiger Zelltypen und dreidimensionale Zellkomplexe sind demgegenüber vielversprechender, ausserdem können diese Formen von Zellkulturen langfristig stabil gehalten werden. Um die Zellfunktionen ihrer ursprünglichen Natur gemäss zu erhalten, werden dafür die Kulturbedingungen momentan in verschiedenen Labors laufend verbessert. Diese Systeme sind in ihrer Anwendung noch bei weitem nicht ausgeschöpft.

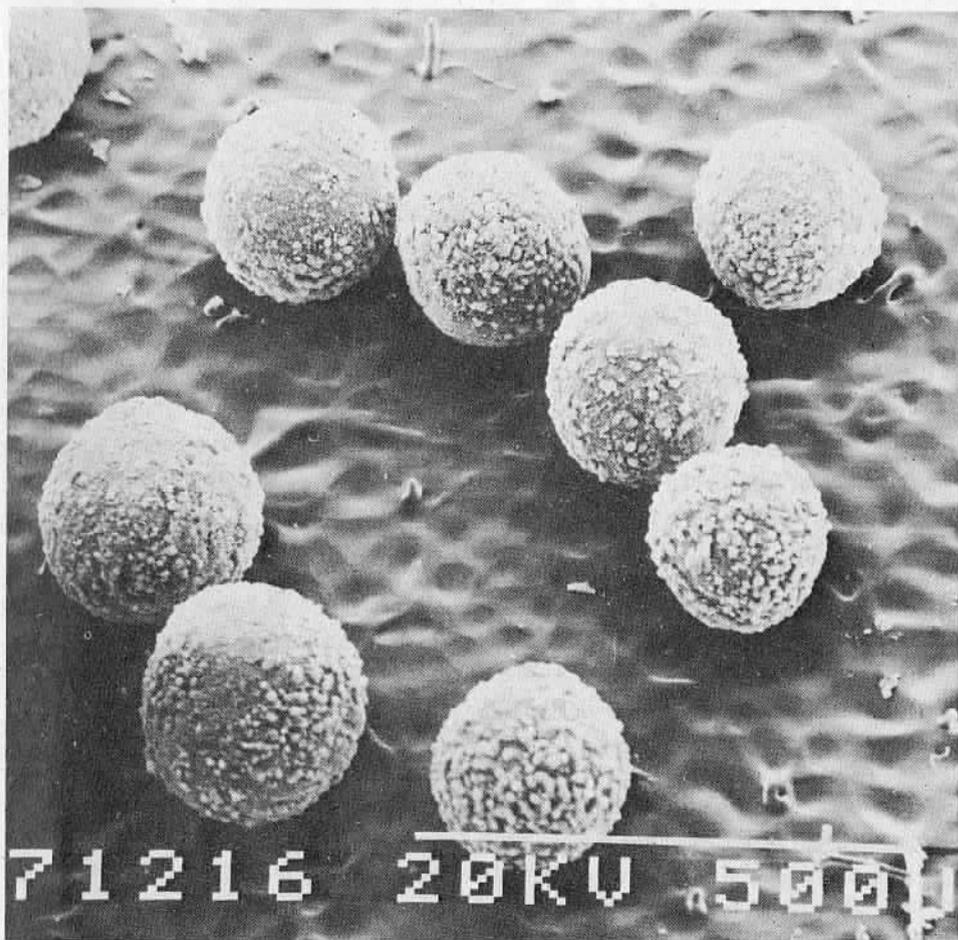


In England werden auf breiter Basis bereits routinemässig gewisse embryonale Zellen aus Hirn und Beinanlagen von Ratten in sogenannten Massenzellkulturen reifen gelassen, um eine mögliche Entwicklungs- oder Frucht-Schädigung (Teratogenität) durch neu entwickelte Chemikalien und Medikamente abzuschätzen. Substanzen, welche in diesem Test als potentiell fruchtschädigend erkannt sind, werden nicht weiter entwickelt und kommen so nie in einen Tierversuch. Die wenigen Substanzen, welche schlussendlich auf den Markt kommen sollen, werden aber sicherheitshalber immer noch in einem Fütterungstest an trächtigen Ratten oder Kaninchen auf teratogene Wirkung hin untersucht.

Aggregatkulturen in Schüttel- oder Rührersysteme bilden hier eine speziell vielversprechende und praktische Form von komplexen Zellsystemen. Neurale Zellen (Abb. 1), aber auch Leberzellen und weitere Zelltypen aus den verschiedensten Organen werden für teratologische, neurotoxikologische Zwecke, aber auch für Studien über Vorgänge bei der Tumordinvasion in Aggregaten kultiviert (Bräuner 1987).

#### 7. Biochemische Methoden

In diese Gruppe fallen Methoden, welche mit Zellteilen oder natürlichen Eiweissgemischen aus Tieren auskommen. Zum Beispiel reagieren die Blutproteine des Limulus (eine urtümliche Krebsart aus dem Meer) auf viele fieberauslösende Substanzen, welche Injektionslösungen für klinischen Gebrauch verunreinigen können. Die Qualitätskontrollen für diese Lösungen müssten deshalb nicht mehr an Kaninchen durchgeführt werden. Ebenso müssen hier Qualitätskontrollen für Hormone und Impfstoffe erwähnt werden, welche mit steigendem technischen Wissen immer mehr ohne tierverbrauchende Routinetests auskommen.



**Abbildung 1:** Zellaggregate aus Hunderten von embryonalen Hirnzellen aus einem 8 Tage alten Hühnerembryo photographiert in einem Rasterelektronenmikroskop (Photo: Reinhardt & Bruinink).

In sogenannten Schüttelkulturen werden diese Zellkugelchen spontan gebildet. Die noch nicht differenzierten Zellen entwickeln sich innert wenigen Tagen zu aktiven Nervenzellen sowie zu verschiedenen Gliazellen, ähnlich wie bei der normalen Hirnentwicklung im Embryo.



## GEWICHTUNG DER MÖGLICHKEITEN UND GRENZEN von Zellkulturmethoden und von Alternativmethoden in der Toxikologie

### Möglichkeiten

Um die breitfächerige Aufzählung obiger Methoden stärker zu gewichten, möchte ich hier die meiner Meinung nach vielversprechendsten Ansatzpunkte für Alternativmethoden hervorheben, nämlich bei der Produkteentwicklung und Produktesicherung, wo auch der weitaus grösste Teil der Tierexperimente eingesetzt wird.

Im Sinne eines Vorscreenings werden bei toxikologischen Routinetests zum Nachweis einer akuten Toxizität oder Teratogenität bereits heute intensive Anstrengungen zu mindestens einer Senkung der Tierverbrauchszahlen unternommen (REDUCE). Bei Haut- und Augenreiztests wären einfache Zelltests schon längere Zeit vorhanden, diese werden aber noch nicht als genügend abgesichert und aussagekräftig angesehen.

Ein positives Beispiel für eine beschleunigte Validierung bildet ein breit angelegter Ringversuch des deutschen Bundesgesundheitsamtes (BGA), an dessen Planung ich mitarbeiten konnte. Für den Ersatz des Draizetests am Kaninchenauge (Augenreizprüfung) führen jetzt etwa ein Dutzend deutsche Industrie- und Hochschullabors zwei Alternativmethoden (Hühnerembryo, Zellkulturen) ein. Nach der Auswertung der unabhängig durchgeführten Paralleluntersuchungen kann dann die Verlässlichkeit und Voraussagekraft dieser Methoden abgeschätzt werden. Die Reizwirkung der Testsubstanzen muss aus früheren Versuchen am Kaninchen bekannt sein, und Erfahrungen aus Unfällen am Menschen werden miteinbezogen. Diese Daten werden aber den Versuchsleitern erst nach Abschluss der Untersuchungen mitgeteilt, um eine objektive Versuchsdurchführung zu garantieren. Erste Resultate sind rund in einem Jahr zu erwarten.

Die heutige Forderung nach Validierung von Alternativmethoden muss auch im Lichte der Tatsache gesehen werden, dass die meisten der bestehenden Tiermodelle nie richtig validiert wurden, sondern sich schlicht mit der Zeit einbürgerten.



Bei der Suche von pharmakologisch aktiven Substanzen werden Alternativmethoden eingesetzt, sobald der gesuchte Wirkungsmechanismus etwas verstanden wird. Dies ist in Industriebetrieben bereits seit langem vorangetrieben worden, läuft aber aus Bedenken vor eventuellen Risiken oder aus Sicherheitsgründen oft nur als Ergänzung neben den etablierten Tiertests einher.

Bei der Produktesicherung sind die Prüfvorschriften rascher dem Stand der Technologie anzupassen, wie z.B. bei Qualitätskontrollen medizinischer Produkte (Hormonpräparate, Impfstoffe, Arzneimittel).

In der Ausbildung von Medizinern, Biologen und Laboranten sollten auch aus pädagogischen Gründen alle Tierexperimente ausgemerzt werden. Wenn nämlich Tierexperimente in einem Forschungsprojekt gezielt eingesetzt werden, muss die spezielle Technik sowieso im Detail eingeübt werden.

### Grenzen

Beim "Nachweis" der Unbedenklichkeit von Arzneimitteln sollen langfristige oder verzögerte Organschäden ausgeschlossen werden können, ebenso eine krebserzeugende oder fruchtschädigende Wirkung. Dass hier Alternativmethoden z.Z. überfordert sind, mag daran gemessen werden, wie schwierig es auch mit tierexperimentellen Methoden ist, eine tragbare Sicherheitsabschätzung zu machen.

Grund: Oft ereignen sich unvorhersagbare Stoffwechselforgänge, welche giftige Abbauprodukte der Arzneimittel entstehen lassen. Wenn nun diese nicht oder nicht genug rasch ausgeschieden werden, können sie sich in irgendeinem Organ anreichern und nach einer längeren Phase plötzlich schwere Schäden anrichten. Diese Probleme sprechen aber keinesfalls gegen Alternativmethoden (sie gelten ebenso für Tierversuche), sondern nur für unsere Unwissenheit über die Körpervorgänge.



Beim Nachweis von allergischen Reaktionen, Schmerzreaktionen, Veränderungen von Herz und Kreislauf ist zwangsläufig das ganze Individuum mit einbezogen. Infolge der Wechselwirkung mehrerer Zelltypen in verschiedenen Körperräumen (Blut, Stützgewebe, Knochenmark, Milz, Nervensystem) können einzelne Zellsysteme die Reaktion des menschlichen Körpers nicht simulieren. Da jede Tierart hier spezielle Reaktionen zeigt, sind Voraussagen über solch komplexe Vorgänge für den Menschen in jedem Falle äusserst schwierig. Ein besseres Verständnis der Körperfunktionen und seiner Abwehrmechanismen lässt jedoch in Zukunft darauf hoffen, dass die kritischen Schritte dabei erkannt werden. Mit den entsprechenden Zelltypen unter den richtigen Bedingungen sollten dann Modellsysteme entwickelt werden können, welche besser als jedes Tiermodell dem Menschen direkt angepasst sind.

Verantwortungsvolle klinische Versuche und ein effizientes und langfristiges Verfolgen der Nebeneffekte eines breit eingesetzten Arzneimittels halten die verbleibenden Risiken hier in Schranken.

#### Literatur

- Balls, M., T.L.S. Sprigge, R.F. Drewett, D.J. Benford, R. Heywood, D.B. Morton, D. Bawden, H. McCormick, C. Hollands & S. Haywood (1987): The US Congress Office of Technology Assessment Report on Alternatives to Animal Use in Research, Testing and Education. *Alternat. Animal Exper. (ATLA)* 14, 289-374.
- Bräuner, T. (1987): Interzelluläre Kommunikation und invasives Wachstum maligner Zellen. Stöffer & Schütz Verlag, Stuttgart, 192pp.
- Höffe, O. (1984): Ethische Grenzen des Tierversuchs. In: "Tierschutz" U.M. Haendel (ed.), Fischer, 82-99.
- OTA-Report, (1986): Alternatives to animal use in research, testing and education. Office of Technology Assessment, Congress of the United States, Washington, 441pp.
- Reinhardt, C.A. (1985): Was ist eine Alternativmethode ? *Alternat. Tierexp.* 2, 3-4.
- Reinhardt, C.A. (1987): Beweggründe für Alternativmethoden. *Alternat. Tierexp.* 7, 3-4.
- Ruh, H. (1985): Ethik und Tierversuch. *Alternat. Tierexp.* 3, 5-20.
- Würgler, F.E. (1987): Die Bedeutung der Kurzzeit-Tests in der genetischen Toxikologie. *Alternat. Tierexp.* 6, 40-51.

WIE ES MIT MEINER  
ALTERNATIVMETHODE VORANGEHT?  
ICH FÜRCHTE, ICH WERDE MIR  
EINE ALTERNATIVMETHODE SUCHEN MÜSSEN !

