



# Vor- und Nachdenkliches ... zur Evolution der Toxikologie und dem Ausstieg aus Tierversuchen

Thomas Hartung<sup>1</sup> und Marcel Leist<sup>2</sup>

<sup>1</sup>EC Joint Research Centre, IHCP/ECVAM, Ispra, Italien; <sup>2</sup>Doerenkamp-Zbinden Lehrstuhl für in vitro Methoden zum Tierversuchersatz, naturwissenschaftliche und mathematische Fakultät, Universität Konstanz, Deutschland

Auf dem Gebiet der Toxikologie tut sich etwas: Die Vision und Strategie der *US National Academy of Sciences* (NRC, 2007) aus dem letzten Jahr hat viele Toxikologen auf beiden Seiten des Atlantiks aktiviert. Im Februar 2008 gab eine Reihe von amerikanischen Agenturen eine Koalition zur Umsetzung dieser Vision bekannt (<http://www.sciencemag.org/content/vol319/issue5865/index.dtl>): „Wir schlagen eine Verlagerung von primär *in vivo* Tierexperimenten auf *in vitro* Ansätze, *in vivo* Ansätze mit niederen Organismen und Computermodellierung für Toxizitätsbeurteilungen vor.“ In „USA Today“ des selben Tages finden wir einen Kommentar von Francis Collin, Direktor des *National Human Genome Research Institute*: „[Toxizitätstestung] war teuer, zeitintensiv, verbrauchte grosse Anzahlen von Tieren und funktionierte nicht immer.“ Im gleichen Artikel wird Elias Zerhouni, Direktor des NIH zitiert: „Tierversuche werden nicht über Nacht verschwinden, aber die Arbeit der Agenturen signalisiert

den Anfang vom Ende.“ Wir haben so etwas bisher noch nie von Vertretern der amerikanischen Bundesagenturen gehört. Was ist da los? Was können wir wirklich erwarten und wann?

**Hypothese 1: Wie jede Wissenschaft entwickelt sich die Toxikologie weiter – der Druck zur Anpassung der regulatorischen Toxikologie an den wissenschaftlichen Fortschritt könnte den nächsten Schritt zu einer revolutionären Veränderung machen**

Wissenschaft entwickelt sich in Wellen (Kuhn, 1970), oft getrieben durch neue Technologien oder gesellschaftlichen Druck. Die Toxikologie untersteht auch diesen Einflüssen, und die Risikobewertung ändert sich über die Zeit (Sexton et al., 1995; Henry, 2003). Die Toxikologie hat beide dieser Einflüsse bereits gespürt,

z.B. bei der Einführung von Forschung an Kleintieren vor fast einhundert Jahren und aufgrund der Skandale, z.B. um Thalidomid (Contergan). Die regulatorische Toxikologie steht noch auf einer evolutionären Stufe, die insgesamt den Stand des Wissens bei ihrer Etablierung widerspiegelt, mit ein paar moderneren „Flicken“ die später dazu kamen. Wir haben dies bereits in dieser Artikelserie diskutiert (Bottini et al., 2007): Einzigartig in den wissenschaftlichen Disziplinen ist die regulatorische Toxikologie durch die Praxis der Definition von (Test-)Richtlinien erstarrt. Es gibt keinen Zweifel an der Bedeutung dieses Prozesses, um in dem regulierten Bereich Sicherheit zu gewährleisten und um internationale Harmonisierung (gegenseitige Anerkennung von Daten) zu ermöglichen, aber wir beobachten immer mehr Entkopplung zwischen einer mechanistischen, modernen Toxikologie und den starren Ansätzen im regulatorischen Bereich. Die internationale Koordination von regulatorischen Testvoraussetzungen waren in der Vergangenheit die effizientesten Mittel zur Reduktion von Tierversuchen durch die Vermeidung von mehrfacher Testung. Ironischerweise hat sich dies nun als eine Hürde für die Einführung neuer (tierfreier) Methoden erwiesen. Abbildung 1 versucht die Entwicklung der Toxikologie darzustellen, angefangen mit der historischen „Kunst der Vergiftung“, da schon die alten Römer sehr detaillierte Informationen zu den Wirkungen von Giften sammelten; sie zeigt auch neuere Entwicklungen und mögliche zukünftige Richtungen, wie die Evidenz-basierte Toxikologie und Systemtoxikologie („*Systems Toxicology*“). Wir haben bereits das Konzept einer Evidenz-basierten Toxikologie ausführlich besprochen (Hoffmann and Hartung, 2006) und werden uns des-

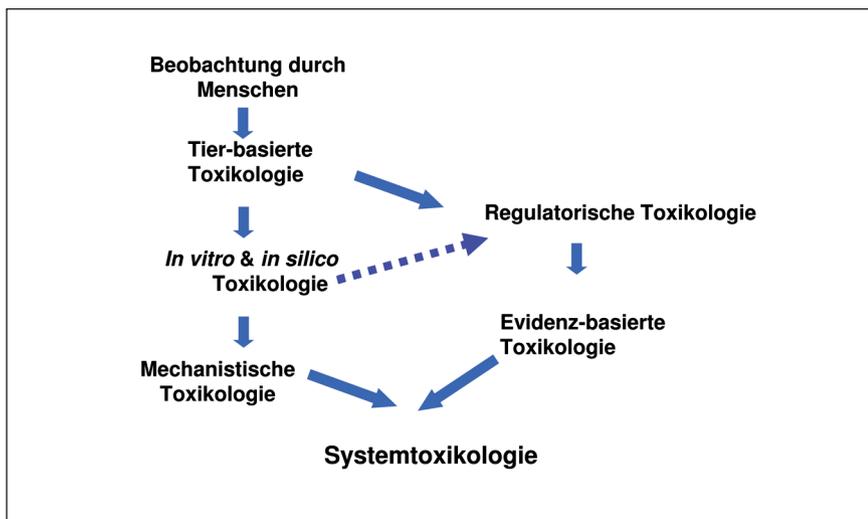


Fig. 1: Die Entwicklung der Toxikologie



halb hier auf eine kurze Zusammenfassung und Informationen zu neuen Entwicklungen beschränken. Im Gegensatz dazu wird das Konzept einer Systemtoxikologie und deren mögliche Rolle in der regulatorischen Arena eine detailliertere Diskussion erfordern (siehe auch Leist et al., in diesem Heft).

In diesem Artikel entwickeln wir die Vision, dass die moderne, mechanistische Toxikologie, die von der empirischen/deskriptiven Toxikologie entkoppelt wurde (Abb. 2), mit dieser wiedervereint werden kann; die neu entstehenden Chancen sind eine kritische Selbsteinschätzung (Evidenz-basierte Toxikologie) und die Einführung von modernen Technologien (Systemtoxikologie).

### Hypothese 2: Toxikologie kann aus der klinischen Medizin lernen und einige Konzepte der Evidenz-basierten Medizin übernehmen

Der Wunsch, die Risiken, die von Nahrungsmitteln und Substanzen in unserer Umgebung ausgehen, zu verstehen, ist so alt wie das Begehren, Krankheiten zu heilen. Daher haben sich viele Ansätze und Traditionen entwickelt und bestehen auch fort, obwohl die Wissenschaft in den letzten zwei Jahrhunderten beide Disziplinen übernommen hat. Vorurteile und Traditionen sind schwer auszumerzen, vor allem, wenn sich die neuen wissenschaftlichen Ansätze nur langsam entwickeln und oft nur von Spezialisten verstanden werden können.

Sogar für Spezialisten kann es schwierig werden, die richtige Information aus der riesigen Menge an vorrätiger Information auszuwählen. Dieses Problem der Informationsüberflutung wurde von Hall (1998) und Davidoff (1995) für das Gebiet der Medizin im Allgemeinen beschrieben. Mehr als 10.000 medizinische Zeitschriften publizieren mehr als 2 Millionen Artikel pro Jahr. Ein/e Internist/in müsste pro Tag 17 Artikel lesen, um in der Diagnostik und Therapie auf dem neusten Stand zu sein, aber laut Umfragen stehen ihr/ihm pro Woche lediglich 30-60 Minuten zum Lesen zur Verfügung. Eine verlässliche Kondensation des Wissens ist daher notwendig. Mit den höchsten Standards der Qualitätssicherung und der Transparenz

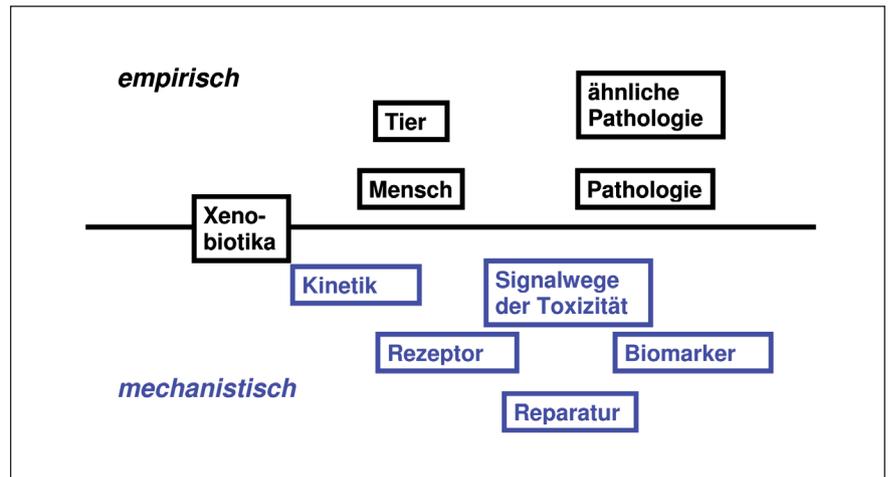


Fig. 2: Empirische versus mechanistische Toxikologie

setzt sich die „Cochrane Collaboration“ ([www.cochrane.org](http://www.cochrane.org)) genau dies zum Ziel; sie strukturiert die vorhandenen Erfahrungen für eine bestimmte Behandlung oder ein diagnostisches Problem und stellt diese in einer Datenbank zur Verfügung. Mit der Hilfe von ungefähr 16.000 Medizinern sind bislang ca. 5.000 Richtlinien einer Evidenz-basierten Medizin (EBM) erstellt worden (Mayer, 2004).

Mein (T.H.) persönliches Aha-Erlebnis, das mich dazu brachte, diese Konzepte auf die Toxikologie zu übertragen, war ein Buch meines Freundes Eddy Neugebauer „*Handbook of mediators in septic shock*“ (Neugebauer und Holaday, 1993). Zusammen mit seinem Koautor wandte er, soweit ich weiss zum ersten Mal, den EBM-Ansatz nicht nur wie allgemein üblich auf klinische Daten an, sondern auch auf Daten aus Tierversuchen und sogar auf *in vitro* Daten. Die Idee, diese Konzepte auch auf die Toxikologie zu übertragen, hat sich seitdem weiterentwickelt; Sebastian Hoffmann und ich haben sie weiter ausgeführt (Hoffmann and Hartung, 2005) und fördern sie mit dem ECVAM-Team und Kollaborateuren des 1. Internationalen Forums „*Toward an evidence-based toxicology*“ ([www.ebtox.org](http://www.ebtox.org)). Die Veröffentlichungen dieses Forums sind auf dem Weg, daher können wir uns hier auf ein paar Punkte beschränken.

EBTox ist nicht ein neuer Name für „Alternativmethoden“. Das vorrangige Problem der regulatorischen Toxikologie ist nicht, neue Methoden aufzunehmen, sondern alte zu ersetzen. Ohne einen Me-

chanismus, der kritischen Selbstbeurteilung, tendieren wir dazu, Denktraditionen auszubilden, die unseren Ansatz nicht mehr in Frage stellen. Ohne eine detaillierte Analyse unseres Werkzeugs wird sich die Toxikologie nur in der Art eines Flickenteppichs weiterentwickeln. EBM lehrt uns, dass ein rigoroser Prozess der Tatsachenfeststellung und der Interpretation, wo notwendig, zu einem Konsens für Veränderung führen kann. Kein Prozess kann gute Wissenschaft ersetzen, aber wir können systematisch beurteilen, was gute Wissenschaft ist, was keine gute Wissenschaft ist, und wo wir es noch nicht einschätzen können. Eine meiner Lieblingsredewendungen ist: „Man muss kein Ei legen können, um ein faules zu schmecken“; es ist keine Voraussetzung, etwas Besseres zu haben oder vorschlagen zu können, um die Grenzen und Schwächen (wie auch die Stärken) von gängigen Ansätzen erkennen zu können.

### Hypothese 3: Neue Technologien erlauben einen neuen Ansatz in der Toxikologie

Die Methoden der Zellkultur haben sich in den letzten Jahrzehnten stetig verbessert; heute sind fast alle Zellen des Organismus verfügbar, häufig sogar in organotypischer Kultur. Trotzdem stellen Primärzellen, die direkt aus Gewebeproben isoliert werden, die nächste Annäherung an die physiologische Situation dar. Für menschliche Zellen bedeutet dies Einschränkungen bezüg-

lich der Verfügbarkeit, da die Isolierung häufig in räumlicher Nähe zu chirurgischen Einrichtungen stattfinden muss. Es bedeutet auch, dass die Zellen häufig von kranken oder alten Spendern stammen. Durch Kryokonservierung und steigende Zahlen von Anbietern sind nun zumindest gefrorene Zellen für viele Systeme verfügbar, jedoch immer noch begrenzt durch Kosten und Quantität. Die spannendsten Aussichten entstehen derzeit durch Stammzelltechnologien, die versprechen, (menschliche) Zellen in hoher Qualität und ausreichender Menge verfügbar zu machen (Bremer et al., 2004; Stumann et al., 2008). Optimale Protokolle, mit denen verlässlich differenzierte Zellen mit den Charakteristika der Gewebssituation generiert werden können, sind noch rar. Vor allem die Reinheit und der definierte Differenzierungsstatus der generierten Zellen stellen noch Probleme dar. Trotzdem sollten in naher Zukunft Zellpräparationen von vielen menschlichen Zellarten in hoher Qualität verfügbar sein.

Gleichzeitig bewegt sich die Zellkultur weg von einfachen Endpunkten und manueller Handhabung zu Messungen mit hohem Durchsatz (*high-throughput*) und hohem Informationsgehalt (*high-content*). Das bedeutet, dass Automatisierung eine parallele oder wiederholte Durchführung von Experimenten in häufig miniaturisierten Zellmodellen erlaubt, durch die viele Testsubstanzen im gleichen System oder eine Substanz in verschiedenen Variationen des Zellmodells getestet werden können. Diese Technologie ist für die Selektion von pharmazeutischen Wirkstoffen sehr weit entwickelt; praktisch jede grosse Firma hat nun eine Substanzbank von hunderttausenden Substanzen, die in zellulären oder subzellulären Selektionsansätzen durchgetestet werden. In der Toxikologie sind die relevanten Dimensionen des Durchsatzes deutlich niedriger. Hauptaktivitäten stellen das *ToxCast Programm* ([www.epa.gov/comptox/toxcast](http://www.epa.gov/comptox/toxcast)) und die *Tox Testing Collaboration des National Toxicology Program* ([www.ntp.niehs.nih.gov/](http://www.ntp.niehs.nih.gov/)) in den USA und das *InViTech Programm* zwischen ECVAM und der „*Nanotechnology and Molecular Imaging*“ Abteilung am EU Joint Research Centre (<http://nmi.jrc.it/projects/InViTech.htm>) dar. Es erscheint nun an der Zeit, die notwendigen Substanzbanken zusammenzu-

stellen, um diese Ansätze voll zu nutzen; z.B. würde eine Sammlung einer grossen Anzahl von REACH Substanzen es ermöglichen, Daten für die vorläufige Risikoabschätzung im REACH-Prozess zu liefern, bevor Tierversuche überhaupt vorgeschlagen werden. Die Aussichten auf Hochdurchsatztestung werden das Thema eines zukünftigen „Vor- und Nachdenkliches ...“ Artikels sein.

Im Gegensatz zum Hochdurchsatz-Testansatz (*high-throughput*), der es erlaubt, Information für viele Substanzen zu gewinnen, liefern Ansätze mit hohem Informationsgehalt (*high-content*) viele Daten aus einem Testsystem für jede Substanz. Die bekanntesten Beispiele sind sicherlich die -omik-Technologien, vor allem Genomik, Proteomik und Metabolomik. Während diese drei am weitesten entwickelten -omik-Technologien sich unterscheiden bezüglich dem, was und wie gemessen wird, typischerweise Genchips, Gelelektrophorese, Massenspektroskopie und magnetische Kernresonanz (NMR), haben sie gemeinsam, dass viele Endpunkte (meist der gleichen Art) aufgenommen werden, was biostatistische Ansätze und Dataming nach sich zieht. Interessant ist, dass diese Technologien auch mit *in vivo*-Testsystemen kombiniert werden können, was Möglichkeiten für deren Verbesserung und Reduzierung von Tierzahlen eröffnet. Zum Beispiel könnten frühe, voraussagekräftige Störungen kürzere Behandlungsdauern erlauben, sensitivere Messungen könnten Ansätze mit niedrigeren Dosierungen ermöglichen, und multiple redundante Endpunkte könnten die Variabilität reduzieren, wodurch die Gruppengrößen kleiner gehalten werden könnten.

Momentan bieten sich im Prinzip drei Nutzungsmöglichkeiten der -omik-Technologien an, die der Toxikologie neue Qualitäten bieten würden:

1. Die parallele Messung vieler Endpunkte könnte genutzt werden, um festzustellen, welche davon prädiktiv sind und im Weiteren als Biomarker genutzt werden könnten, was durch anschließende Validierung bestätigt werden müsste; der so identifizierte Biomarker könnte anschliessend mit selektiveren Methoden, wie PCR oder ELISA, gemessen werden.
2. Typische Toxizitätsmuster, die Pathologien charakterisieren, könnten identifi-

ziert werden, ohne notwendigerweise feststellen zu müssen, was die individuellen Signale bedeuten (z.B. durch Anwendung des mathematischen Prinzips der Hauptkomponentenanalyse); in diesem Falle könnte der -omik-Ansatz genutzt werden, um ähnliche Muster zu suchen, die durch neue Substanzen induziert werden.

3. Zunehmend wird die Interpretation der -omik-Daten durch die Kenntnis der Signalwege, d.h. wie zum Beispiel verschiedene Gene und Genprodukte interagieren, erleichtert. Der Begriff „Systembiologie“ wurde auf diese Art von gerichteter Datenintegration, die manchmal sogar verschiedene -omik-Technologien integriert, gemünzt. Es wird erwartet, dass diese Strategie auch in der Toxikologie angewandt werden kann, was eine Systemtoxikologie etablieren würde. Dies würde jedoch voraussetzen, dass die Signalwege der toxikologischen Prozesse bekannt wären.

Wir sehen auch eine rasende Entwicklung anderer informationsreicher Methoden, die durch automatisierte Bildanalyse ermöglicht wird. Das kann auf Zell- oder Gewebeebene durchgeführt werden. Insgesamt ist die Standardisierung und Anwendung hier nicht so stark fortgeschritten wie für die -omik Technologien, aber neue Entwicklungen werden in nächster Zeit erwartet. Abbildung 3 fängt ein, wie diese Technologien interagieren und letztendlich zur Entwicklung einer Systemtoxikologie führen könnten: Im Wesentlichen verschiedene, neue informationsreiche Technologien, kombiniert mit etabliertem wissenschaftlichen Wissen (Wissen über biochemische Signalwege, Wissen von Mustern/Toxizitätssignaturen; Wissen über Biomarker; Wissen über Pharmakokinetik und chemische Eigenschaften) durch rechnerische Ansätze.

Die reduktionistischen Ansätze der ersten Generation von *in vitro*-Methoden (Einzelzellsysteme mit oft limitierter Funktionalität) wurden häufig aufgrund der Prinzipien der Chaostheorie als ungenügend kritisiert. Kann Information über die Toxizität für einen ganzen Organismus realistisch durch die Zerteilung in Komponenten und das anschliessende Zusammensetzen erhalten werden? Das neue Gebiet der Systembiologie hat be-

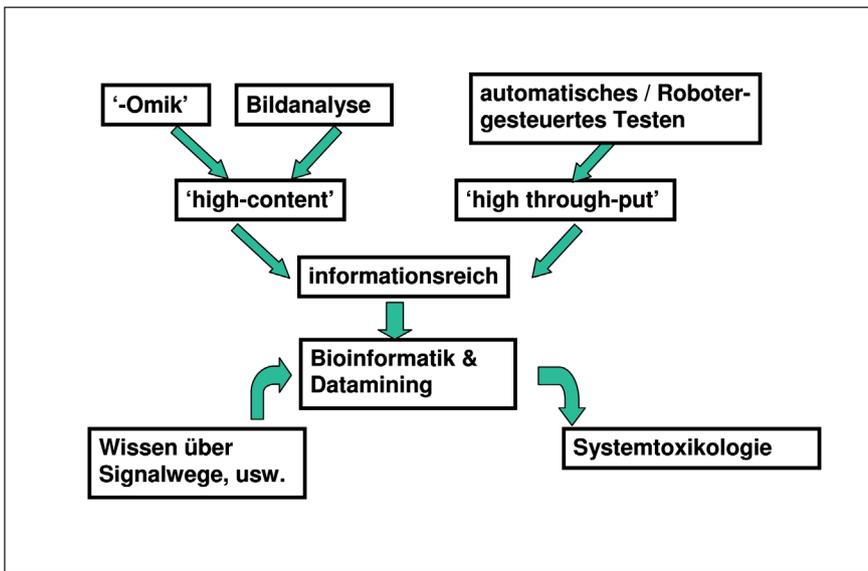


Fig. 3: Der Weg zur Systemtoxikologie

reits vielversprechende Ergebnisse geliefert, die darauf hindeuten, dass dies tatsächlich möglich sein könnte.

Schnelle Entwicklungen sind bei allen Stufen des Diagramms zu beobachten, doch eine grosse Sorge ist das Fehlen einer Koordination der Entwicklungen. Dies bedeutet häufig, dass Vergleiche und kombinierte Analysen von Techniken behindert sind. Am wichtigsten ist, dass die selben ausgewählten Substanzen mit hoher Priorität von den verschiedenen Gruppen verwendet werden. Ferner könnte Expertenkonsens die Entwicklungen lenken, damit die besten Zellsysteme mit den Tests kombiniert werden und die verschiedenen Möglichkeiten zur Datenanalyse effektiv genutzt werden.

#### **Hypothese 4: Die Synergie von verschiedenen wissenschaftlichen und politischen Entwicklungen auf beiden Seiten des Atlantiks gibt Hoffnung für ein globales Projekt zu „menschlichen Reaktion auf Chemikalien“**

Unser Wissen darüber, wie kleine Moleküle Zelle, Organ und Funktion des Organismus beeinflussen, ist auf sehr wenige Substanzen beschränkt. Von schätzungsweise 140.000 Chemikalien auf dem Markt haben wir breite toxikologische Daten für weniger als 10% und kennen

von noch weniger dieser Substanzen vorteilhafte Wirkungen. Die Wirkungsweise ist für die meisten Substanzen enigmatisch. Unser Wissen über die biochemischen Prozesse und zellulären Akteure wuchs im letzten Jahrhundert explosiv an. Eine systematische Analyse der Signalwege, in denen diese Effektoren interagieren, gäbe uns die Werkzeuge in die Hand, in der Forschung bestimmte zelluläre Funktionen an- und auszuschalten, pharmakologische Zielstrukturen zu identifizieren, welche gerichtete Wirkstoffentwicklungen ermöglichen, und nicht zuletzt die Signalwege der Toxizität zu charakterisieren, die bekannt sein müssen, um in eine neue Toxikologie einzusteigen, wie sie im Vision- und Strategie-Dokument der US National Academy of Sciences bereits zitiert ist.

Wir sollten uns im Klaren sein, dass ein solcher Ansatz Mittel in der Grössenordnung voraussetzt, wie sie für das humane Genomprojekt benötigt wurden, und dass dieses Ziel nur mit einer ähnlich internationalen Zusammenarbeit erreicht werden kann. Die US-Initiative, eine Koalition der wichtigsten Agenturen zu bilden, um die NAS-Vision umzusetzen, stellt einen sehr vielversprechenden „top-down“ Ansatz dar. In Europa haben sich in vielen nicht-koordinierten Projekten eine Reihe von Aktivitäten in einem „bottom-up“ Ansatz ähnliche Ziele gesteckt. Verschiedene Projekte, die durch die EU finanziert werden,

haben begonnen, die -omik-Technologien für toxikologische Anwendungen einzusetzen (z.B. [www.Carcinogenomics.eu](http://www.Carcinogenomics.eu), [www.predictomics.com](http://www.predictomics.com), <http://comics.vitaminb.com>). Vor kurzem hat Holland die Initiative ergriffen und ein *National Toxicogenomics Centre* ([www.toxicogenomics.nl](http://www.toxicogenomics.nl)) eingerichtet und führt Gespräche über ein mögliches ASAT (*Assuring Safety without Animal Testing*) Projekt ([www.asat-initiative.eu](http://www.asat-initiative.eu)). Zusammen mit kleineren Ansätzen durch COLIPA, ECE-TOC usw. – manche noch in Planung – stellt dies in der Summe ein beachtliches Forschungspotential dar, welches für ein solch globales Projekt den Nukleus bilden könnte. Es wird unabdingbar sein, eine Plattform für die Koordination der Etablierung und Führung einer solchen Kollaboration zu entwickeln. Aufgrund des Mangels an Europäischer Koordination scheint es momentan so, als ob die Diskussion von den USA dominiert werden wird, was eigentlich erstaunlich ist, da die EU bislang aufgrund der grösseren Anstrengungen und treibenden politischen Kräfte eine gewisse Meinungsführung inne hatte. Dennoch muss bedacht werden, dass die US-Initiative noch keine Gewährleistung für die notwendige Finanzierung gesichert hat, und dass die Dimension der Herausforderung eine globale Anstrengung erfordert. Es ist auch wichtig zu bedenken, dass eine Kombination des *bottom-up* und *top-down* Ansatzes viele Vorteile mit sich bringt, so die Kombination von massiver technologischer Kraft und organisatorischer Kapazität mit der Kreativität und innovativen Kapazität kleiner, dezentralisierter Einheiten. Letztendlich ist es nicht wichtig, wo eine wissenschaftliche Anstrengung durchgeführt wird, doch sollte ein sensibles Thema wie der Schutz der Umwelt und der öffentlichen Gesundheit hoch auf unserer Prioritätenliste stehen, nicht zuletzt zum Aufbau von Kapazitäten und Kompetenz. Überdies müssen wir eine Entkopplung zwischen den Anstrengungen auf beiden Seiten des Atlantiks aufgrund der Interessen der globalen Industrie vermeiden. Wenn wir uns von einer global grösstenteils standardisierten Ebene der Sicherheitsbewertung mit geringem technischem Aufwand auf eine Hightech-Ebene begeben wollen, dürfen wir nicht auf nationalisierte Standards zurückfallen. Wir müssen zugeben,

dass manche der europäischen legislativen Anstrengungen, wie die 7. Novelle der Kosmetikdirektive und die REACH Gesetzgebung, uns auf getrennte Wege führen, und es wäre von Nachteil, wenn Europa nun die Möglichkeit verpasst, in die aufkommende technologische Revolution mit einzusteigen (Leist et al., in diesem Heft).

### **Hypothese 5: Die unterschiedlichen wissenschaftlichen Ansätze müssen in Kombination angewendet werden, um Tierversuche herunterzufahren**

Kein einzelner Ansatz wird alleine einen gegebenen regulatorischen Tierversuchsansatz bezwingen; sogar für die etablierten Ersatzmethoden lernen wir immer mehr über Nicht-Eignung für bestimmten Substanzen oder über Probleme von Sensitivität oder Spezifität, welche die Kombination mit anderen Methoden erfordern. Abbildung 4 zeigt eine gewisse Hierarchie von Ansätzen von einfach (oben) zu komplexer (unten), d.h. es ist am einfachsten, aufgrund der Struktur zu einer Einschätzung zu kommen, während es mit multiplen Endpunkten mit kinetischer Modellierung am schwersten ist. Die Hierarchie kommt daher, dass es nicht sinnvoll erscheint, komplizierte und teure Methoden anzuwenden, wenn einfachere Ansätze die Aufgabe erfüllen können. Wie angegeben, muss dies für jede einzelne relevante gesundheitliche oder ökologische Wirkung durchgeführt werden. Der Beitrag, den die verschiedenen Ansätze leisten können, um tatsächlich Tierversuche zu reduzieren, wird für jeden Endpunkt unterschiedlich sein und mit der Weiterentwicklung der Technologien und ihrer Integration variieren. Daher ist absichtlich kein relativer Beitrag für jeden einzelnen Ansatz angegeben; die Treppen haben alle die gleiche Höhe. Die Abbildung zeigt zuerst Technologien, die in unterschiedlichem Umfang in der Lage sind, positive (toxisch) und negative (nicht-toxisch) Einschätzungen abzugeben. Dies wird angezeigt durch ihre Platzierung entweder auf der linken (positive Einschätzung) oder rechten (negative Einschätzung) Seite der Treppe. In Anbetracht der Tatsache, dass der Grossteil

der Substanzen keine toxische Wirkung hat (Hartung, 2008a), sind die negativen Einschätzungen tatsächlich wichtiger, um die Tierzahlen zu verringern.

Die verschiedenen einzelnen Stufen sind:

1. Strukturelle Abwägungen, d.h. manche Substanzen können schon als chemisch inert oder zu gross für die Aufnahme (Bioverfügbarkeit) eingestuft werden. Dies könnte mit Systemen komplimentiert werden, die testen, ob die Substanz verstoffwechselt oder degradiert, z.B. von der Magensäure, werden kann. Wenn es für beides keine Hinweise gibt, sollte auf Testung verzichtet werden.
2. Keine Belastung, kein Risiko. Dies ist ein heisses Thema zwischen verschiedenen Produkt- und geographischen Bereichen, zwischen der Industrie und den Regulatoren: Sollte unsere Sicherheitsabschätzung von Gefahr oder Risiko bestimmt werden? Müssen wir uns wirklich um mögliche gefährliche Eigenschaften von Substanzen kümmern, wenn die Belastung vernachlässigbar ist? Es gibt für beide Seiten Argumente: Wir können viele Tests, viel Geld und viel Zeit sparen, indem wir nur das testen, dem Menschen und die Umwelt tatsächlich ausgesetzt werden. Doch können sich die Anwendungsgebiete und damit die Belastungsmuster ändern, wenn die Substanz erst auf dem Markt ist, und wir müssen auch unbeabsichtigte Exposition einberechnen, z.B. an Arbeitsplätzen. Trotzdem, wenn es um die Prioritätensetzung geht, gibt es gute Gründe warum zum Beispiel REACH fordert, dass auf Testung verzichtet wird, wenn die Exposition vernachlässigbar ist. Der Ansatz wurde formalisiert und unter dem Namen „*thresholds of toxicological concern*“ (TTC) – Grenzwerte toxikologischen Bedenkens“ (Kroes et al., 2000; Kroes et al., 2007) weiterentwickelt. Dies schlägt nicht nur empirische Grenzen vor, unter denen keine toxikologische Aktivität begründet vermutet werden kann, schlägt aber auch vor, dass diese Grenzwerte sich für verschiedene Chemikalienklassen unterscheiden können, da vor allem Unterschiede in der Chemie Unterschiede in der Bioverfügbarkeit bedeuten können.

3. Die Idee könnte noch weiter getrieben werden, indem interne TTCs, d.h. Grenzwerte toxikologischen Bedenkens auf Plasmaspiegel bezogen, durch die Messung tatsächlicher Bioverfügbarkeit bestimmt werden. Zunehmend wird anerkannt, wie wichtig toxikokinetische Information für Chemikalien wäre, um Risikoabschätzungen durchzuführen und vor allem, um *in vitro* und *in vivo* Daten zu integrieren. Micro-Dosierungsansätze erlauben es, solche Information mit minimalen Tierzahlen und minimaler Belastung zu erhalten und können sogar am Menschen durchgeführt werden. Es wäre logischer, Plasmaspiegel von Substanzen zu definieren, die zu niedrig sind um zu schaden, statt externe Expositionsgrenzen festzulegen. Soweit wir wissen, wurde bisher keine solche Analyse durchgeführt, wahrscheinlich auch aufgrund der limitierten verfügbaren Daten für die Kinetik von allgemeinen Chemikalien, mit wenigen Ausnahmen, z.B. Dioxine, Phthalate und Schwermetalle wie Blei in der Arbeitsmedizin, wo das Konzept der „internen Dosierung“ bereits vorgeschlagen worden ist.
4. Klassische *in vitro* und *in silico* Alternativen sind im Gegensatz zu früheren Ansätzen am besten geeignet, Gefährdungen (positive Einschätzungen) zu identifizieren. Durch ihre typischen Limitationen (Metabolismus, Beitrag von Immunreaktionen wie Entzündung) ist es oft schwierig, einen Wirkmechanismus, der nicht in diesem reduzierten Modell abgebildet ist, auszuschliessen. Doch wieviel Unsicherheit tatsächlich verbleibt (Hartung, 2007b) und wieviel Unsicherheit im Tierversuch enthalten ist (Hartung, 2008), mit möglichem irreführendem Metabolismus oder Abwehrmechanismen, steht zur Diskussion, doch die prinzipiellen Bedenken bleiben. Wir müssen akzeptieren, dass die Reduktion von Organismus zu Zellkultur mit all ihren Artefakten, oder sogar zu einem Algorithmus, immer ein unvollständiges Bild ergibt. Ein zentrales Problem für die regulatorische Anwendung wird sein, dass nur Gefährdungen identifiziert werden können, aber dass eine Extrapolation zur entsprechenden Dosierung typischerweise unmöglich ist (mit der möglichen

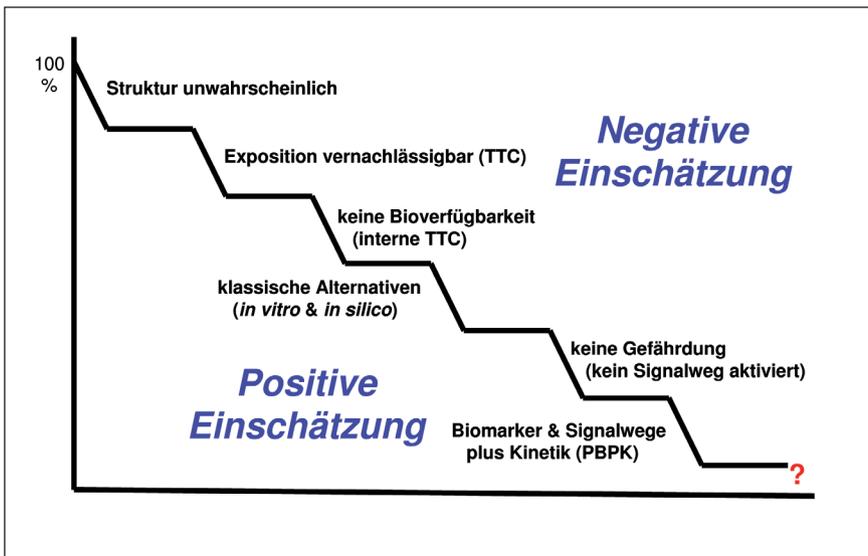


Fig. 4: Anwendung verschiedener Ansätze um Tierversuche herunterzufahren

Ausnahme der akuten Toxizität). Daher sind sie besser für die Klassifizierung und Kennzeichnung geeignet, werden aber oft den Tierversuch für quantitative Einschätzungen erfordern. Der Weg in die Zukunft ist die Kombination mit biokinetischem Modelling (siehe 6).

5. Wenn wir es schaffen, die Matrix der relevanten Signalwege der Toxizität für einen gegebenen Endpunkt zu identifizieren, könnte es möglich sein, eine Testbatterie zusammenzustellen, welche diese widerspiegelt. Zum Beispiel wurde vorgeschlagen, dass Embryotoxizität durch Interferenz mit 17 verschiedenen Signalwegen zustande kommt (NRC, 2000). Es ist verlockend, eine Testbatterie mit diesen zusammenzustellen und mit prototypischen Substanzen die Kompetenz dieser Teststrategie zu demonstrieren („mechanistische Validierung“), wie wir es bereits früher schon für die Neuroentwicklungstoxikologie vorgeschlagen haben (Coecke et al., 2007), wobei wir hier jedoch von unterschiedlichen zellulären Prozessen und nicht von biochemischen Signalwegen im engeren Sinn sprechen. Wir sollten uns bewusst sein, dass ein solcher Ansatz sich wieder primär qualifizieren würde, um eine Gefährdung auszuschließen; zu einer quantitativen Risikoabschätzung käme man mit einem solchen Ansatz nicht.

6. Die positive Erkennung von Toxinen durch aktivierte Signalwege, von Gefährdung durch klassische Alternativen oder andere Biomarker, wird oft eine Übersetzung in die relevante Dosierung erfordern. Obwohl die Unsicherheit solcher Übersetzungen von Dosen auf den Menschen einen riesigen Fehler beinhaltet (Hartung, 2008), basiert die traditionelle Risikoabschätzung auf solcher Information, z.B. NOAEL (*no observed adverse effect level* – Grenzwert, bei dem keine ungünstige Wirkung beobachtet wird). Der einzige vielversprechende tierfreie Ansatz ist das reverse biokinetische Modelling, d.h. statt das Schicksal einer Substanz und die sich ergebende Gewebekonzentration zu berechnen, wird berechnet, welche Dosierung eine Gewebekonzentration hervorrufen würde, die der Konzentration, die *in vitro* eine Wirkung hervorruft, entspricht. Es gibt vielversprechende erste Ansätze in diese Richtung (Corvi et al., 2006; Bouvier d’Yvoire et al., 2007), aber sie sind von allgemeiner Anwendbarkeit noch weit entfernt. Sie stellen jedoch eine ausschlaggebende Chance dar, die Anwendbarkeit von *in vitro*-Methoden zu verbreitern.

Absichtlich reicht die Treppe in Abbildung 4 nicht bis auf den Boden, und das Fragezeichen weist darauf hin, dass nicht

klar ist, wie viele Tierversuche noch übrig bleiben werden. Dies wird vom wissenschaftlichen Fortschritt bei jeder Komponente für jeden Endpunkt abhängen. Dies schließt auch Einschränkungen bei der Anwendbarkeitsdomäne für jeden Ansatz mit ein, d.h. wenn bestimmte Ansätze für einen Teil des chemischen Universums nicht genutzt werden können, wird es vielleicht schwierig werden, eine Alternative anzubieten. Es hängt auch von unserem Glauben an die aktuellen Ansätze ab und von unserer Einschätzung, was eine adäquate Ersatzmethode darstellt. Die Wichtigkeit des EBT-Ansatzes, um die Grenzen der aktuellen Ansätze aufzuweisen, kann kaum überschätzt werden. Es spielt hier auch eine gesellschaftliche Komponente eine Rolle, nämlich unsere Einstellung zum Risiko und wieviel davon wir bereit sind zu akzeptieren. Das bekannte Zitat von Erich Kästner „Leben ist immer lebensgefährlich“ bringt zum Ausdruck, dass es keine Nullrisiko-Option gibt. Die Illusion einer perfekten Risikobestimmung könnte genauso gefährlich sein, da sie verhindern würde, dass wir Wirkungen von Substanzen weiter verfolgen, nachdem die Risikobewertung abgeschlossen ist.

### Literatur

Literaturverzeichnis siehe „References“ Seite 96

### Danksagung

Die ständige Diskussion mit unseren Kollegen, speziell den Mitarbeitern von ECVAM, die einige Ideen in diesem Artikel geformt hat, wird dankbar anerkannt.

### Korrespondenzadresse

Prof. Dr. Dr. Thomas Hartung  
EU Joint Research Centre  
Institute for Health and Consumer Protection  
European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM)  
21020 Ispra  
Italien  
E-mail: thomas.hartung@ec.europa.eu