

Thomas Hartung, ECVAM

# Vor- und Nachdenkliches ... zur Zellkultur

Zellkultur-Technologien stellen die Grundlage der meisten Alternativmethoden dar. Sie sind über die letzten Jahrzehnte gereift, aber schwerwiegende Limitationen bleiben, welche, um es positiv auszudrücken, noch Raum für Verbesserungen lassen. Dieser zweite Artikel der Reihe "Vor- und Nachdenkliches" soll das Bewusstsein über die Limitationen steigern, die eine Auswirkung auf den prädiktiven Wert der auf Zellkultur basierten Testsysteme haben.

Die zentrale Frage ist, wie gut die Zelle in Kultur die Zelle im Organismus widerspiegelt, vor allem in Bezug auf ihren Differenzierungsgrad und ihr Reaktionsmuster in Isolation in einer künstlichen Umgebung. Differenzierung kann als zelluläre Äquivalent des Phänotyps auf der Stufe des Organismus betrachtet werden: Welche Gene werden zu einem bestimmten Zeitpunkt exprimiert und welche Funktion erlauben diese? Diese kritische Bestandsaufnahme der Probleme moderner Zellkultur-Techniken behauptet nicht, dass *In-vitro*-Systeme nicht von Nutzen sind, sondern zeigt auf, warum der prädiktive Wert dieser Modelle in jedem einzelnen Fall kritisch geprüft werden muss. Dies unterstreicht die Notwendigkeit der Validierung solcher Systeme, entweder in Form einer formalen Validierung für standardisierte Tests oder als Prozess der Qualitätskontrolle für *In-vitro*-Modelle in der Forschung und in zell-basierten Screening-Ansätzen.

## Problem 1: Von Agonie zu Atrophie – unsere Zellen langweilen sich zu Tode

Es könnte gut sein, dass wir unseren Zellen in Kultur das Leben zu einfach machen. Ein Organismus weist eine hohe Effizienz auf. Zellmasse, die nicht benötigt wird, wird abgebaut. Jeder, der aufgehört

hat Sport zu treiben und anschließend Muskelmasse verloren hat, kann das nachvollziehen. Atrophie ist die Reduzierung der Masse wenn keine kontinuierliche Forderung der Funktion wahrgenommen wird. Es gibt einige Beweise aus vielen Toxizitätstests, dass in der Zellkultur etwas Ähnliches passiert: zum Beispiel beobachtet man häufig, dass die Zellvitalität am Anfang der Konzentrations-Wirkungskurve ansteigt, d.h. ein bisschen Toxin hält die Zellzahl höher als in der unbehandelten Kontrolle. Normalerweise wird das nur als ein Problem für die Kurvenanpassung wahrgenommen, z.B. um den  $IC_{50}$  Wert zu berechnen. Es könnte aber auch tatsächlich die Herausforderung an das System widerspiegeln, entweder zu verstoffwechseln oder sich zu verteidigen, um die Agonie zu beenden, was dem zellulären Leben endlich „einen Sinn“ gibt. Was für die Vitalität stimmt, könnte gut auch auf spezifische Funktionen zutreffen. Warum sollte eine Zelle Funktionen aufrechterhalten, die gar nicht gefordert werden? Das könnte ein viel stärkerer Antrieb zur Dedifferenzierung sein als allgemein angenommen. Wir wollen, dass unsere Zellen in einem Experiment optimal reagieren, aber wir lassen sie vorher nicht trainieren. Warum sollten sie zum Beispiel die Fähigkeit, Fremdstoffe zu verstoffwechseln, aufrechterhalten, wenn sie keinen exponiert werden? Abbildung 1 stellt dar, dass

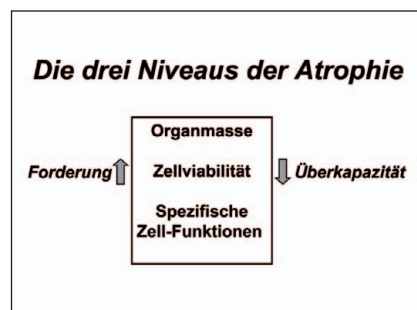


Abb. 1: Die drei Niveaus der Atrophie

eine generelle Regulation von Fähigkeiten durch Forderung von Funktion auf drei Integrationsstufen stattfinden könnte, was die Zellkultur sowohl bezüglich der Überlebensfähigkeit als auch der Funktionalität stark beeinflussen würde.

## Problem 2: Der zelluläre Babyboom – wenn Zellen zum Wachstum und zur Teilung angetrieben werden, verlieren sie Kompetenzen

Kürzere Verdopplungszeiten bedeuten weniger Zeit und Arbeit vor dem nächsten Experiment. Durch den Zusatz von Wachstumsfaktoren oder, noch einfacher, dem Wundercocktail der Zellkultur, fötalem Kälberserum, forcieren wir die Zellen zu proliferieren (Abb. 2). Humane Endothelzellen sollen *in vivo* eine Halbwertszeit von 20 Jahren haben – in Kultur ist es nur ein Tag! Wie können wir erwarten, dass die Zelle sich die Zeit und Energie nimmt, ihre spezifischen Funktionen auszubilden, wenn die Signale sie zur Teilung, nicht zur Funktion, drängen? Durch diese Behandlung halten wir sie auf der Baby-Stufe – sie können wachsen, brauchen viel Nahrung, aber können nicht wirklich viel. Tatsächlich fehlt diesen verhätschelten Zellen oft nicht nur die reife Funktion, sie exprimieren oft sogar Gene, die typisch für Embryogenese sind.

## Problem 3: Schocktherapie verhindert Differenzierung – nicht-homeostatische Kulturbedingungen

Der Organismus hält eine engmaschig kontrollierte, stabile Umgebung für die meisten Zellen aufrecht. Die Zusammensetzung von Blut und extrazellulären Flüssigkeiten wird genau reguliert. Im Gegen-



Abb. 2: Antrieb zur Zelldifferenzierung

satz dazu erleben Zellkulturen dramatische Veränderungen ihrer Bedingungen: Wenn das Medium ausgetauscht werden soll, sind die Nährstoffe verbraucht und Abfallstoffe haben sich angesammelt. Von einem Augenblick zum nächsten sind die Zellen plötzlich von frischem Medium umgeben. Häufig geht dies auch mit Veränderungen der Temperatur und des pH-Werts einher. Phenolrot, ein häufig verwendeter Zusatzstoff, zeigt diese pH-Veränderung deutlich an: altes, gelbes Medium wird mit frischem, rotem ersetzt, was anzeigt, dass die Pufferkapazität des alten Mediums schon längst aufgebraucht war. In menschlichem Blut variiert der pH-Wert nur zwischen 7.35 und 7.45 – Werte, die nicht in diesem Rahmen liegen führen zu ernsthaften, sogar lebensbedrohlichen Erkrankungen. Unvermeidlich selektiert diese schockierende Behandlung der Zellen solche, die anpassungsfähig sind, nicht spezialisierte Zellen, die aufwändige Funktionen aufrechterhalten (Abb. 2).

#### Problem 4: Atemlose Zellen – der Mangel an Sauerstoff

Typische Testsysteme bieten nur soviel Sauerstoff an, wie im Zellkulturmedium gelöst ist. Bei typischen Zelldichten ist dieser schon nach wenigen Stunden verbraucht. Eine weitere Zufuhr von Sauerstoff durch Äquilibration mit der Luft im Brutschrank ist gering wegen der geringen Oberfläche, der hohen Wassersäule des Kulturmediums, welche die Diffusion einschränkt, und dem Fehlen an Luftbewegung. Das Ergebnis ist anaerober Stoffwechsel mit Ansammlung von Lak-

tat, was hauptsächlich die Ansäuerung des Mediums bewirkt. Von Zellen, die quasi am Ersticken sind, kann man keine normalen, physiologischen Reaktionen erwarten. Nur wenige Zellarten verbrennen Glukose normalerweise anaerob, was bedeutet, dass dies ein völlig anormaler Zustand ist. Die begrenzte Sauerstoffzufuhr ist auch ein Grund für das Missverhältnis von Zellen zu Kulturmedium. Zellen in Kultur erreichen maximal 1% der Zelldichte in Organen, weil der gelöste Sauerstoff und die Nährstoffe begrenzend sind. Der Bedarf an Nährstoffen wird auch durch den ineffizienten, anaerobischen Verbrauch dramatisch erhöht – circa 20 mal weniger ATP als bei aerober Verbrennung werden aus Glukose gewonnen, wenn sie anaerob verstoffwechselt wird. Durch die relativ grosse Menge Medium werden Zell-Zell Kontakte begrenzt und freigesetzte Moleküle, z.B. Signalbotenstoffe, werden stark verdünnt. Ein weiteres Problem, das oft übersehen wird, ist daran gekoppelt: nicht alle Wirkungen von Molekülen hängen allein von ihrer Konzentration ab; manche hän-

gen auch von absoluten Mengen relativ zur Zellzahl ab (vor allem wenn Zellen die Substanz anreichern). Daher überladen grosse Substanzmengen, die wegen des grossen Mediumvolumens zugesetzt werden die Zellen und täuschen bei der Interpretation der Konzentrations-Wirkungskurve.

#### Problem 5: Zelllinien werden aus Krebsgewebe gewonnen – wir arbeiten mit Zombies

Zelllinien werden normalerweise aus krebsartig verändertem Gewebe isoliert oder aus Primärzellen, die eine ähnliche Form der Transformation in Kultur durchgemacht haben (Abb. 3). Es wurde gezeigt, dass Tumorzellen zehntausende Mutationen im Vergleich zum Ursprungsgewebe aufweisen (siehe die Übersichtsarbeit von Ponten, 2001; Frank and Nowak, 2004). Sie haben eine drastisch reduzierte Expression von organotypischer Funktion und ziehen Zellwachstum und Zellteilung anderen Zellfunktionen vor. Sie weisen oft chromosomale Aberrationen und Verluste auf. Karyotypisierung von Zelllinien, d.h. die Beurteilung der chromosomalen Zusammensetzung der Zelle, führt immer wieder zu grossen Überraschungen. Wenige Labore führen diese Prozedur regelmäßig und über viele Zellpassagen hinweg durch. Wie können wir erwarten, dass die Zellen dem normalen Gewebe ähneln, wenn schon ihr Ursprungsgewebe weit vom Normalen abweicht und Transformation und Selektion vorausgegangen sind? Die Idee, dass ein Tumor als Organersatz

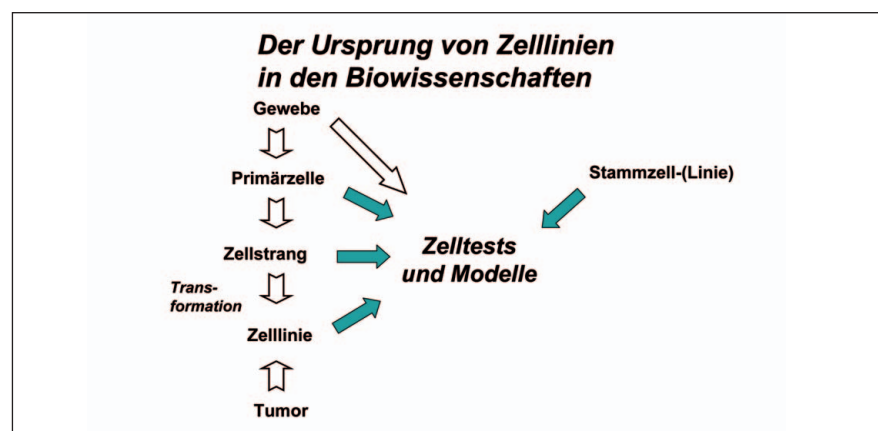


Abb. 3: Der Ursprung von Zelllinien in den Biowissenschaften



transplantiert werden könnte, ist absurd. Trotzdem verwenden wir Tumorzellen als Ersatz für Primärzellen in unseren Experimenten, häufig ohne diesen Ansatz in Frage zu stellen.

### **Problem 6: Zell-Authentizität und Kreuzkontamination – Zellen in Verkleidung**

Dieses Problem haben wir bereits früher im Rahmen der Entwicklung einer *Good Cell Culture Practice* angesprochen (Hartung et al., 2002; Coecke et al., 2005; Stacey and Hartung, 2007). Trotzdem bleibt es eine erhebliche Sorge und, im Sinne von Aldous Huxley in seinem berühmten Buch, *Schöne neue Welt*, „Zweiundsechzigtausend vierhundert Wiederholungen ergeben eine Wahrheit“. Daher werde ich diesen Punkt, der auch von anderen thematisiert wird (neuere Arbeiten von Markovic and Markovic, 1998; MacLeod et al., 1999; Buehring et al., 2004; Nardone, 2007) immer wieder wiederholen. Es gibt zwingende Beweise, dass 15 bis 20% der Zellen, die in Experimenten verwendet werden, nicht das sind, was sie sein sollen. Ein Hauptgrund dafür ist das HeLa-Wunder: In 1952 wurde diese Zelllinie aus einem Tumor gewonnen. Aus ihr wurden seitdem buchstäblich Tonnen von Zellen angezogen. Ich nenne es ein Wunder, weil es noch heute schwierig und selten ist, menschliche Tumorzelllinien zu gewinnen, und weil die Wachstumsgeschwindigkeit dieser Zellen von keiner anderen Zelle erreicht wird. Daher führt die Kreuzkontamination einer Zelllinie mit einer einzigen HeLa-Zelle nach einiger Zeit zum Überwachsen der Ursprungslinie mit HeLa-Zellen, was sehr häufig unbemerkt bleibt. Buehring et al. (2004) fanden 220 wissenschaftliche Publikationen mit Ergebnissen von Experimenten mit Zelllinien, von denen man heute weiss, dass es alles lediglich HeLa-Zellen sind. In einer Erhebung, die mehr als 400 Forscher einschloss, stellte sich heraus, dass 9% ohne es zu wissen mit HeLa-Kontaminanten arbeiteten. MacLeod et al. (1999) analysierten Zellen, die bei Zellkulturbanken eingereicht wurden – ein Umstand, bei dem sich Forscher der Authentizität ihrer Zellen am sichersten sein sollten – und fanden, dass

18% kreuzkontaminiert waren, häufig sogar mit Zellen anderer Spezies. Diese Zelllinien waren schon für hunderte Publikationen genutzt worden und werden heute wahrscheinlich immer noch benutzt. Et was muss getan werden, wie erst kürzlich von Nardone (2007) gefordert.

### **Problem 7: DMSO & Co – was Zusätze wirklich zusetzen**

Stellen Sie sich vor, ein Arzt sagt Ihnen: „Nehmen Sie diese Tablette in einem halben Glass Dimethylsulfoxid (DMSO) oder in einem Bierglas voll Whisky ein.“ (Ich ziehe Letzteres vor.) So bieten wir unseren Zellen die meisten Stoffe an: 0.1% DMSO oder Ethanol. Das Problem ist klar: Wir arbeiten häufig mit Substanzen, die nicht wasserlöslich sind, und wir können die Aufnahme und den Transport der Substanz im Organismus nicht nachstellen. Die Menge an Lösungsmittel, die wir verwenden müssen, ist meist selbst schon an der Grenze zur Toxizität, und mögliche Cocktail-Wirkungen mit der zugesetzten Substanz können nicht kontrolliert werden.

Eine weitere Sorge in Hinsicht auf Zusätze ist die prophylaktische Verwendung von Antibiotika in Zellkultur und deren Wirkungen auf die Zellen. Der Einfluss von Antibiotika auf Zellmorphologie, Zelldegeneration, Zelltod und zelluläre Funktionen wurde von Kuhlmann (1993 and 1995) zusammengefasst. Wir vergessen häufig, dass diese Substanzen, welche in hohen Konzentrationen zugesetzt werden (bis zu 100 µg/ml) und die z.B. mit Proteinbiosynthese, auch von Säugerzellen, interferieren, unsere Testsysteme beeinflussen.

Zuletzt, aber nicht weniger wichtig, der Zusatz von Serum, typischerweise 10% und von einer anderen Spezies: ein komplexes, biologisches Produkt, das schwer zu standardisieren ist und nicht einmal in relevanten Konzentrationen zugesetzt wird. Jeder Pharmakologe weiss, dass viele Moleküle an Serumproteine binden und dass nur der freie Anteil dieses Äquilibrium auf seine zelluläre Zielstruktur wirken kann. Aber wie interpretieren wir diese 10% Bindekapazität? Erstaunlicherweise werden höhere Serumkonzentrationen von den meisten Zellen nicht gut vertragen,

und humanes Serum, auch nach Komplementinaktivierung, scheint auf menschliche Zellen toxisch zu wirken. Ich kenne bisher keine ausreichende Erklärung für dieses Phänomen.

### **Problem 8: Mangel an aktivierendem Metabolismus – Wir übersehen die toxischen Stoffe, die aktiviert werden müssen**

Ja, wir wissen es. Wir haben schon tausendmal gehört, dass es den Nutzen von *In-vitro*-Systemen als Ersatz für Tierversuche in Frage stellt. Einige Gedanken dazu:

- Technische Lösungen um die metabolische Kompetenz zu steigern (virale Transfektion, stabil transfizierte Zelllinien, Erhaltung von metabolischer Kapazität von Primärzellen, Zellen von Stammzellen, usw.) nehmen (langsam) zu.

- Der Beitrag von Metabolismus zur Toxizität von allgemeinen Chemikalien ist nicht wirklich bekannt; sehr wahrscheinlich wird er überschätzt, da Medikamente in der wissenschaftlichen Literatur dominieren und da Berichte über toxische Substanzen und komplexe Mechanismen bevorzugt publiziert werden.

- Häufig ist die biologische Wirkung eines Metabolits stärker als die der Ausgangssubstanz; sie stellt aber nicht eine komplett neue Wirkqualität dar. Daher kann die Gefahr auch schon bei der Ausgangssubstanz entdeckt werden, obschon bei irreführend hohen Konzentrationen.

- Der Hauptmechanismus der Aktivierung ist das P450-System, d.h. Oxidation. Ich kenne bislang keine Studien, die die spontane Oxidation in unseren Zellkulturgefässen untersucht, bei der auch einige der Metabolite entstehen könnten.

- Spezies-Unterschiede beim Metabolismus sind wohlbekannt; in den meisten Fällen ist Metabolismus protektiv (darum ist es ein evolutionärer Vorteil). Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass wir Gefahrstoffe übersehen, wenn wir Tiere verwenden, die den aktivierenden Metabolismus von Menschen nicht aufweisen.

Trotzdem ist Metabolismus eines der Schlüsselprobleme an dem bei der Entwicklung von Alternativmethoden gearbeitet werden muss (Coecke et al., 2006).

Doch sollten wir auf der Basis von Prävalenzen eine kleine Überschlagsrechnung des Beitrags von Metabolismus anstellen (Hoffmann and Hartung, 2005): Die meisten Chemikalien sind nicht toxisch. Der Anteil von toxischen Chemikalien liegt zwischen 2 (Reproduktionstoxizität) und 20% (Augenirritation). 10% Prävalenz toxischer Stoffe sollte daher eine gute Schätzung für eine Überschlagsrechnung sein, d.h. 100 von 1000 Substanzen müssen identifiziert werden. Beispiele von Molekülen, die durch Metabolismus toxischer werden, sind selten; Beispiele von völlig ungiftigen Substanzen, die nach der Verstoffwechslung eine neue, toxische Qualität aufweisen, sind noch seltener, zusammen sicherlich weniger als 10% der Fälle. Daher würde ein Test, der keine Metabolisierung beinhaltet, nur 90% der 10% toxischen Substanzen finden. In anderen Worten würden maximal 10 von 1000 Molekülen nicht gefunden, d.h. <1%, und 99% würden richtig eingestuft. Ob dies ein akzeptables Risiko ist und wie dieses noch weiter reduziert werden kann, z. B. durch Struktur/Funktionsanalysen, geht über den Rahmen dieses Artikels hinaus. Sicher stellt jede toxische Substanz, die übersehen wird, eine mögliche Katastrophe dar. Doch ob irgendein toxikologisches Testschema Sicherheiten hat, die höher als 99% liegen, ist diskussionswürdig.

### **Problem 9: Mangel an Abwehrmechanismen – sind unsere Zellen zu sensibel?**

Babyzellen, vielfältig mutiert durch den Verlust vieler Gene und nicht trainiert, um einem toxischen Angriff standzuhalten (siehe oben) – das ist ein Szenario von Verletzbarkeit. Tatsächlich beobachten wir häufig, dass Zelllinien sensibler sind als Primärzellen. Wir können nun einen von zwei Standpunkten einnehmen, d.h. dies als vorsichtigen Ansatz schätzen oder ihn als Überschätzung von Toxizität verdammen. Ich ziehe ganz klar den ersten Standpunkt vor, da die häufigsten Gründe, diese Tests durchzuführen, die Abschätzung der Gefährdung, die Klassifizierung und die Kennzeichnung sind. Wenn sich die untersuchte Zelle erfolgreich im Organismus vor diesem Gift schützen kann, aber ihre Nachkommen in der Kultur dies nicht kön-

nen, könnte dies darauf hinweisen, dass die Elternzelle durch chronische Exposition überwältigt werden könnte oder dass es andere Gewebe und Umstände gibt, bei denen die Schutzmechanismen nicht standhalten würden. Besser dies zu wissen und zur Vorsicht zu raten.

### **Problem 10: Alle Zellen sind gleich? – Die Standardisierung von Kulturbedingungen**

Warum kultivieren wir Mauszellen bei 37°C? Körpertemperaturen von Nagern sind einige Grad wärmer. Warum forcieren wir einen pH von 7, wenn in entzündetem Gewebe der pH bis 4 sinken kann (die genaue pH Kontrolle, die oben angesprochen wurde, bezieht sich nur auf Blut). Warum stellen wir die osmotische Stärke von menschlichem Blut in unserem Zellkulturmedium ein? Nager haben eine höhere Salzkonzentration. Es ist alles eine Frage der Bequemlichkeit und von dem, was gang und gäbe ist. Doch diese Kriterien sichern nicht die optimale, physiologische Antwort oder das prädiktive Testergebnis.

### **Problem 11: Fehlen von Qualitätssicherung in der Zellkultur – „Leider hatten wir nicht genug Zeit für ein qualitäts- kontrolliertes Experiment“?!**

Wir sind bereits im Zusammenhang mit der Entwicklung der Anleitung zu *Good Cell Culture Practice* detailliert auf dieses Thema eingegangen (Hartung et al., 2003; Coecke et al., 2005). In gewissen Umfang geben alle Punkte, die bisher besprochen wurden, weitere Begründung für die Notwendigkeit von Qualitätssicherung. In Systemen, die hochartifizial und reduktionistisch sind, muss nicht nur die Qualität der Prozeduren aber auch der prädiktive Wert der Ergebnisse qualitätsgesichert werden. Dies ist, zumindest in der Grundlagenforschung, nicht üblich. Wenn es „scheint“, dass Zellmodelle unser Verständnis widerspiegeln, sind wir bereit, neue Ergebnisse zu interpretieren. Und wenn die Ergebnisse sich nicht mit unseren Erwartungen decken, haben wir kein Problem damit, unsere Ausgangshypothese zu ändern und

schnell zu publizieren... Das ist definitiv keine Lösung für F&E in der Industrie oder regulatorisches Testen, bei denen ökonomische Entscheidungen und Sicherheitsentscheidungen getroffen werden müssen. Validierung von Testsystemen – in welchem Umfang auch immer – sichert die Qualität der Entscheidungen ab. In bestimmtem Umfang sollte auch die Grundlagenforschung daraus lernen. Es könnte besser sein, am Anfang mehr in die Optimierung und Evaluierung von Testsystemen zu investieren, als schnell Ergebnisse zu generieren, die möglicherweise nur Artefakte sind.

### **Problem 12: Das Fehlen von Standard- Protokollen – lass viele Blumen blühen?**

Wir leiden nicht unter einem Mangel an Protokollen – es gibt davon viel zu viele – aber sie sind viel zu kurz und heterogen. Was wir normalerweise in einer wissenschaftlichen Zeitschrift berichten, ist nicht ausreichend, damit ein anderes Labor das Zellkultur-Experiment nachstellen kann. Beschränkungen von Druckplatz und Schreibaufwand sind verständlich, sowohl seitens des Herausgebers als auch des Autors, aber ihre wissenschaftlichen Kunden brauchen etwas anderes. Wissenschaftliches Publizieren hat die Möglichkeiten der Kommunikation im www-Zeitalter noch nicht völlig angenommen. Internet-Depots von detaillierten, sachlichen Protokollen schießen wie Pilze aus dem Boden, doch selten wird in wissenschaftlichen Publikationen darauf verwiesen. Es wäre wünschenswert, dass auf öffentlich zugängliche Standardprotokolle verwiesen würde; dann müssten nur Abweichungen von diesen Protokollen erläutert werden. Für das begrenzte Feld des regulatorischen Testens zielt ECVAM mit den INVITTOX Protokollen bei dbAlm (die ECVAM Datenbank für alternative Methoden <http://ecvam-dbalm.jrc.cec.eu.int/>) darauf hin, ein Depot von qualitätsgeprüften Protokollen bereitzustellen. Dieses Konzept verdient eine breitere Umsetzung. Es wäre wünschenswert, standardisierte Formate und Referenzstile für die verschiedenen Provider zu entwickeln, welche mit den Zeitschriften in den Biowissenschaften abgestimmt sind.



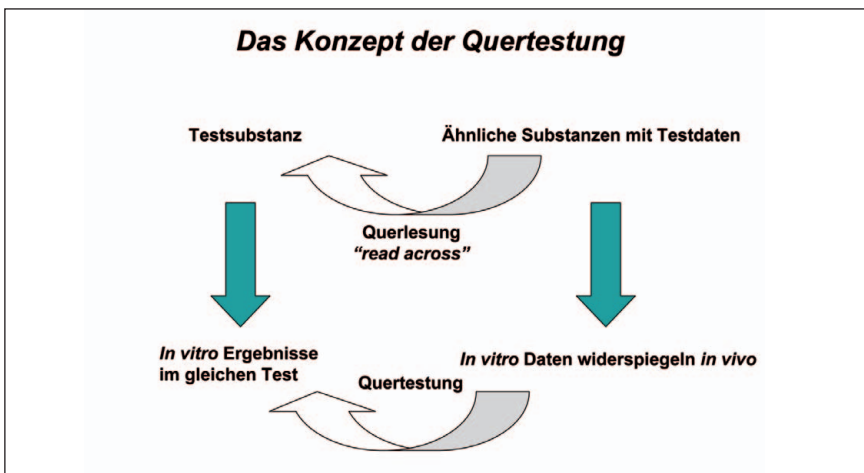


Abb. 4: Das Konzept der Quertestung

### Was ist die positive Seite?

*In vitro* Forschung ist zur dominanten Technologie in den Biowissenschaften geworden. Nobelpreise werden für *in vitro* Forschung vergeben. Firmen haben ihre Screening-Programme für neue Wirkstoffe stark nach *in vitro* hin geändert, und zunehmend werden auch regulatorische Entscheidungen auf der Basis von *in vitro* Tests getroffen. Doch haben die vielen Vorteile der Technologie einen Preis. Wir dürfen nicht ausser Acht lassen, dass diese Technologien auch Schwächen haben, sonst werden wir später enttäuscht sein. Die Massnahmen, die getroffen werden müssen, sind ähnlich wie für jede andere Art von Technologie: (1) Standardisierung, (2) Qualitätssicherung und (3) Validierung. Die Betrachtungen in diesem Artikel haben hauptsächlich (1) und (2) behandelt, dadurch dass sie die hauptsächlichsten Schwächen von *in vitro* Ansätzen veranschaulicht haben.

Zu den Vorschlägen, die in dieser Hinsicht gemacht werden müssen, gehören:

- Wir brauchen technische Entwicklungen um die Limitationen aufzuheben, z. B. durch die Schaffung von homeostatischen Kulturbedingungen, Sauerstoffzufuhr und die Kontrolle der Differenzierung.
- Spezies-spezifischen Unterschieden sollte mehr Beachtung geschenkt werden, nicht nur in Hinsicht auf Kulturbedingungen: Wir ersetzen menschliche Zellen zu bereitwillig mit Nagerzellen. Die MEIC-Studie (Ekwall, 1983) für akute Toxizität hat bereits darauf hingewiesen, dass letale Blutkonzentrationen von toxi-

schen Substanzen besser mit menschlichen Zellsystemen vorhergesagt werden können. Die kürzlich durchgeführte Validierung eines Myelotoxizitäts-Tests (CFU-GM) zeigte sehr deutlich, dass die Toxizität von verschiedenen Chemotherapeutika *in vivo* in Maus und Mensch durch die Sensibilität von Zellen *in vitro* widerspiegelt wird: Dadurch war es möglich durch die Verwendung von menschlichen und murinen Zellen um relative Sensitivität zu ermitteln, mit der LD<sub>50</sub>-Werte aus Mausversuchen in maximal tolerierte Dosen bei Menschen in klinischen Studien konvertiert werden konnten (Pessina et al., 2003). So wurden Speziesunterschiede in akuter *in vivo* Toxizität *in vitro* wiedergespiegelt.

- Wir müssen lernen, aus Stammzellen bessere (menschliche) Zellen zu züchten, nicht nur für den Bereich der Entwicklungstoxizität (Bremer and Hartung, 2004).
- Das Schicksal von Testsubstanzen in der Zellkultur muss intensiver studiert werden. Wir haben den Begriff „*in vitro* Biotinik“ geprägt, um zu beschreiben, dass eine Chemikalie, ähnlich wie bei der Verteilung und Verstoffwechslung *in vivo* auch ein Schicksal im Zellkulturgefäß erfährt, welches die aktive Konzentration, die über die Zeit auf die Zelle wirkt, bestimmt. Ich bin überzeugt, dass ein besseres Verständnis dieser Phänomene helfen wird, die Ergebnisse aus *in vitro* Studien in einer mehr prädiktiven Art zu interpretieren. Ein Bericht über einen ECVAM Workshop zu diesem Thema, der kürzlich stattgefunden hat, wird zurzeit vorbereitet.

- Ein sehr interessanter Ansatz, der Querlesung (engl. read-across) genannt wird, wird im regulatorischen Umfeld verwendet. Hier werden Ergebnisse von ausreichend ähnlichen Chemikalien verwendet, für die Daten vom Tierversuch vorliegen, um für die nicht getestete Substanz zu interpolieren. Auf ähnliche Weise sollte es möglich sein, eine Mini-Validierung eines *in vitro* Tests für eine gegebene Substanz durchzuführen, z. B. dadurch dass gezeigt wird, dass verwandte Substanzen richtig eingeschätzt werden, kann man darauf vertrauen, dass die Ergebnisse für die nicht-getestete Substanz verlässlich sind. Ich würde diesen Ansatz Quertestung (engl. test-across) (Abb. 4) nennen; er stellt einen klaren Vorteil gegenüber blossen Strukturbeziehungen dar, da zusätzlich tatsächlich in einem lebenden System getestet wird. Dies könnte gleichzeitig eine Lösung für Fälle darstellen, in denen keine formale Validierung für den entsprechenden Teil des chemischen Universums durchgeführt worden ist (Anwendbarkeits-Domäne) oder wo eine vollständige Validierung (noch) nicht möglich ist.

Zusammengenommen sollen diese Überlegungen dazu anregen, über die Schwächen von Zellkultursystemen nachzudenken: dies sollte zu einer intensiveren Qualitätssicherung führen, auch im Kontext einer evidenzbasierten Toxikologie (Hoffmann and Hartung 2006). Wir können vom Vorbild formaler Validierungsstudien für regulatorische Testung lernen. Auch wenn deren Standards sicherlich über das hinausgehen, was typischerweise als Qualitätskontrolle in anderen Bereichen der Biowissenschaften durchgeführt wird, stellen sie den Goldstandard dar, der wünschenswert wäre.

### Literatur

Literaturverzeichnis siehe „References“ Seite 147.

### Korrespondenz an:

Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Thomas Hartung  
IHCP-ECVAM,  
EU JOINT RESEARCH CENTRE  
Via E. Fermi 1  
21020 Ispra  
Italy  
e-mail:  
Thomas.HARTUNG@ec.europa.eu