Einsparung von Tierversuchen mit Humanhautmodellen

Symposium der Gesellschaft für Dermopharmazie
Berlin, 25.11.2004

Ganz im Zeichen von Alternativmethoden zu Tierversuchen mittels biotechnologisch hergestellter Humanhautmodelle stand ein wissenschaftliches Symposium der Gesellschaft für Dermopharmazie (GD) am 25. November 2004 in Berlin. Die Aktualität und Bedeutung des Themas zeigen tief greifende Änderungen in der Kosmetik- und Chemikalienpolitik der EU, die tierversuchsfreie Methoden zur Bewertung des Gefährdungspotenzials von Substanzen gesetzlich verankern. Die Veranstaltung unter der wissenschaftlichen Leitung von Horst Spielmann und Monika Schäfer-Korting wurde in Kooperation mit dem Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) in Berlin und der Freien Universität Berlin durchgeführt und versammelte rund 100 Vertreter aus Industrie, Wissenschaft, Behörde und Praxis mit hohem Fachwissen auf diesem Gebiet. Der Schwerpunkt des Symposiums lag auf der Frage, inwieweit das Potenzial von kutanen *in vitro* Modellen ausreicht, die *in vivo* Situation beim Menschen vorauszusagen und damit die Voraussetzung für die Einsparung oder Abschaffung von Tierversuchen zu schaffen. Über Erfahrungen im Umgang mit den bisher verfügbaren Humanhautmodellen wurde ebenso berichtet wie über neue Erkenntnisse zur Prüfung der kutanen Resorption, Irritation und Sensibilisierung. Außerdem wurden die von der EU und der OECD formulierten Anforderungen an die experimentelle Validierung tierversuchsfreier Prüfmethoden und der Stand der behördlichen Anerkennung dieser Methoden vorgestellt.

Immunkompetente Hautmodelle

Nach der Eröffnung des Symposiums durch den Leiter der GD-Fachgruppe Dermatopharmakologie, **Karl-Heinz Nietsch**, Bad Soden, informierte **Andreas Emmendörffer** von der Firma Euroderm GmbH, Leipzig, über die von ihm begleiteten Arbeiten zum Aufbau eines immunkompetenten Hautmodells. Voraussetzung für die Schaffung eines Hautmodells, das zur Prüfung der sensibilisierenden Wirkung von Substanzen und Zubereitungen eingesetzt werden soll, ist die Integration dendritischer Zellen.

Ausgehend von ersten Studien zur Integration von Monozyten in ein Modell mit dermalen Fibroblasten und Keratinozyten wurde zunächst die Entwicklung eines immunkompetenten Vollhautmodells angestrebt. Nach Emmendörffers Angaben wird dieses Vorhaben jedoch nicht weitergeführt, da ein solches Modell nicht GMP (*Good Manufacturing Practice*)-konform herstellbar sei. Stattdessen werde jetzt die Entwicklung eines immunkompetenten Epidermismodells angestrebt, bei dem die Epidermis aus Zellen der äußeren Haarfollikelscheide stammt und die integrierten dendritischen Zellen aus Monozyten des Vollbluts gewonnen werden.

Aussagen zur Prädiktivität dieses Modells sind bislang noch nicht möglich. Hierfür müssen erst noch ausreichend Testungen mit bekannten sensibilisierenden Substanzen durchgeführt werden. Offen blieb in der Diskussion auch die Frage nach der metabolischen Kapazität des Modells, die bisher ebenfalls noch nicht untersucht wurde, aber gerade bei sensibilisierenden Substanzen von großer Bedeutung ist.

Vollhautmodelle im Vergleich

Über seine Erfahrungen mit verschiedenen Vollhautmodellen berichtete **Klaus-Rudolf Schröder** von der Firma Henkel, Düsseldorf. Er verglich die kommerziell verfügbaren Hautmodelle *SkinEthic® Full Thickness* (SkinEthic® Laboratories, Nizza), EpiDerm™-FT 200 (MatTek Corporation, Ashland) und AST-2000 (CellSystems® Biotechnologie Vertrieb GmbH, St. Katharinen) sowie die dreidimensionalen Hautmodelle der Firmen Henkel und Phenion hinsichtlich Histologie, Immunhistologie und Antwort auf Tenside.

Histologisch zeigten alle Hautmodelle nach mehrtägiger Lagerung eine Vergrößerung des *Stratum corneums*. Am neunten Tag nach Auslieferung kam es bei den meisten Modellen zu einem Ablösen oder zumindest zu einer Ausbildung von Rissen zwischen Dermis und Epidermis. Lediglich die Modelle von Henkel und Phenion zeigten diese Problematik nicht. Zudem war neben anderen Immunmarkern nur in den Henkel- und Phenion-Modellen das in nativer Haut vorkommende Elastin nachweisbar.

Deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Modellen ergaben sich auch bezüglich der Zytokinausschüttung und der Genexpression nach topischer Applikation von Tensiden. Auffallend hierbei war, dass in keinem Modell der aus Humanversuchen und aus der praktischen Anwendung von Waschemulsio-

nen bekannte Unterschied in der Irritationswirkung von Natriumlaurylsulfat und Natriumlaurylethersulfat gefunden wurde. Dies stelle, wie in der Diskussion angemerkt wurde, die Eignung der derzeit verfügbaren Hautmodelle für vergleichende Irritationsprüfungen von Tensiden in Frage.

Rattenhaut permeabler als Humanhaut

Der zweite Teil des wissenschaftlichen Programms widmete sich der kutanen Resorption. **Armin O. Gamer**, BASF AG Ludwigshafen, berichtete über die Prüfung der dermalen Penetration von Pflanzenschutzmitteln an menschlicher und tierischer Haut. Bei der Ausbringung dieser Stoffe ist der Hautkontakt der bedeutendste Expositionsweg.

Die Risikobewertung von Pflanzenschutzmitteln stützt sich derzeit in erster Linie auf Daten zur akuten Toxizität und zur dermalen Penetration an Rattenhaut. Anhand eines von der BASF durchgeführten Vergleichs zur Hautpenetration von Pflanzenschutzmitteln an Ratten und an exzidierter Humanhaut verdeutlichte Gamer, dass menschliche Haut grundsätzlich weniger permeabel ist als Rattenhaut. Dem sollte bei der Risikobewertung mit Hilfe einer mathematischen Korrektur Rechnung getragen werden.

Problematisch sei auch die mangelnde Standardisierung der bislang für Penetrationsuntersuchungen an Humanhaut eingesetzten *in vitro* Methoden. So ergab eine kürzlich veröffentliche Ringstudie eine sehr hohe Variabilität sowohl innerhalb eines Labors als auch zwischen verschiedenen Laboratorien. Zurzeit wird die Frage untersucht, ob diese Variabilität durch den Einsatz künstlicher Humanhautmodelle vermindert werden kann.

Viele Wege führen durch die Haut

Unter einem anderen Blickwinkel wird die Hautpenetration im Arzneimittelbereich betrachtet. Voraussetzung für die dermale Resorption eines Arzneistoffs ist bekanntlich die Überwindung der Permeationsbarriere im *Stratum corneum*, die durch ein Wechselspiel zwischen den Korneozyten und den dazwischen liegenden Lipidbilayern zustande kommt. Wie diese Barriere überwunden und durch Arzneistoffträger beeinflusst werden kann, verdeutlichte **Ulrich F. Schäfer** von der Fachrichtung Biopharmazie und Pharmazeutische Technologie der Universität des Saarlandes, Saarbrücken.

Von den prinzipiell verfügbaren Penetrationswegen wird dem interzellulären Weg hinsichtlich seiner Beeinflussbarkeit durch Trägersysteme die größte Bedeutung beigemessen. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass die interzelluläre Permeation von Ketoprofen durch Vorbehandlung humaner Epidermis mit halbfesten Triglyceriden erhöht wird, während eine Vorbehandlung mit Vaseline oder Wollwachsalkoholsalbe die Permeation erniedrigt. Andere Untersuchungen zeigten einen Einfluss des Wassergehalts von Cremes und Salben auf die Permeation von Flufenaminsäure. Zurückgeführt werden diese Effekte auf Wechselwirkungen der Vehikel mit den Hautlipiden.

Im Vergleich zur interzellulären Route wird dem transzellulären Weg im Allgemeinen eine geringere Rolle für die Gesamtpermeation zugewiesen. Dieser Weg gewinnt jedoch durch den Einsatz von Substanzen wie Harnstoff, die eine Auflockerung der Korneozytenstruktur bewirken, zunehmend an Bedeutung. Das Gleiche gilt für den follikulären Penetrationsweg, der trotz seines relativ geringen Anteils an der Diffusionsfläche vor allem für nanopartikuläre Systeme relevant ist.

Wie sein Vorredner wies auch Schäfer auf die Notwendigkeit von standardisierten Bedingungen bei Penetrationsstudien hin. Schon kleinere Abweichungen in der Versuchsdurchführung, zum Beispiel durch Verunreinigungen der Hautoberfläche mit subkutanen Lipiden, könnten zu einer deutlichen Änderung des Penetrationsverhaltens einer Substanz führen.

Förderung von Forschungsprojekten

Auf den Einfluss von Trägersystemen auf die kutane Resorption ging auch die wissenschaftliche Tagungsleiterin **Monika Schäfer-Korting** in ihrem Vortrag ein. Als Sprecherin einer von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) geförderten Forschergruppe unter dem Namen „Innovative Arzneistoffe und Trägersysteme" stellte sie Ergebnisse zur Penetration von verschiedenen lipidbasierten Zubereitungen, wie festen Lipidnanopartikeln, vor, die mit den Glukokortikoiden Prednicarbat und Betamethasonvalerat beladen wurden. Mittels Parelektrischer Spektroskopie konnte gezeigt werden, dass sich die untersuchten Wirkstoffe verschieden stark an die Oberfläche der Partikel anlagern und dadurch ein unterschiedliches Penetrationsverhalten aufweisen.

Außerdem berichtete Schäfer-Korting über den Stand eines vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) geförderten Verbundprojekts zur Erfassung der kutanen Penetration und Permeation von Fremdstoffen mit biotechnologisch hergestellten Humanhautmodellen. Ziel dieses Projekts sei es, bei der Entwicklung und Prüfung von Industriechemikalien, Pflanzenschutzmitteln und Arzneimitteln die Zahl der Tierversuche erheblich zu reduzieren oder gar vollständig zu ersetzen.

Neben der Freien Universität Berlin sind weitere universitäre Einrichtungen und Industriepartner an dem Projekt beteiligt. Erste unter Einsatz der Hautmodelle erzielte Permeationsdaten zeigten eine bessere Reproduzierbarkeit als die Ergebnisse von Untersuchungen, die an exzidierter Haut von Mensch und Schwein durchgeführt wurden. Nachdem die Förderung des Projekts soeben durch das BMBF verlängert wurde, werde jetzt mit der Validierung der neuen Methode begonnen.

Klassifizierung des hautirritierenden Potenzials

Der dritte Teil des Symposiums befasste sich mit Methoden zur Prüfung der Hautirritation. **Manfred Liebsch** von der am BfR eingerichteten Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch (ZEBET) stellte eine vom *European Centre for the Validation of Alternative Methods* (ECVAM) geförderte Validierungsstudie zur Klassifizierung des hautirritierenden Potenzials vor, die derzeit unter dem Management der ZEBET durchgeführt wird.

Da vor Studienbeginn noch keine validierten *in vitro* Tests zur Prüfung der

Hautirritation vorlagen, wurde zunächst eine Prävalidierungsstudie mit fünf verschiedenen *in vitro* Testsystemen durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass noch kein Testsystem für eine Validierung ausreichend ausgereift war. Nach Verbesserung der Testsysteme wurden schließlich drei von ihnen formal validiert, und zwar die kommerziell verfügbaren Epidermismodelle Episkin® (Episkin SNC, Lyon) und EpiDerm™ (MatTeK Corporation, Ashland) sowie der *Skin Integrity Function* Test (SIFT) an muriner Haut.

Ziel der Studie sei es, Gefahrenstoffe in hautreizend und nicht hautreizend klassifizieren zu können. Hierzu hätten die beiden Epidermismodelle exzellente und übereinstimmende Vorhersagen innerhalb der vorher definierten Akzeptanzkriterien geliefert. Dagegen habe der SIFT diesbezüglich überraschend schlecht abgeschnitten und werde deshalb nicht weiter untersucht.

In der zweiten Phase der Studie werde neben der Viabilität der Haut auch die Freisetzung von Interleukin-1-alpha als Endpunkt berücksichtigt. Damit sollen die Aussagefähigkeit der Epidermismodelle verbessert und die Möglichkeit geschaffen werden, neben hautreizenden und nicht hautreizenden Stoffen auch mild reizende Substanzen zu klassifizieren, was insbesondere für die Sicherheitsbewertung von Kosmetikrohstoffen bedeutsam ist.

Prüfung der Hautirritation am Menschen

Da die Tierschutzgesetzgebung schon seit längerem tierexperimentelle Prüfungen von kosmetischen Fertigprodukten verbietet, werden diese heute ebenso wie topische Dermatotherapeutika überwiegend in Humanversuchen auf ihre lokale Verträglichkeit geprüft. Einen Überblick über die Möglichkeiten und Grenzen der derzeit eingesetzten Methoden präsentierte der Dermatologe **Klaus P. Wilhelm**, Inhaber des Instituts proDERM in Schenefeld bei Hamburg.

Zur routinemäßigen Prüfung des akuten und des kumulativen Irritationspotenzials werden Verfahren wie der einfache und der dreifache 24-Stunden-Patchtest, der Duhring-Kammer-Test und der repetitive offene Applikationstest an jeweils 20 bis 50 freiwilligen hautgesunden Probanden durchgeführt. Das Sensibilisierungsrisiko kann, soweit ethisch vertretbar, im *Human Repeated Insult Patch Test* (HRIPT) geprüft werden. Darüber hinaus kann es je nach Produktkategorie sinnvoll sein, auch die Phototoxizität, die Photosensibilisierung, die Augenverträglichkeit und die sensorische Irritation mit speziell hierfür entwickelten Methoden zu prüfen.

Humanhautmodelle in der praktischen Anwendung

Über ein neues Einsatzgebiet für dreidimensionale Humanhautmodelle berichtete **Jens-Olaf Eichler** von der Firma Stockhausen GmbH, Krefeld. Er untersuchte in einem solchen Modell die regenerative Wirkung von Emulsionen, die im beruflichen Bereich als Hautschutzmittel zur Prävention irritativ bedingter Kontaktekzeme eingesetzt werden. Nachteilig beim Hautmodell sei zwar die im Vergleich zum Probandenversuch und zum perfundierten Organmodell geringer ausgeprägte Barriereschicht, große Vorteile böten jedoch die strukturelle Ähnlichkeit zu humaner Haut und die Möglichkeit, Wirkmechanismen und biochemische Reparaturprozesse über längere Zeiträume untersuchen zu können.

Die beispielhaft untersuchten Emulsionen verstärkten die Regeneration der mit Natriumlaurylsulfat vorgeschädigte Hautbarriere. Sie verminderten die Zelllyse sowie die Ausschüttung der Entzündungsmediatoren Prostaglandin-E2 und Interleukin-1-alpha. Da die im Hautmodell getesteten Emulsionen auch in einem parallel durchgeführten repetitiven okklusiven Irritationstest an Probanden regenerative Effekte zeigten, sieht der Referent die neue Testmethode als geeignetes Verfahren für eine gezielte Wirkstoff- und Produktentwicklung an.

Methoden zur Prüfung der Sensibilisierung

Neben der Irritation kommt auch der Sensibilisierung der Haut durch Fremdstoffe große klinische Bedeutung zu. Bei der Entwicklung neuer Produkte sollten sensibilisierende Substanzen deshalb bereits im Vorfeld identifiziert werden. Gegenwärtig dienen dazu verfeinerte Versuche am Tier, wie der weiterentwickelte lokale Lymphknotentest (LLNA) am Mäuseohr, über den **Hans-Werner Vohr**, *Bayer Health Care AG* Wuppertal, berichtete. Mit dieser verbesserten Methode sei im Gegensatz zum klassischen LLNA eine Unterscheidung von irritierenden und sensibilisierenden Eigenschaften möglich.

Carsten Goebel, Wella AG Darmstadt, stellte eine viel versprechende neue *in vitro* Methode zur Prüfung des sensibilisierenden Potenzials von Chemikalien vor. Mit dieser Methode wird die Aktivierung von dendritischen Zellen, die aus humanen peripheren Monozyten gewonnen werden, geprüft. Parallel dazu wird zur Sicherstellung der Bioverfügbarkeit die Hautpenetration der Prüfsubstanz untersucht. Nur die gemeinsame Erfassung dieser beiden für die Entwicklung einer allergischen Reaktion relevanten Schritte führe zu einer Methode, die zukünftig Tierversuche ersetzen könnte.

Targets und Testmodelle für neue Arzneimittel

Einen umfassenden Überblick über die komplexen Abwehrmechanismen, die bei einer Aktivierung des Immunsystems durch Pathogene in der Haut in Gang gesetzt werden, bot **Heinfried H. Radeke** vom Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Frankfurt am Main. Er schilderte mit Hilfe einer Videosimulation, wie Langerhanszellen als Subpopulation der dendritischen Zellen nach einer entzündlichen Aktivierung von der Epidermis zum Lymphknoten gelangen. Das detaillierte Aufklären der Signalwege dieses Prozesses ermögliche die Identifizierung neuer pharmakologischer Targets sowohl für den Bereich der Dermatologie als auch für andere Entwicklungsfelder.

Wolf-Henning Boehncke von der Universitäts-Hautklinik Frankfurt am Main befasste sich mit Tiermodellen der Psoriasis zur Prüfung von Arzneistoffen. Diese zu finden, werde durch den komplexen Phänotyp, die polygenetische Determinierung und die multifaktorielle Genese der Erkrankung wesentlich erschwert. Die meisten etablierten Psoriasis-Tiermodelle stellten nur einzelne Aspekte der Erkrankung dar.

Am besten bewährt hat sich nach Einschätzung des Referenten das Psoriasis-SCID-Maus-Modell, bei dem Haut von Psoriasis-Läsionen auf die Haut von Mäusen mit einem schweren kombinierten Immundefekt (SCID) transplantiert wird. Dieses Modell liefere zwar nur qualitative Aussagen und repräsentiere immer nur einen einzelnen Patienten, doch zeige es eine hohe Prädiktivität und eine gute Korrelation zur klinischen Wirksamkeit. Letzteres verdeutlichte Boehncke am Beispiel verschiedener etablierter und noch in der Entwicklung befindlicher Antipsoriatika.

Regulatorische Aspekte zu tierversuchsfreien Prüfmethoden

Zum Abschluss des Symposiums berichtete **Horst Spielmann**, Leiter der ZEBET am BfR, über die regulatorischen Anforderungen an neue tierversuchsfreie Prüfmethoden zur Sicherheitsbewertung. Sie müssen, bevor sie international anerkannt werden können, experimentell validiert werden. Die ZEBET erarbeitete hierzu in Kooperation mit dem europäischen Validierungszentrum ECVAM und schließlich weiterführend mit der OECD ein entsprechendes Konzept. Danach schließen sich an die Testentwicklung zunächst eine Prävalidierung, dann die Validierung und schließlich eine unabhängige Evaluierung (*peer review*) an.

Dieses Konzept hat sich bei der unter der Leitung der ZEBET erfolgreich abgeschlossenen Validierung von *in vitro* Phototoxizitätstests und *in vitro* Embryotoxizitätstests bereits bewährt. Erfolgreich abgeschlossen wurden auch Validierungen von *in vitro* Tests mit Humanhautmodellen zur Prüfung auf Korrosivität, die von der EU und den Behörden der USA akzeptiert wurden. Schließlich hat die OECD im Jahr 2004 erstmals vier validierte tierversuchsfreie Prüfmethoden in den Katalog der offiziellen OECD-Prüfmethoden aufgenommen. Damit sei die *in vitro* Toxikologie inzwischen zu einer erwachsenen Wissenschaft gereift, erklärte Spielmann.

Sylvia Schreiber
Institut für Pharmazie
Königin-Luise-Straße 2 u. 4
Freie Universität Berlin
D-Berlin

Tierschutz und Umweltschutz

Tagung in der Evangelischen Akademie Bad Boll
18.-20. März 2005

Es waren keine 100 Gäste, die Studienleiter Helmut Geiger, Theologe und Jurist, und Martin Pfeiffer, Kirchenrat a.D., am 18. März nachmittags begrüssen konnten. Die Teilnehmer aus Deutschland, Österreich und der Schweiz stammten wie auch schon bei den letzten Tagungen in Bad Boll überwiegend aus Kreisen des Tierschutzes (ca. 40%), von mit Fragen der Tierhaltung betrauten Behörden, darunter erfreulich viele Amtstierärztinnen und Amtstierärzte (ca. 20%), knapp 10% kamen von Universitäten, etwa 10% hatten direkt als Tierhalter oder als Mitarbeiter in Landwirtschaftsverbänden mit der Problematik zu tun, ein einziger Industrievertreter konnte gezählt werden.

Sieben einführende Vorträge sollten die Teilnehmer auf die vier Arbeitsgruppen einstimmen, deren Ergebnisse am Sonntag vorgestellt und in einer abschliessenden Podiumsdiskussion bewertet werden sollten.

Zu den Vorträgen: **Ulrich Seidel** (Evangelische Akademie Sachsen-Anhalt, D-Wittenberg) hielt das einleitende Referat „Zum Verhältnis von Tierschutz und Umweltschutz – aus theologischer Sicht". Zwar sei der Tierschutz bis auf wenige Bibelzitate in der jüdisch-christlichen Tradition nicht explizit verankert, so Seidel, aber man dürfe davon ausgehen, dass Jesus, dessen Mitleid tief ausgeprägt war, in unserer Welt sicher eher Ökologe als Eierbaron oder Fabrikbesitzer geworden wäre. Für Jesus als Globalisierungsgegner oder Vegetarier fänden sich jedoch keine Zitate. Erst in vielen Heiligengeschichten seien barmherzige Taten gegenüber Tieren beschrieben. Das Töten bleibe in unserer von einer (Tierzüchter-) Religion geprägten Gesellschaft eine offene Wunde, und es sei schon sehr seltsam, dass sich hier rechtfertigen müsse, wer Gewalt gegen Tiere ablehne. Die Verbrauchszahlen an Schlachttieren allein in Deutschland belegten, dass hier etwas aus dem Lot geraten sei. **Herwig Grimm** von der Abteilung Agrarethik an der Universität D-München (Institut für Technik-Theologie-Naturwissenschaften) stellte einen Entscheidungskatalog vor, mit dem es gelingen könnte, Tierhaltungsfragen in der Landwirtschaft auf ihre ethische Verträglichkeit hin zu bewerten. In seinem Thesenblatt „Konflikte um die Tierhaltung – Skizze eines ethisch begründbaren Entscheidungsweges" versuchte Grimm die Fragen zu beantworten, wie man in der Landwirtschaft moralisch entscheiden könne, und wie solche Entscheidungen konkret aussähen. Ins Zentrum seiner Überlegungen stellte er den ethischen Ansatz – das Wohl der Tiere, die als versehrbare Lebewesen und aufgrund ihrer moralisch relevanten Empfindungs- und Leidensfähigkeit unsere besondere Aufmerksamkeit erhalten sollten. Seine drei Forderungen: a) Jeder Eingriff, der das