



Aufnahmeantrag

Hiermit stelle ich den Antrag, als Mitglied in die Mitteleuropäische Gesellschaft für Alternativmethoden zu Tierversuchen (MEGAT) **aufgenommen zu werden**.

Ich erkläre mich einverstanden, daß meine Personalien in das Mitgliederverzeichnis aufgenommen werden und dieses Verzeichnis versandt wird (DVR 0842842).

- Einzelperson Universitätseinrichtung
 Unternehmen sonstiges

Name _____
Vorname _____
Titel _____
Universität/Firma _____
Institut/Abteilung _____

bitte angeben: die Universität/Firma ist auch die Zustelladresse:

- Ja Nein

Straße/Postfach _____
PLZ _____
Ort _____
Land _____
Telefon _____
Fax _____
E-Mail _____
Beruf _____

Der jährliche Mitgliedsbeitrag beträgt:
für **Einzelpersonen** Euro 56,32 / CHF 88,-
für **Studierende** Euro 23,62 / CHF 37,-
für **Unternehmen etc.** Euro 109,- / CHF 170,-

Dieser Betrag beinhaltet den Bezug der 4 x pro Jahr erscheinenden Zeitschrift ALTEX – Alternativen zu Tierexperimenten (inkl. Versandkosten) sowie Ermäßigungen für die Kongresse über Alternativen zu Tierversuchen in Linz (Österreich) (inkl. Tagungspublikationen).

Einsenden an: MEGAT, Postfach 210, A-4021 Linz
Fax: +43-1-817 94 04
E-Mail: info@zet.or.at



Programm

12. Kongress über Alternativen zu Tierversuchen

9. Jahrestagung der MEGAT – Mitteleuropäische Gesellschaft für Alternativmethoden zu Tierversuchen
15.-17. Oktober 2004, Universität Linz

Freitag, 15.10.2004

13.00-13.30 Begrüßung

anschließend Vorträge zu folgenden Themen

13.30-15.15 Ethik und Recht

Vorsitz: Franz P. Gruber, CH-Zürich

13.30-14.15 Alfred Locker, A-Wien

Tierversuchs-Ethik und der „Menschenversuch“ – Gedanken zum Umgang mit Tieren

14.15-14.35 Shiranee Pereira, IN-Chennai

Ahimsa and alternatives – the concept of the 4th R. The CPCSEA in India

14.35-14.55 Jasmijn de Boo, NL-Utrecht

The concept of reduction of animal use in biomedical sciences

14.55-15.15 Ursula G. Sauer, D-Neubiberg

Aktivitäten in der EU zum Ersatz von Tierversuchen zur Bestimmung von Muscheltoxinen aus der Sicht des Deutschen Tierschutzbundes

15.15-15.45 Pause, Poster und Kaffee

15.45-17.25 Pharmakotoxikologie *in vitro* I

Vorsitz: Walter Pfaller, A-Innsbruck

15.45-16.15 Marjolein van Boxel, NL-Utrecht

Potential of “-omics” technologies in terms of replacement, reduction and/or refinement of animal experimentation

16.15-16.45 Günther Bonn, A-Innsbruck

Metabolomics und Proteomics – Bedeutung für *in vitro* Alternativen

16.45-17.05 Horst Spielmann, D-Berlin

Die Anwendung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen (QSAR) bei der toxikologischen Bewertung gefährlicher chemischer Stoffe im Bundesinstitut für Risikobewertung BfR

17.05-17.25 Michaela Kröger, D-Darmstadt

SELDI approaches for liver cancer analysis

17.30-19.30 Postersitzung I

Vorsitz: Thomas Hartung, I-Ispra

Besichtigung der Poster mit Anwesenheit der Autoren

20.00 Verleihung des Doerenkamp-Zbinden-Forschungspreises und anschließend Empfang

Samstag, 16.10.2004

08.30-10.25 Ökotoxikologie

Vorsitz: Reinhard Dallinger, A-Innsbruck

08.30-08.55 Andreas Gies, D-Berlin

Ersatz von Wirbeltierversuchen in der regulatorischen Ökotoxikologie

08.55-09.20 Karl Fent, CH-Rüti

***In vitro* Systeme zur Analyse endokrin wirksamer Substanzen**



- 09.20-09.35 Markus A. Lill, CH-Basel
Computer-gestützte Voraussage Rezeptor-vermittelter umwelttoxischer Phänomene – Anwendung auf endokrine Störungen
- 09.35-10.00 Matthias Liess, D-Leipzig
Mikro- und Mesokosmos-Modelle in der Ökotoxikologie
- 10.00-10.25 Thomas Braunbeck, D-Heidelberg
Der Fischeitest als Alternative zum Fischtest – Entwicklung, Einsatz als Routinetest und weitere Anwendungsmöglichkeiten
- 10.25-10.55 Pause, Poster und Kaffee
- 10.55-12.20 Standardisierung von Zellkulturen**
Vorsitz: Gerhard Gstraunthaler, A-Innsbruck
- 10.55-11.20 Wilhelm Dirks, D-Braunschweig
Short Tandem Repeat (STR) DNA Typisierung als internationale Referenztechnik für humane Zelllinien
- 11.20-11.45 Richard Scheithauer, A-Innsbruck
DNA Fingerprinting zur Authentifizierung und Kodierung von humanen Zelllinien
- 11.45-12.00 Claudia Eder, A-Wien
Usage of autologous serum instead of Foetal Calf Serum (FCS): does it make a difference?
- 12.00-12.20 Christian Seel, D-Planegg
Olympus cell® – Imaging Station for life cell microscopy
- 12.20-13.30 Mittagspause
- 13.30-15.00 Pharmakotoxikologie *in vitro* II**
Vorsitz: Horst Spielmann, D-Berlin
- 13.30-13.45 Ellen Fritsche, D-Düsseldorf
A new *in vitro* method for testing developmental neurotoxicity
- 13.45-14.00 Helga Tuschl, A-Seibersdorf
Gene expression monitoring in immunotoxicology – DNA arrays and real time PCR
- 14.00-14.15 Roland Buesen, D-Berlin
Current Improvements in the Embryonic Stem Cell Test (EST)
- 14.15-14.30 Veronika Anna Ehrlich, A-Wien
Einsatz einer humanen Leberzelllinie (HepG2) als Alternative zu Tierexperimenten in der genetischen Toxikologie
- 14.30-14.45 Maria Iris Hermanns, D-Mainz
A reproducible co-culture model of the human distal lung barrier: 24-well-screening for pulmonary toxicology *in vitro*
- 14.45-15.00 Peter C. Dartsch, D-Horb a.N.
Digestionsmodell und Schadstoffmobilisierung: Zellbiologisches Screening von Bioverfügbarkeit und Akuttoxizität
- 15.00-15.30 Pause, Poster und Kaffee
- 15.30-16.40 Förderung der Entwicklung von Alternativmethoden auf europäischer und nationalstaatlicher Ebene**
Vorsitz: N.N.
- 15.30-15.50 Beatrice Lucaroni, B-Brüssel
Alternative methods and their rating within the 6th Framework
- 15.50-16.10 Thomas Hartung, I-Ispra
ECVAMs current activities in the validation of alternative methods
- 16.10-16.25 Walter Pfaller, A-Innsbruck
Neues von ECOPA – European Consensus Platform for Alternatives
- 16.25-16.40 Barbara Grune, D-Berlin
Indexierung biowissenschaftlicher Informationen zu Alternativmethoden
- 16.40-18.30 Postersitzung II**
Vorsitz: Miroslav Cervinka, CS-Hradec Kralove
Posterbesichtigung mit Anwesenheit der Autoren



18.30-19.30 MEGAT-Mitgliederversammlung
19.45 Abfahrt zum Gesellschaftsabend

20.30 Gesellschaftsabend in der FH-Medizintechnik
Verleihung des ALTEX-Preises 2004
Verleihung der Posterpreise Linz 2004
Verleihung des Promocell Dissertationspreises 2004

Sonntag, 17.10.2004

09.00-12.20 EU-Kosmetik- und Chemie-Politik (REACH)
Vorsitz: Horst Spielmann, D-Berlin

09.00-09.20 Michael Lulei, D-Frankfurt
REACH: Probleme und Lösungsmöglichkeiten aus Sicht der chemischen Industrie

09.20-09.35 Christian Gründling, A-Wien
REACH – Tierversuche: Ein Widerspruch?

09.35-09.55 Gabriele Scholz, CH-Lausanne
Risikobewertung von Chemikalien in Lebensmitteln: Ein gezielter Ansatz für prozessbedingte chemische Kontaminanten unter Vermeidung von Tierversuchen

09.55-10.10 Ursula G. Sauer, D-Neubiberg
Aktivitäten von Politik und Behörden bei der tierschutzgerechten Ausgestaltung der neuen EU-Chemikalienverordnung – Erfahrungen und Erwartungen aus Sicht des Deutschen Tierschutzbundes

10.10-10.25 Jürgen Scheuenpflug, D-Planegg
Neue Technologien aus der GenPharmTox

10.25-10.35 Diskussion

10.35-11.05 Pause

11.05-11.20 Irmela W. Ruhdel, D-Neubiberg
EU-Kosmetik: Zeitpläne für den Ersatz von Tierversuchen – Anmerkungen aus der Sicht des Deutschen Tierschutzbundes

11.20-11.35 Manfred Liebsch, D-Berlin
Die ECVAM Validierungsstudie von drei *in vitro* Methoden zur Prüfung auf hautreizende Eigenschaften – erste ermutigende Ergebnisse

11.35-11.50 Sylvia Schreiber, D-Berlin
Validation study on percutaneous absorption via human skin models

11.50-12.05 Jens J. Hoffmann, D-St. Katharinen
Bestimmung korrosiver Substanzen mit Epidermal Skin Test 1000 (EST-1000) – einer neuen rekonstituierten, humanen Epidermis

12.05-12.20 Thomas Welss, D-Düsseldorf
Skin irritation: mechanistic studies using reconstructed human epidermis

12.20-13.20 Vakzine und Biologika
Vorsitz: Coenrad Hendriksen, NL-Utrecht

12.20-12.35 Stefan Fennrich, D-Konstanz
Standardisierung von humanem Blut für *in vitro* Applikationen mittels Kryokonservierung: Optimierung des *in vitro* Pyrogentests (IPT) als Alternative zum Kaninchentest

12.35-12.50 Alexander Mergel, D-Langen
VACTRAIN – Ein Trainingsprogramm zu 3R-Methoden in der Qualitätskontrolle von Impfstoffen

12.50-13.05 Ute Roßkopf, D-Langen
Ersatz des *in vivo* Neutralisationstests bei der Wirksamkeitsprüfung von Tetanusimpfstoffen *ad us. vet.* im Rahmen der Zulassung

13.05-13.20 Marion Krug, D-Langen
Serologische Testmethoden als Ersatz für Infektionsversuche an Ferkeln bei *E.coli*-Muttertierimpfstoffen

13.20 Schlusswort

Linz 2004:

Abstracts der Vorträge und Poster

(alphabetisch nach Erstautor/inn/en geordnet, bei Vorträgen ist der Vortragende zuerst genannt)

Poster

Evaluation of perfusion culture using the EpiFlow for long term toxicity testing of chemicals

Thomas Abberger, Paul Jennings and Walter Pfaller

Department of Physiology, Medical University, A-Innsbruck

e-mail: Thomas.Abberger@uibk.ac.at

Under conventional static cell culture it is not possible to conduct true chronic toxicity testing, defined as repeated or continuous exposure over a prolonged period of time. Therefore, we utilised a perfusion culture apparatus (EpiFlow, Felder et al., 2002) to test the toxic effects of CdCl₂ occurring during an administration period of 4 days. CdCl₂ is well known to induce chronic toxicity in the kidney.

Using static culture of LLC-PK1 cells, the NOEL and the EC₅₀ of CdCl₂ were determined to be 3 µM and 15 µM, respectively, after 72 h incubation by the release of LDH (lactate dehydrogenase) and AK (adenylate kinase).

Therefore, perfusion experiments of LLC-PK1 cells cultured on solid sub-

strates in the EpiFlow with 0 µM, 3 or 15 µM CdCl₂ in continuously oxygenated DMEM containing 1% FCS were performed over 4 days. Samples were collected at regular intervals and analysed for the activity of LDH and AK released. In addition, glucose consumption and lactate production were monitored. The viability of the cells was evaluated using a resazurin based assay at the end of the experiments.

Under perfusion conditions, CdCl₂ resulted in 100% and 64% lethality for 15 and 3 µM, respectively, as assayed by resazurin.

Administration of 15 µM CdCl₂ increased LDH and AK release, as well as lactate production, showing peak con-

centrations after 12 h of perfusion, and a subsequent decrease to values significantly below control.

These results indicate a greater susceptibility of the LLC-PK1 cells to CdCl₂ in perfusion culture than under static conditions. Furthermore, the feasibility of on-line monitoring of the lactate production as a novel indicator of cell toxicity under perfusion conditions was shown.

Felder, E., Jennings, P., Seppi, Th. and Pfaller, W. (2002). LLC-PK1 Cells Maintained in a New Perfusion Cell Culture System Exhibit an Improved Oxidative Metabolism. *Cell. Physiol. Biochem.* 12, 153-162.

Vortrag/Lecture

Metabolomics and proteomics for the analysis of *in vitro* samples

Günther K. Bonn, Günther Stecher and Christian W. Huck

Institute of Analytical Chemistry and Radiochemistry, Leopold-Franzens University, A-Innsbruck

e-mail: Guenther.Bonn@uibk.ac.at

Since metabolomics and proteomics have become a permanent growing domain, miniaturisation of analytical systems and their coupling to mass spectrometry (MS) is one of the most important issues in analytical chemistry. Most interesting analyses are often available in small amounts and therefore, multidimensional liquid-chromatography offers the possibility of sample

purification and pre-concentration also for *in vitro* analysis.

Columns and packing materials, porous, non-porous, monolithic and encapsulated are the core of the separation column. Capillary columns packed with 2 µm non-porous poly-(styrene-divinylbenzene (PS/DVB), with a PS/DVB or poly-(glycidyl methacrylate/divinylbenzene) (GMD/DVB) monolith

of the stationary are especially favorable for the fabrication of capillary columns having 20 up to 300 µm i.d.. Due to the presence of micro-, meso- and macro-pores capillaries packed with a PS/DVB monolith allow high efficiencies (up to 250,000 plates), better peak shapes (halved peak width < 2s), reduced analysis time and improved pH-stability. Furthermore, monolithic

PS/DVB discs (3 mm x 10.6 mm i.d.) can be used for the selective pre-concentration of bio-molecules using 2-dimensional liquid chromatography. The efficiency of this system will be shown by the separation of a protein and phenolic compound standard mixture. Encapsulation of silica particles (300 Å, 3 µm) with monolithic PS/DVB in capillary columns enables the separation of proteins and peptides with improved resolution. Comparable efficien-

cies were achieved using GMD/DVB monolithic capillary columns. Due to the low flow rate of 2-3 µl/min the coupling to a mass spectrometer (MS) via an ESI interface after separation into 2 dimensions is extremely efficient. As an alternative fractions can also be spot on a target plate for further analysis by MALDI-Tof (MS). GMD and cellulose derivatised with iminodiacetic acid (IDA) and loaded with copper (II) offer an excellent target for the search of

biomarker proteins and metabolites for the early detection and diagnosis of certain diseases by surface enhanced laser desorption ionisation (SELDI) time of flight (TOF) mass spectrometry (MS).

The efficiency of both technologies using the above described stationary phases also in 2 dimensions will be demonstrated by the analysis of a number of real applications in metabolomics and proteomics.

Poster

[Information on alternative methods provided on the internet by the database "AnimAlt-ZEBET"]

Informationsangebot der ZEBET-Datenbank „AnimAlt-ZEBET“ im Internet zu aktuellen Themen auf dem Gebiet der Alternativmethoden zu Tierversuchen

Rainer Box, Barbara Grune, Antje Dörendahl, Susanne Skolik, Heinz Wohlgemuth und Horst Spielmann

Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch (ZEBET), Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), D-Berlin
E-Mail: grune.zebet@bfr.bund.de

Die Fachdatenbank AnimAlt-ZEBET für Ersatz- und Ergänzungsmethoden zu Tierversuchen ist darauf ausgerichtet, aktuelle Themen aufzugreifen, kompakt aufzubereiten und inhaltlich strukturiert anzubieten, um einen einfachen Zugang zu Information zu ermöglichen.

AnimAlt-ZEBET wird von ZEBET, der Zentralstelle für Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden im Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), erstellt und seit Februar 2000 über das Deutsche Institut für Medizinische Dokumentation und Information (DIMDI, <http://www.dimdi.de>) kostenfrei im Internet angeboten. DIMDI ermöglicht durch eine spezielle Recherchetechnik den Zugriff zu den Datenbeständen von mehreren Datenbanken gleichzeitig und erzielt dadurch ein rasches Auffinden von Information.

Im aktuellen Bestand der AnimAlt-ZEBET befinden sich 115 Dokumente, in denen überwiegend Alternativmethoden zu behördlich vorgeschriebenen Tierversuchen übersichtlich in englischer Sprache beschrieben werden. Die Darstellung gliedert sich in Hintergrundinformationen zum Anwendungsbereich, Beschreibung von Prinzip und Durchführung der Methode und eine zusammenfassende Bewertung mit einer Liste der relevantesten Literaturstellen. In jedem Dokument wird der derzeitige Stand der Entwicklung und der wissenschaftlichen und behördlichen Anerkennung der Methode im nationalen und internationalen Rahmen vermerkt. Eine Besonderheit von AnimAlt-ZEBET ist die wissenschaftlich begründete Einstufung jeder Alternativmethode nach dem 3R-Konzept von Russel & Burch

(Grune et al., *ATLA 32, Suppl. 1B*, 573-582).

AnimAlt-ZEBET dokumentiert Methoden aus allen Gebieten der Biomedizin, u.a. Toxikologie, Pharmakologie, Molekularbiologie, Biophysik, Medizin, Impfstoffkunde, Lebensmittelhygiene und Parasitologie. Beispiele für aktuelle Themenbereiche sind *in vitro* Hautmodelle, *in vitro* Phototoxizitätstestung, RNA-Interferenz, Clostridium-Vakzine, Ersatz von Kälberserum in der Zellkultur, Biosensorik und nicht-invasive bildgebende Verfahren.

Anhand einer kleinen Auswahl von Dokumenten wird demonstriert, wie die systematische Suche in AnimAlt-ZEBET auf den Nutzer zugeschnittene fachspezifische Information vermittelt und Recherchen in allgemeinen Datenbanken und damit Zeit ersparen kann.



Poster

The isolated perfused bovine udder – a predictive model for mucous membrane absorption

Michael Braun¹, Heidi Horst², Alexandra Hahn², Thomas Wittig², Kathrin Maurer³, Bernhard Scheidel³ and Manfred Kietzmann¹

¹Dept. Pharmacology, Toxicology and Pharmacy, University of Veterinary Medicine Hannover Foundation, D-Hannover,

²Pohl-Boskamp GmbH & Co, D-Hohenlockstedt, ³ACC GmbH, D-Leidersbach

e-mail: michael.braun@tiho-hannover.de

The presented studies were performed in order to examine whether the *in vitro* model of the isolated perfused bovine udder is suitable for predictive examinations on the bioavailability of drugs administered sublingually or orally in humans. For this investigations, the absorption of intracisternally administered test formulations, namely glycerol trinitrate (GTN) – the active ingredient in sublingual sprays – and d-limonene, 1,8-cineole as well as a-pinene (ingredients of Myrtol[®] standardised, Pohl-Boskamp) was studied.

The organs used in this examinations were obtained at the slaughterhouse from

healthy and lactating Holstein-Frisian cows. Thirty minutes after slaughter, udder perfusion was re-established with gassed milk/tyrode solution (1:1) for experiments with Myrtol[®], and with tyrode containing phosphatidyl choline for experiments with GTN formulations.

Significant differences in the absorption of GTN were found for the sublingual formulations. These data are in accordance with bioavailability studies performed in humans. After intracisternal administration of Myrtol[®], about 7 mg 1,8-cineole were absorbed within a perfusion period of four hours. In contrast, d-limonene and a-pinene were

not always detectable in the perfusate. These data also correlate with results from studies in humans.

In conclusion, the use of the isolated perfused bovine udder for studies on the absorption of intracisternally administered compounds is possible. The results of the presented studies reflect a correlation with bioavailability studies in humans and seem to be of predictive value. By using this *in vitro* model in comparable pharmacokinetic studies, the isolated perfused bovine udder may contribute to a reduction of animal investigations.

Vortrag/Lecture

[The German egg test as an alternative to the fish test?

Development, routine use and application beyond acute toxicity]

Der Fischeitest als Alternative zum Fischtest – Entwicklung, Einsatz als Routinetest und weitere Anwendungsmöglichkeiten

Thomas Braunbeck

Aquatische Ökologie und Toxikologie, Institut für Zoologie, Universität D-Heidelberg

E-Mail: braunbeck@urz.uni-heidelberg.de

Nachdem der Fischeitest mit Eiern des Zebraäbrblings (*Danio rerio*) im Rahmen eines DIN-Verfahrens für die Prüfung der toxischen Wirkung von Abwässern genormt worden war (DIN 38415, Teil 6: „Bestimmung der nicht akut giftigen Wirkung von Abwasser auf die Entwicklung von Fischeiern über Verdünnungsstufen“, wurde dieses Verfahren bereits im Jahr 2002 in der Abwasserverordnung der Bundesrepublik Deutschland als gleichwertig mit dem klassischen Fischtest (DIN 38412 L31: „Bestimmung der nicht akut giftigen

Wirkung von Abwasser gegenüber Fischen über Verdünnungsstufen“) verankert.

Im Abwasserabgabengesetz verblieb der klassische Fischtest jedoch zunächst als das einzig zulässige Referenzverfahren für die Bemessung der Abwasserabgabe. Nur in Bayern wurde der Fischeitest in der routinemäßigen Abwasserüberwachung routinemäßig eingeführt, wobei bei Überschreitung der zulässigen Immissionshöchstwerten zunächst nach wie vor der Fischtest zur Festlegung der Abwasserabgabe durchgeführt werden musste.

Im Frühjahr 2004 folgte jedoch eine analoge Änderung des Abwasserabgabengesetzes, so dass mit Ablauf einer Übergangsfrist bis zum 1.1.2005 der Fischeitest den klassischen Goldorfen-test vollständig ersetzt. Als Begründung werden neben tierschutzrechtlichen Überlegungen eine bessere Reproduzierbarkeit und eine verbesserte statistische Sicherheit genannt. Das Verfahren des Fischeitests wurde international in modifizierter Form mittlerweile sowohl als ISO-Norm für die Prüfung von Abwässern als auch als Vorschlag für eine



OECD *Guideline* für die Prüfung von Chemikalien eingebracht.

Der Vortrag stellt zunächst detailliert das Verfahren des Fischeitests in der routinemäßigen Anwendung nach DIN vor. Anwendungsbeispiele sollen jedoch

im Anschluss zeigen, dass der Fischeitest nicht nur für die Ermittlung akuter und subakuter Toxizität geeignet ist, sondern dass das Modell Fischei z.B. auch für die Untersuchung der toxischen Wirkung von Sedimenten eingesetzt werden kann.

Die Integration neuer Endpunkte gestattet schließlich auch die Bestimmung spezifischerer Endpunkte wie Gentoxizität oder dioxinähnliche Aktivität mit Hilfe von Fischeiern.

Vortrag/Lecture

Current improvements in the embryonic stem cell test (EST)

Roland Buesen, Anke Visan, Birgitta Slawik, Katharina Schlechter, Elke Genschow, Horst Spielmann and Andrea Seiler

National Center for Documentation and Evaluation of Alternative Methods to Animal Experiments (ZEBET), Federal Institute for Risk Assessment (BfR), D-Berlin
e-mail: r.buesen@bfr.bund.de

The Embryonic Stem Cell Test (EST) represents a promising *in vitro* assay for the detection of the teratogenic/embryotoxic potential of chemicals and drugs. The scientifically validated EST takes advantage of the capacity of embryonic stem cells (ES cells) to differentiate into several cell types. In the validated EST protocol, the inhibition of differentiation of undifferentiated ES cells into contracting myocardial cells is evaluated by microscopic analysis. In combination with the detection of the cytotoxic potential of the same test compound and by the use of a biostatistical prediction model (PM), the EST is able to discrim-

inate between three classes of embryotoxicity with high accuracy.

In a joint BMBF project the EST has been successfully improved by implementing molecular endpoints of differentiation to replace the microscopic analysis and to reduce the test duration. We have examined the expression of cardiac-specific proteins in ES cell cultures by indirect flow cytometry analysis. The results obtained during a pre-validation study using 10 different chemicals will be presented.

To expand the field of application new attempts will be made considering following key aspects: (1) For evaluation

and consolidation of the PM the enlargement of the database is required. (2) A metabolic system as an adjunct to the validated EST protocol has to be developed because in its present form, the EST is only applicable for compounds that do not need metabolic activation. (3) In order to avoid false negative classifications and to improve the precision of the EST, other cell-type-specific endpoints of differentiation have to be established in addition to the cardiac differentiation.

In summary, the improved EST will represent an important tool for hazard identification in the risk assessment process.

Vortrag/Lecture

[Mobilisation of hazardous substances in the digestive tract model: cell biological screening of bioavailability and acute toxicity]

Digestionsmodell und Schadstoffmobilisierung: Zellbiologisches Screening von Bioverfügbarkeit und Akuttoxizität

Peter C. Dartsch¹, Elke Lacher¹ und Ursula Kleinteich²

¹Institut für zellbiologische Testsysteme (IZT), Dartsch Scientific GmbH, D-Horb a.N., ²Institut für angewandte Forschung (iaf), FH Heilbronn, D-Heilbronn
E-Mail: dartsch-scientific@t-online.de

Bei der Prüfung auf toxische Stoffe nach DIN EN 71-3 (Sicherheit von Spielzeug, Migration bestimmter Elemente/Schwermetalle) wird unter Bedingungen extrahiert, die einem Verbleib im Verdauungs-

trakt nach dem Verschlucken entsprechen. Dazu wird eine zweistündige Inkubation bei 37°C in 0,07 M Salzsäure mit nachfolgender chemisch-analytischer Bestimmung der Konzentration der ge-

lösten und somit bioverfügbaren Einzelkomponenten durchgeführt. Die Prüfung ist dann bestanden, wenn die Grenzwerte unterschritten werden. Dabei unberücksichtigt bleibt jedoch, dass das Verfahren



lediglich den Einfluss der Magensäure und nicht des gesamten Verdauungstraktes erfasst und zudem mögliche toxische Kombinationswirkungen der Einzelkomponenten, deren Konzentrationen im subtoxischen Bereich liegen, nicht erfasst werden.

Basierend auf der E DIN 19738 (2000-05) wurde ein Modell des Verdauungstraktes (Digestionsmodell) entwickelt, das erlaubt, die Schadstoffmobilisierung in den verschiedenen Teilabschnitten (Speichel, Magen, Darm) zu untersuchen. Diese drei verschiedenen Stufen besitzen im Modell nicht nur den spezifischen pH-Wert, sondern auch die charakteristischen Elektrolyt-, Schleimsubstanz- und Enzymkonzentrationen.

Vergleichend wurde entsprechend der DIN EN 71-3 ausschließlich mit 0,07 M Salzsäure extrahiert.

An Wachsmalstiften und abgebandenen Klebstoffen wurde beispielhaft die Schadstoffmobilisierung, Bioverfügbarkeit und die toxische Kombinationswirkung der solubilisierbaren Komponenten durch zellbiologisches Screening mit etablierten Zelllinien (Nieren- und Leberzellen; A-498 und *Chang Liver*) untersucht.

Die Ergebnisse zeigen, dass in allen drei Stufen des Digestionsmodells keine Schadstoffmobilisierung stattfindet oder bioverfügbare und akuttoxisch wirkende Substanzen extrahiert werden. Dies gilt ebenfalls für die Verwendung von 0,07 M Salzsäure als Extraktionsmedium. Die

dreitägige Inkubation der Zellen beider Zelllinien ergab mit allen getesteten Extrakten keine signifikante Verminderung der Zellvitalität oder Wachstumsrate im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollkulturen. Obwohl in diesen beiden Beispielen kein Unterschied zwischen den Ergebnissen des Digestionsmodells und der Salzsäureextraktion festgestellt werden konnte, ist die Durchführung der Untersuchungen zur Schadstoffmobilisierung, Bioverfügbarkeit und toxischen Kombinationswirkung in einem zellbiologischen Modell eine sinnvolle Ergänzung zu der vorgeschriebenen DIN EN 71-3 und hilft, die Anwendersicherheit bei den verschiedensten Produkten zu erhöhen.

Poster

[Dust in dental laboratories: risk assessment by cell biological screening of its toxic potential]

Staubbelastungen im zahntechnischen Labor: Abschätzung des gesundheitlichen Risikos durch zellbiologisches Screening des toxischen Potenzials

Peter C. Dartsch¹, Klaus Drysch², Ursula Kleinteich³ und Kurt Zubler⁴

¹Institut für zellbiologische Testsysteme (IZT), Dartsch Scientific GmbH, D-Horb, ²Institut für Arbeits- und Sozialmedizin der Universität, D-Tübingen, ³Institut für angewandte Forschung (iaf), FH Heilbronn, D-Heilbronn,

⁴Zubler Gerätebau GmbH, D-Ulm-Jungingen

E-Mail: dartsch-scientific@t-online.de

Im zahntechnischen Labor werden bei der mechanischen Bearbeitung von Metallen, Legierungen, Mineralstoffen, Sinterkeramiken, Gips, Einbettmassen und Kunststoffen komplexe Gemische gesundheitsgefährdender Stäube freigesetzt. Ziel dieser Studie war, das Gefährdungspotenzial verschiedener Mischstaubproben, die aus dem Partikelabscheider der Absauganlage gewonnen wurden, durch ein zellbiologisches Screening zu untersuchen und eine Abschätzung des gesundheitlichen Risikos vorzunehmen.

Es wurden fünf Mischstaubproben untersucht: (1) Strahlsand kontaminiert mit Einbettmasse; (2) Nicht-Edelmetall/Edelmetall/Kunststoff; (3) Edelmetall/Keramik; (4) Nicht-Edelmetall und (5) Mischstaubprobe aus der zentralen

Absauganlage. Die Extraktion der Proben (1 g Testsubstanz auf 5 ml Extraktionsvolumen) erfolgte für 24 h bei 37°C mit Kulturmedium (pH 7,4), synthetischer saurer Schweißlösung nach EN ISO 105-E04 (pH 5,5) zur Simulation der dermalen Belastung, und Speichellersatzlösung nach ISO 10271 (pH 2,3) zur Simulation der oralen Aufnahme. In Anlehnung an DIN EN 10993-5 wurden Fibroblasten der Zelllinie L-929 drei Tage mit den steriltfiltrierten Extrakten in den Verdünnungen 1:5 bis 1:40 inkubiert. Die Bestimmung der Zellvitalität bzw. Wachstumsrate erfolgte durch Zellzählung.

Alle untersuchten Mischstaubproben zeigten eine dosis- und pH-abhängige toxische Wirkung. Der Vergleich der ED₅₀, d.h. der Konzentration, die zu

einem 50%-igen Verlust der Zellvitalität führt, ergab folgende Reihenfolge der Zytotoxizität: (2)>>(5)>(3)>(4)>(1). Damit ist das gesundheitliche Risiko bei einem universellen zahntechnischen Arbeitsplatz mit Abstand am größten.

In die Mundhöhle von Patienten eingesetzte Dentalmaterialien werden einem Test auf Biokompatibilität unterzogen. Hingegen wird die Gefährdung des zahntechnischen Personals durch die bei der Bearbeitung von dentalen Werkstoffen freigesetzten feinsten Staubpartikel in der Regel vernachlässigt. Aufgrund der komplexen Stoffgemische in zahntechnischen Labors sind gesetzliche Staubgrenzwerte nur bedingt anwendbar, da sie nur für reine Einzelsubstanzen gelten und toxische



Kombinationseffekte nicht berücksichtigen. Dagegen erlaubt es ein zellbiologisches Screening mit einem entsprechend konfigurierten Testverfahren,

die Gesamtoxität aller vorhandenen Einzelsubstanzen zu bewerten und zu dokumentieren. Aus diesen Untersuchungen geht auch hervor, dass eine

effiziente und regelmäßig gewartete Absaugeinrichtung im zahntechnischen Laborbereich dringend erforderlich ist.

Poster

***Caenorhabditis elegans* as pre-screening model to test toxicity of pharmaceutical compounds**

Marlene Dengg

A-Vienna

e-mail: denggmarlene@aon.at

The roundworm *C. elegans* is widely used for genetic studies. In addition, some publications describe its use as living biomonitor in ecotoxicology. We were interested to test its suitability as a pre-screening model to assess toxicity of pharmaceutical compounds. Advantages of *C. elegans* are: it can be handled easily, is inexpensive, reproduces fast, and has a high progeny. We used the epithelial growth factor receptor (EGFR) inhibitors BIBU1361, faldinamol and the inactive analogue BIBU1476. For these compounds rodent toxicity data were available.

Two parameters were used to determine toxicity: 1) lethality induced by the compounds, 2) stress response after exposure to compounds. The stress responses were studied in the transgenic strain PC72 which carries a lacZ/hsp-16 construct. Stress induces hsp-16 induction leading to β -galactosidase expression which can be visualised by histochemical staining with X-Gal.

We found the following rank order for lethality: BIBU1361 > faldinamol >> BIBU1476. A similar ranking was obtained for the induction of β -galactosidase

in PC72. The induction of β -galactosidase was concentration dependent for each compound. Our data demonstrate that the compounds induced hsp16-mediated stress responses and lethality in *C. elegans*. The toxic potencies of the compounds were similar as observed in rodent toxicity studies. Therefore *C. elegans* and its transgenic strain PC72 may be suitable as a fast and simple pre-screening model for toxicity. This approach may allow a more rational choice of compounds for pre-clinical development and therefore a reduction of animal tests.

Vortrag/Lecture

[Short tandem repeat (STR) DNA typing as an international reference technique for human cell lines]

Short tandem repeat (STR) DNA Typisierung als internationale Referenztechnik für humane Zelllinien

Wilhelm Dirks, Silke Fähnrich, Isabelle Estella und Hans G. Drexler

DSMZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, D-Braunschweig

E-Mail: WDI@DSMZ.de

Humane Zelllinien sind heute fester Bestandteil in den Laboratorien der biotechnologischen und biomedizinischen Forschung. Ein signifikanter Teil von Ergebnissen dieser Forschung kann sich als irreführend herausstellen, wenn Zellen nicht (mehr) ihrer ursprünglichen Herkunft entsprechen. Diese Kreuzkontamination von Zellkulturen ist ein chronisches und nach wie vor unterschätztes Problem in Forschung und Wissenschaft.

Verschiedene Techniken zur Bestimmung des genetischen Fingerabdrucks wurden Anfang der 90er Jahre eingesetzt, um die Identität und Authentizität von

Zelllinien zu überprüfen. Jüngste Studien haben ergeben, dass der Prozentsatz humaner Zelllinien, die während des Etablierungsprozesses kreuzkontaminiert wurden, mit durchschnittlich 15% unerwartet hoch ist. Um die Identität und Authentizität von humanen Zelllinien zu gewährleisten, setzt die DSMZ heute die verfeinerte Technik der sogenannten Fluoreszenz PCR Technik ein, die die Vervielfältigung von variationsreichen Orten in der Erbsubstanz ermöglicht und somit eine robuste Technik zur Qualitätsüberwachung darstellt. Die Phänomene der Mikrosatelliteninstabilität (MSI) und der

Verlust der Heterozygotität (LOH) stellen Sonderfälle in der kontinuierlichen Zellkultur dar, die ausführlich geschildert werden. Mit Hilfe der Oberflächenanalysen von Zellen und insbesondere durch cytogenetische Analysen der Chromosomen bestehen innerhalb der DSMZ weitere technische Möglichkeiten, die zur Identitätsfindung einer Zelllinie beitragen können. Abschließend werden Maßnahmen und Verhaltensregeln vorgestellt, die einer Kreuzkontamination vorbeugen und erforderliche Standards in der Zellkultur einführen.



Vortrag/Lecture

Usage of autologous serum instead of Foetal Calf Serum (FCS): does it make a difference?

Claudia Eder¹, Erwin Falkner², Michael Mickel³, Günter Brand¹, Ronald Dorotka¹, Udo M. Losert² and Stefan Nehrer¹

¹Dept. of Orthopaedic Surgery, Medical University A-Vienna, ²Institute of Biomedical Research, Medical University A-Vienna,

³Ludwig Boltzmann Institute for Applied Cardiovascular Surgery, A-Vienna

e-mail: claudia.eder@meduniwien.ac.at

Most animal studies concerning tissue engineered autografts are still conducted using FCS supplemented culture media. Honestly they should be referred to as xenografts! Serum free cell culture represents an adequate alternative, but requires careful adaption of sensitive cell lines and often shows lower proliferation rates. As the usage of autologous serum has become state of the art in human tissue engineering applications, but is still uncommon in animal trials, the authors compared cell characteristics under FCS-supplemented, autologous serum supplemented or serum-free conditions using sheep primary meniscus cells.

Primary cells were cultured in DMEM/F12 supplemented with 0,05 mg/ml Ascorbic Acid, 100 U/ml Penicillin and 100 µg/ml Streptomycin and either 10% FCS, 10% autologous serum or 2% (v/v)

Insulin-Transferrin-Selenium-Supplement. Cell Proliferation and cell morphology were evaluated. Histologic characterization was performed using Alcian Blue, Azan, Safranin O and antibodies against Collagen Type I and II. After expansion in monolayer, pellets were created and DNA content and the syntheses of glycosaminoglycans were evaluated.

Cell culture was successful under all tested conditions, but morphologic appearance was clearly different. The best proliferation results could be obtained with autologous serum, followed by FCS expansion. Serum free cultured primary cells showed a slower proliferation rate, but maintained a differentiated phenotype during monolayer expansion. In contrast, FCS supplemented cultures lost their differentiated phenotype after

a couple of days. Cells maintained in autologous medium showed a more differentiated phenotype compared to FCS supplemented cultures. Glycosaminoglycan (GAG) production was highest in serum free cultured cells and lowest in FCS supplemented cultures.

The usage of autologous serum can reduce dedifferentiation phenomena in cells derived from avascular tissues during primary culture. Additionally, autologous cell culture increases proliferation rate and GAG production while evading the risk of an immunological reaction or disease transmission. Histologic appearance, proliferation rate and GAG production clearly differ under each culture condition, so that the results obtained during FCS supplemented culture can not automatically be assigned to autologous culture conditions.

Poster

The chick chorioallantoic membrane (CAM) as a testing environment for meniscus tissue engineering constructs

Claudia Eder¹, Erwin Falkner², Michael Mickel³, Günter Brand¹, Ronald Dorotka¹, Udo M. Losert² and Stefan Nehrer¹

¹Dept. of Orthopaedic Surgery, Medical University A-Vienna, ²Institute of Biomedical Research, Medical University A-Vienna,

³Ludwig Boltzmann Institute for Applied Cardiovascular Surgery, A-Vienna

e-mail: claudia.eder@meduniwien.ac.at

The HET-CAM (Hen Egg Test-Chorioallantoic Membrane) test has originally been developed for toxicity and irritation studies by the pharmaceutical industries. As an intermediate *in vivo/in vitro* system, it is not considered an animal experiment and can serve as additional source of information prior to cell-scaffold transplantation into an animal model. Biocompatibility of the scaffold material, angiogenesis, cell survival and

proliferation can be tested using *in vivo* conditions. Due to the easy access to the CAM and the rapid vessel development, the transplanted materials can be observed permanently and significant results are obtained after a couple of days. Aim of our study was to test meniscus fibrochondrocytes seeded onto a collagen membrane using the HET-CAM assay.

Sheep primary meniscus cells were isolated by collagenase digestion. Cells were

expanded in monolayer culture and seeded onto collagen scaffolds. Fertilised, special pathogen free (SPF) white leghorn eggs were supplied by cooperation with Baxter vaccine industries. The CAM was exposed and a 5x5 mm collagen scaffold seeded with 106 cells was placed on top of the CAM on the 7th breeding day. Samples were incubated for 3 days, documented and explanted for histological evaluation and SEM evaluation.

Macroscopic examination indicated a connection of the implant to the vessel system of the CAM after three days *in ova*. Various haemangiomas in the surrounding of the scaffold demonstrated an angiogenetic stimulus of the implanted biomaterial. Histological evaluation

showed the formation of numerous capillaries around the implant. The transplanted cells had survived and started with tissue formation. The newly formed tissue stained positive to Safranin O, Collagen Type I and II indicating a fibrocartilage phenotype.

The findings that transplanted meniscus fibrochondrocytes can survive *in ova* and maintain a fibrocartilage-like phenotype make the chick chorioallantoic membrane a suitable testing environment for meniscus tissue engineering.

Poster

Antibiotic supplementation of cell culture media: necessity or habit?

Claudia Eder¹, Erwin Falkner², Michael Mickel³, Günter Brand¹, Catharina Chiari¹, Udo M. Losert² and Stefan Nehrer¹

¹Dept. of Orthopaedic Surgery, Medical University A-Vienna, ²Institute of Biomedical Research, Medical University A-Vienna,

³Ludwig Boltzmann Institute for Applied Cardiovascular Surgery, A-Vienna

e-mail: claudia.eder@meduniwien.ac.at

Antibiotic supplementation is state of the art in cell culture routine for research and clinical applications. Usually Penicillin, Streptomycin or Gentamycin are applied in combination with Amphotericin B or other fungicidal substances to avoid contamination of cultures. The routine application of antibiotics carries several disadvantages: Besides of the induction of tolerance due to insufficient dosage or incorrect waste disposal and the possibility of side effects/allergic reactions if cell transplantation is performed, the antiproliferative effect on ALL living cells should be taken into account. Aim of the presented study is to test the suitability of antibiotic/fungicide free cell culture in a routine (non GMP) research lab.

Adult sheep meniscus cells, lamb meniscus, mesenchymal stem cells, chondrocytes and synovial fibroblasts were obtained from cadavers. Tissue was

decontaminated prior to cell isolation. Freshly isolated cells were cultured in DMEM-F/12 either supplemented with 10% FCS and 0,05 mg/ml Ascorbic Acid or serum free using 2% ITS (v/v) and Ascorbic Acid as a supplement. Adult sheep meniscus cells cultured in medium additionally supplemented with 100 U/ml Penicillin and 100 µg/ml Streptomycin were used as control. Morphologic features and the influence of antibiotic omission on cell proliferation, cell attachment and cell viability were evaluated and mycoplasma testings were performed regularly.

Cells could be maintained antibiotic free for more than 6 month without contamination within the lab. Bacterial contamination occurred only after transport to another lab due to leakage of culture vessels (well plates). No fungal contamination occurred and routine mycoplas-

ma screening was negative. Population doubling time of serum free cultures decreased from 72 hours to 19,6 hours after omission of antibiotics and cell attachment and cell viability were markedly improved. While cells tended to grow in monolayer during antibiotic supplementation and showed rapid dedifferentiation, cultures maintained antibiotic free preferred a three dimensional proliferation and expressed typical differentiation markers even at higher passages.

Antibiotic free culture of primary cells is possible even under non GMP conditions. The advantages of improved cell proliferation and morphologic features as well as cost reduction and the avoidance of side effects should motivate to critically assess whether prophylactic antibiotic supplementation of cell culture media is really necessary in the individual situation.



Vortrag/Lecture

[Application of a human hepatoma cell line (HepG2) as an alternative to laboratory animal testing in genetical toxicology]

Einsatz einer humanen Leberzelllinie (HepG2) als Alternative zu Tierexperimenten in der genetischen Toxikologie

Veronika A. Ehrlich¹, Bernhard J. Majer¹, Maria Uhl¹, Firouz Darroudi², Volker Mersch-Sundermann³, Sylvie Rabot⁴, Wolfgang Huber¹ und Siegfried Knasmüller¹

¹Medizinische Universität Wien, Institut für Krebsforschung, A-Wien, ²Department of Radiation Genetics and Chemical Mutagenesis, University of Leiden, NL-Leiden, ³Institut für Toxikologie und Ökotoxikologie, Universität D-Trier,

⁴Institut National de la Recherche Agronomique, Unité d'Ecologie et de Physiologie du Système Digestif, F-Jouy-en-Josas
E-Mail: veronika.ehrlich@meduniwien.ac.at

Gentoxische Substanzen wirken krebsauslösend und führen zu Erbkrankheiten sowie reduzierter Fertilität. Daher werden Chemikalien (Pharmaka, Industriechemikalien) entsprechend internationalen Richtlinien (OECD) routinemäßig auf DNA-schädigende Eigenschaften hin untersucht. Hauptproblem derzeit verwendeter *in vitro* Testverfahren ist, dass den Indikatorzellen Enzyme fehlen, die die Ausgangssubstanzen zu DNA-reaktiven Metaboliten umwandeln bzw. deren Entgiftung katalysieren. Aus diesem Grund werden mit einer Reihe von Substanzen falsch positive oder negative Resultate erhalten, sodass Tierversuche erforderlich sind. Im Rahmen eines EU Projektes (HEPADNA) wurde am Institut für Krebsforschung eine humane Leberzelllinie auf ihre Eignung hin untersucht, DNA-reaktive Kanzerogene zu detektieren. Die wichtigsten Ergebnisse unserer bisherigen Forschungen sind: Die Zellen besitzen eine Vielzahl wichtiger Fremdstoff-metabolisierender

Enzyme (Phase I und Phase II Enzyme), die an der Verstoffwechslung DNA-reaktiver Kanzerogene beteiligt sind. Sie weisen in qualitativer Hinsicht ein den primären humanen Leberzellen ähnliches Enzymmuster auf. Die Effekte von Vertretern aller derzeit bekannten Klassen von gentoxischen Kanzerogenen, wie Nitrosamine, polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, heterozyklische aromatische Amine, alkylierende Agenzien und Aflatoxine, können mit dieser Zelllinie detektiert werden. Mit „Problemsubstanzen“, d.h. Verbindungen, mit denen in herkömmlichen *in vitro* Tests falsch negative Ergebnisse erhalten werden, die jedoch in Tierexperimenten DNA-Schäden und Krebs auslösen, werden in Experimenten mit HepG2 Zellen positive Ergebnisse erhalten. Typische Beispiele sind Pyrrolizidinalkaloide, Pestizide (Hexamethylphosphoramid), Gewürzinhaltstoffe (Safrol), Mykotoxine (Fumonisin B1, Ochratoxin A) und kanzerogene Schwermetalle (As, Cd).

Mit Tamoxifen (ein Hormonantagonist) werden im Tierexperiment falsch positive Resultate erhalten (diese Substanz löst im Menschen nicht Leberkrebs aus); auch in HepG2 Zellen wurden keine Effekte gefunden. Bei Tests mit strukturellen Analoga (Pyren-Benzo(a)pyren, 2AAF-4AAF) in HepG2 Zellen ergeben nur solche positive Resultate, die *in vivo* DNA-reaktiv und kanzerogen wirken. Eine derartige Unterscheidung ist mit konventionellen *in vitro* Tests nicht möglich. Anhand von Gentoxizitätstests werden auch DNA-schützende Substanzen (z.B. sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe), die die Auslösung von Krebs verhindern, identifiziert. Wir konnten nachweisen, dass detoxifizierend wirkende Enzyme in HepG2 Zellen in induzierbarer Form vorliegen. Auch co-mutagene Substanzen (Moschusketon) können in HepG2 Zellen detektiert werden. Gentoxizitätstests mit HepG2 Zellen stellen derzeit das vielversprechendste Alternativmodell zu Mutagenitätstests mit Tieren dar.

Poster

Replacement of sera for cell culture purposes: a survey with up to date product guide 2004

Erwin Falkner¹, Harald Schöffl², Helmut Appl², Claudia Eder³, Karin Macfelda¹, Udo M. Losert² and Walter Pfaller²

¹ IBF-Institute for Biomedical Research, Medical University of Vienna, A-Vienna, ²ZET-Center for Replacement- and Complementary Methods to Animal Testing, A-Linz

e-mail: erwin.falkner@meduniwien.ac.at

Introduction: Aim of our work was an up to date study on aspects of animal serum usage for cell cultivation tasks and alter-

native approaches of nutrition medium supplementation. The final report including regularly updated guide on products

in the field should support researchers in making their best choices for specific *in vitro* studies.

Material and methods: Data sheets, product descriptions, cell culture manuals and published papers on the subject were gathered/analysed by literature survey and contacting scientists working in the field at universities and industry research centers.

Results: A growing number of alternatives exists for cell lines and primary cultures derived from a broad range of tissues: e.g. chemically defined media,

complementation of non-serum origin, non-animal derived proteins and also optimised sampling/processing protocols and production systems/bioreactors for serum-free usage of all scales. A literature search structured for cell type/field of application was performed and paper abstract/citation-shortcuts were collected. The final document including the newly updated product guide 01/2004 is available at <http://www.zet.or.at> resp.

<http://www.cellculture.at>. Further updates, regularly every 6 months, are planned.

Discussion: In recent years various easily available alternatives to animal sera have been reported and are on sale. For optimal cell performance *in vitro*, to limit costs and, last but not least, following animal welfare considerations, the authors advise the gathering of exact information to make qualified choices possible.

Poster

Modification of the chorionallantoic membran (CAM) test system: data interpretation at incubation day 10

Erwin Falkner¹, Claudia Eder³, Helmut Appl², Barbara Kapeller¹, Karin Macfelda¹, Udo M. Losert¹, Walter Pfaller² and Harald Schöffl²

¹IBF-Institute for Biomedical Research, Medical University of Vienna, A-Vienna, ²ZET-Center for Replacement- and Complementary Methods to Animal Testing, A-Linz, ³Department of Orthopaedic Surgery, AKH, A-Vienna
e-mail: erwin.falkner@meduniwien.ac.at

Introduction: The CAM angiogenesis test system, originally conceived as an alternative method for toxicity and irritation studies, has for some time been suggested to have potential for tissue engineering tasks, biocompatibility testing and also as a cell transplantation model. Published reports show that in most of these cases incubation of the eggs was performed for up to 15 days. This time-point is long past neural tube fusion at about day 11, resulting in the possibility of embryo pain conduction. Therefore rating of such tests as proper

animal tests has been discussed previously. The aim of the presented study was to investigate the feasibility of altering existing CAM-test protocols by terminating experiments at incubation day 10 to achieve satisfactory data quality while following animal welfare considerations.

Material and methods: An example of published testing schemes of biomaterial testing and hetero/autologous cell transplantation approaches using the CAM onset of angiogenesis assay was performed but terminated at day 10. Histo-

logical/electromicroscopical analysis was conducted.

Results: The authors believe the resulting data matched that of the original experiments regarding quality and reproducibility sufficiently, proving that the shorter observation time is sufficient.

Discussion: The CAM-angiogenesis-assay can also be used for innovative experiments in the field of biomedical engineering, even with a total duration of only 10 days. Thus its quality as an alternative method to animal testing remains intact without undue loss or result quality.

Vortrag/Lecture

[Standardisation of human whole blood for *in vitro* applications by cryoconservation: optimisation of the *in vitro* Pyrogen Test (IPT) as an alternative to the rabbit experiment]

Standardisierung von humanem Blut für *in vitro* Applikationen mittels Kryokonservierung: Optimierung des *in vitro* Pyrogentests (IPT) als Alternative zum Kaninchentest

Stefan Fennrich, Stefanie Schindler, Ilona Kindinger, Silvia Asmus und Thomas Hartung

Biochemische Pharmakologie der Universität D-Konstanz

E-Mail: stefan.fennrich@uni-konstanz.de

Humanes Vollblut hat *in vitro* zunehmende Bedeutung, um Immunfunktionen oder pyrogene Kontaminationen zu testen.

Die Vorteile der einfachen Verfügbarkeit eines physiologischen Zellmaterials hat zentrale Bedeutung. Die Handhabung ist

durch Abnahme von frisch gewonnenem Blut, potenzielle Infektiosität des Spenders oder individuelle Variabilität oft



limitiert. Um diese Einschränkungen zu lösen, wurde ein Verfahren entwickelt, um Blut kryokonserviert in vorgetesteter und zertifizierter Form verfügbar zu machen. Das Verfahren ermöglicht ein direktes Auftauen ohne aufwändige Waschschriffe. Mittels FACS-Analyse wurde nachgewiesen, dass dabei die mononukleären Zellen intakt bleiben; nach Induktion mit verschiedenen immunologischen Stimuli werden Zytokine

ausgeschüttet. Im Vergleich zu Frischblut werden im Gegensatz zu IL-6 z.B. höhere Mengen an Interleukin-1 β (IL-1 β) freigesetzt. Eine mögliche Ursache ist die Anwesenheit des Kryoprotektivs DMSO (Dimethylsulfoxid). Es können größere Mengen kryokonserviertes Blut hergestellt werden, indem das Blut von mehreren Spendern unabhängig von der Blutgruppe gepoolt wird.

Das Detektionslimit des WHO-Endo-

toxin-Standards (EC-6) liegt für die Ausschüttung von IL-1 β bei 0,5 EU/ml. In der Europäischen Pharmakopoe festgelegte Endotoxin-Grenz-Konzentrationen werden damit mit kryokonserviertem Blut im In vitro Pyrogentest (IPT) erkannt. Für spezielle Pharmaka (z.B. ölige Arzneien) konnte sogar ein Vorteil des kryokonservierten Blutes gegenüber frisch gewonnenem Blut gezeigt werden.

Vortrag/Lecture

Determination of hormonal activities of environmental chemicals *in vitro*

Karl Fent¹ and Petra Kunz²

¹University of Applied Sciences Basel, Institute of Environmental Technology, CH-Muttenz and Swiss Federal Institute of Technology (ETH), Department of Environmental Science, CH-Zurich, ²Institute of Limnology, University of CH-Zurich
e-mail: karl.fent@bluewin.ch

Chemicals having hormonal activities enter aquatic ecosystems either directly or via wastewater. Currently, about 150 different compounds have been demonstrated to exhibit hormonal activity *in vitro* and *in vivo*. Chemicals in wastewater are an important source resulting in estrogenic effects in fish. Estrogenic effects may both occur during the embryonic life stage when sex development takes place, and in the adult life stage. Fish may develop intersex gonads during embryonic exposure or even sex change when exposed to estrogenic compounds during the sensible period. In addition, induction of the yolk precursor protein, vitellogenin, is taking place in juvenile and male fish.

Whereas *in vivo* exposure experiments are common tools for assessing hormon-

al effects, *in vitro* systems are not yet fully recognised as important. However, fast, economic and meaningful *in vitro* systems are highly needed for the assessment of a large number of chemicals to be analysed for hormonal activity, and *in vitro* systems may play an important role in the initial screening. Here, two *in vitro* systems are presented for assessment of estrogenic environmental chemicals, a reporter gene system based on transfection of fish cell lines (RTG-2), and a recombinant yeast reporter gene system (YES). With both systems, estrogenic compounds are reliably determined and both are applied for the assessment of pure compounds and environmental samples. The YES is particularly useful as it is easy to use and provides reproducible results.

A case study is presented on UV absorbing organic compounds (UV filters), which are very persistent and lipophilic, leading to contamination of surface waters and bioaccumulation. Our results indicate that many UV filters exhibit estrogenic activity, and others are anti-estrogenic. Combinations of 2 UV filters in mixtures show both synergistic and antagonistic interactions, and all follow the model of concentration addition. These results clearly indicate that UV filters possess hormonal activities *in vitro*. The use of *in vitro* systems is concluded to be very important in the first assessment of hormonal activities of chemicals and in the determination of their interactions in mixtures.

Poster

Cell-growth promoting material isolated from sheep's blood clot

Bratko Filipič¹, Srećko Sladoljev², Ferenc Somogyvari³, Sandor Toth⁴, Eva Ružić-Sabljić¹ and Srećko Koren¹

¹Institute of Microbiology and Immunology, Medical Faculty, SLO-Ljubljana, ²Institute of Immunology, CRO-Zagreb, ³Institute of Clinical Microbiology, Medical Faculty, University of Szeged, H-Szeged, ⁴Bekes County Hospital, Blood transfusion unit, H-Oroshaza
e-mail: A_Stanonik@yahoo.com

A natural blood clot contains 95% red blood cells, 5% platelets, less than 1% white blood cells, and numerous amounts of fibrin strands. A PRP blood clot contains 4% red blood cells, 95% platelets, and 1% white blood cells. Since 1990, medical science has recognised several components in blood, which are part of the natural healing process and if added to wounded tissues or surgical sites, they have the potential to accelerate healing controls. It has also shown to increase the density of the bone formed by 19 to 25% when measured at 4 months and 6 months. The specific components of PRP are Platelet Derived Growth Factors (PDGF) and Transforming Growth Factors b. Both of these are contained in the alpha granules of platelets. Fibronectin and vitronectin are also components of PRP. They are cell

adhesion molecules found in plasma and fibrin itself.

The experiments presented herein, were aimed to isolate, characterise and to test *in vitro* on different cell cultures the material from sheep's blood clot. Sheep's blood was collected and allowed to clot. Afterward the whole content was centrifuged at 2500 RPM for 20 minutes, and supernatant was aspirated off. The sediment ("clot") was quickly washed with the sterile PBS pH=5.8 for 10 minutes, and centrifuged for 25 minutes at 2500 RPM for 25 minutes. The supernatant (Fraction I) was collected and frozen. To the "clot" the PBS pH=7.2 was added and left for 1 hour. After the centrifugation of the supernatant at 2500 RPM for 25 minutes the Fraction II was collected. To the "clot" the PBS pH=7.2 was then added for 18 hours

(Fraction III) and for 5 days (Fraction IV). All the fractions were sterilised by 0.2 filtration. The content of the fractions was analysed by PAG-SDS and IEF.

The cell growth promoting activity of different fractions in comparison to the SR-2.055P (Serum replacement) was tested on the: Chicken embryonal fibroblasts, WISH, HAC-3/T2 (Human amniotic cell lines), Caco (Colon carcinoma cell line), PLA-2 (Adult pig kidney cell line), IPEC-T2 (Porcine intestinal cell line) and WiREF (Wistar rat embryonal fibroblastoid cell line). For the mentioned cells/cell lines the active fractions were II, III and IV. Fraction I was toxic. The optimal content of fractions was from 5-10% in Eagle's medium. In this range up to 90% of SR-2.055P could be obtained.

Poster

[Cryopreservation of cells cultered in serum free media: first results with chemically fully defined freezing media]

Kryokonservierung von serumfrei kultivierten Zelllinien: Erste Erfahrungen mit verschiedenen chemisch definierten Konservierungsmedien

René W. Fischer¹, Anaida Osoria Perez², Yanela Gonzalez Hernandez², Ferruccio Messi³, Susanne Scheiwiller⁴ und Franz P. Gruber⁴

¹ETH CH-Zürich, ²Centro de Investigaciones Biomedicas, CU-La Habana, ³Messi Cell Culture Technologies, CH-Zürich, ⁴FFVFF, CH-Zürich
E-Mail: rene.fischer@org.chem.ethz.ch

Bei der Durchführung des Projekts „Welche Zellen können in definiertem synthetischen Medium kultiviert werden?“ haben wir festgestellt, dass bei der Kryokonservierung von Säugerzellen viele verschiedene Protokolle ihre An-

wendung finden. Eine Vielzahl davon verwenden FBS (*Fetal Bovine Serum*) oder Gemische mit Substanzen tierischen Ursprungs als Einfriermedium.

Es macht wenig Sinn, erfolgreich an ein chemisch definiertes Medium adap-

tierte Zellen mit undefinierten Zusätzen zu versetzen, um sie einzufrieren und konservieren zu können.

In der Literatur (Lakey, 2001) findet man denn auch Rezepturen für chemisch definierte Einfriermedien frei von tieri-



schen Komponenten. „Hypothermosol“ ist ein beschriebenes Medium, welches auch kommerziell erhältlich ist (*BioLife Solutions, USA*). Im veröffentlichten Rezept findet man allerdings auch (absichtlich?) versteckte Fehler. Nachdem wir die nötigen Korrekturen vorgenommen und die Osmolarität überprüft haben, verglichen wir dieses Hypothermo-

sol mit den häufig angewendeten Medien wie: 90% FBS, 10% DMSO; 45% konditioniertes Medium, 45% frisches Medium und 10% DMSO. Als Testzellen verwendeten wir Hybridoma Zellen, welche in chemisch definiertem Medium Turbodoma HP-1 (*Messi Cell Culture Technologies, Schweiz*) kultiviert wurden. Untersuchte Parameter sind: Vitalität der

Zellen vor und nach dem Einfrieren sowie das Anwachverhalten nach dem Auftauen. Das Poster beschreibt erste Resultate.

Lahey, J. R., Rajotte, R. V., Fedorow, C. A. and Taylor, M. J. (2001). Islet cryopreservation using intracellular preservation solutions. *Cell Transplantation* 10, 583-589.

Poster

Serum replacement in the culture medium of the embryonic stem cell test (EST)

Burkhard Flick and Stephan Klug

Institute of Clinical Pharmacology and Toxicology, Dept. of Toxicology, Charité – University Medicine, D-Berlin
e-mail: burkhard.flick@charite.de

According to the INVITTOX Protocol Nr. 113, which is used for the EST, the culture of ESC is performed with a culture medium containing 20.0% fetal bovine serum (FBS). In order to optimise this protocol we aimed to establish a serum-reduced or even serum-free culture medium which supports proliferation and differentiation of the ESC. This modification would lead to the following benefits: (1) exclusion of serum-charged variability, (2) no interference of unknown serum components with the test substances and (3) possibility to evaluate hormone-like compounds without a background level of hormones.

The influences of cell culture supplements were investigated individually and in combination. Hereby, the serum concentration was reduced stepwise and

growth factors, proteins, carbohydrates, lipids, amino acids, vitamins, trace elements, antioxidants and buffers were added to the culture medium in different combinations. The different serum reduced and serum free culture media were tested in comparison to the control using the standard culture medium with 20.0% FBS in the proliferation and differentiation assay of the EST described in the INVITTOX protocol Nr. 113.

A basic culture medium composed of Iscove's modified Dulbecco's medium supplemented with bovine serum albumin, fetuin, chemical defined lipid concentrate, transferrin, insulin, epidermal growth factor, bone morphogenetic protein-2, basic fibroblast growth factor and a complex mixture of trace elements allows one to reduce the serum content

down to 0.5% in the culture medium. This modified medium allowed consistently reproducible results for the proliferation and differentiation of ESC into cardiomyocytes comparable to control. A serum-free culture medium exhibited reproducible results in the differentiation comparable with control; however, the growth rate of the cells and reproducibility in the proliferation assay still requires improvement.

So far, complex mixture of supplements can almost replace the serum in the culture medium of the EST. The culture medium containing only 0.5% serum may significantly increase the level of standardisation of the test and expands the applicability of the EST to test hormone-like compounds.

Vortrag/Lecture

A new *in vitro* method for testing developmental neurotoxicity

Ellen Fritsche, Michaela Moors, Jason E. Cline and Josef Abel

Institut für umweltmedizinische Forschung GmbH, D-Düsseldorf
e-mail: ellen.fritsche@uni-duesseldorf.de

It is a common opinion that there is a need for *in vitro* models for testing developmental neurotoxicity. Therefore, we established a human cell culture model that consists of normal human neural progenitor cells (NHNP cells) and allows

us to study the impact of chemicals on neural development. NHNP cells grow as neurospheres and can be kept in culture for several months. Upon growthfactor withdrawal they differentiate into neurons, astrocytes and oligodendrocytes.

Furthermore, they express a variety of genes involved in drug metabolism. Thus, this cell system seems to be an excellent model to study influences of chemicals on differentiation of these cells.

Epidemiological evidence has been brought that polychlorinated biphenyls (PCBs) disturb brain development in children. Therefore, our goal was to investigate the mechanisms leading to disturbance of human brain development in our human *in vitro* model. Because of the suspicion that disruption of the thyroid hormone system is involved in the impairment of intellectual development by PCBs and because timing of oligodendrocyte development seems to be dependent on thyroid hormone, we

investigated the occurrence of oligodendrocytes during differentiation of NHNP cells. Therefore, undifferentiated neurospheres were treated with T3 for one week. After two further days of differentiation, we found a significant increase in the number of oligodendrocytes formed. Treating neurospheres with PCB118 also lead to an increase in oligodendrocyte formation, while PCB126 had no effect. We could identify that PCB118 disrupts the thyroid hormone system by co-treating the cells with PCB118 or T3 and

the thyroid hormone receptor antagonist NH-3 and thereby antagonise the development of oligodendrocytes. Thus, we observed a congener-specific thyroid hormone-like effect of PCBs in NHNP cells.

We are the first ones who have established an *in vitro* system from primary human cells for studying the influence of endocrine disrupting chemicals of the thyroid hormone system on neural development.

Vortrag/Lecture

[Replacement of experiments on vertebrates in regulatory ecotoxicology]

Ersatz von Wirbeltierversuchen in der regulatorischen Ökotoxikologie

Andreas Gies

Umweltbundesamt, Institut für Risikobeurteilung, D-Berlin

E-Mail: andreas.gies@uba.de

Der Ersatz von Wirbeltierversuchen gehört auch bei der ökotoxikologischen Chemikalienprüfung zu den Prioritäten. Besonders angesichts der aktuellen Reorganisation des europäischen Chemikalienrechts (REACH-System) gewinnt dieses Ziel weiter an Bedeutung. Der unbestrittene Zweck von Chemikalienprüfungen in der regulatorischen Ökotoxikologie ist die Bereitstellung von Daten über die möglichen Wirkungen dieser Stoffe auf Umweltorganismen. Nur mit ausreichenden Daten hierzu lassen sich aussagekräftige Risikobewertungen erstellen, die ihrerseits sinnvolle und effiziente Maßnahmen zum Schutz vor unakzeptablen Chemikalienrisiken für Umwelt und Gesundheit begründen. Das neue europäische REACH-System ist darauf ausgelegt, die gegenwärtigen Datenlücken zu schließen, die noch besonders Abbaubarkeit, Anreicherung und Wirkungen vieler Stoffe betreffen.

In der Ökotoxikologie sind als Wirbeltierversuche vor allem Tests mit

Fischen verbreitet. Ihren Ersatz verfolgen alle Beteiligten auf mehreren parallelen Wegen. So bemüht sich das Umweltbundesamt im OECD-Prüfrichtlinienprogramm um internationale Akzeptanz für einen Fischei/Embryotest als Alternative zum akuten Fischtest nach OECD Test *Guideline* 203. Gleichzeitig sollen moderne Prüfstrategien möglichst maßgeschneidert anstreben, vorhandene Testdaten und andere stoffspezifische Informationen (wie z.B. aus geeigneten QSAR-Modellen abgeleitete Erkenntnisse) maximal zu nutzen, um die Notwendigkeit von Tests mit Wirbeltieren zu minimieren. Dies gilt auf der einen Seite für eine große Zahl von Stoffen, zu denen noch grundlegende Daten fehlen und bei denen es darauf ankommt, diese essenziellen Stoffinformationen nur dort mit Wirbeltierversuchen zu generieren, wo andere Daten und alternative Testmethoden für den nötigen Basisdatensatz nicht ausreichen. Auf der anderen Seite gibt es

eine überschaubarere Zahl von Stoffen, zu denen bereits vorliegende vorläufige Informationen Besorgnisse begründen, zum Beispiel Hinweise auf endokrine Wirkungen. Hier kommt es darauf an, die für eine abschließende Risikobewertung notwendigen Informationen fallspezifisch und möglichst genau zu benennen, um aufwändige Studien wie *Full Life-Cycle* Tests auf das absolut notwendige Mindestmaß zu beschränken und ihre maximale Aussagekraft für die Risikobewertung sicherzustellen.

In den nächsten Jahren bleibt es eine der großen Herausforderungen im Tagesgeschäft der regulatorischen Ökotoxikologie, gleichzeitig 1) den Ersatz von Wirbeltierversuchen auszuweiten, 2) fehlende Stoffinformationen schnell und wirtschaftlich zu erzeugen sowie 3) Umwelt und Gesundheit auf der Basis adäquater Daten wirksam zu schützen.



Vortrag/Lecture

[Indexing of scientific information on alternative methods to animal experiments]

Indexierung biowissenschaftlicher Informationen zu Alternativmethoden

Barbara Grune¹, Antje Dörendahl¹, Dorothea Köhler-Hahn¹, Céline Feuerstein², Rainer Box und Horst Spielmann¹

¹Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch (ZEBET), Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), D-Berlin, ²Fachhochschule Potsdam, Fachbereich Informationswissenschaften, D-Potsdam
E-Mail: grune.zebet@bfr.bund.de

Die Europäische Tierschutzgesetzgebung (EU Richtlinie 86/609/EWG), die in das nationale Recht aller EU-Mitgliedsstaaten überführt wurde, fordert die Prüfung der Unerlässlichkeit von Tierversuchsvorhaben. Ein Tierversuch darf demnach nicht durchgeführt werden, wenn der verfolgte Zweck eines geplanten Versuchs durch andere Methoden oder Verfahren als den Tierversuch erreicht werden kann. Alle Wissenschaftler sind deshalb verpflichtet, zur Vorbereitung eines Tierversuchsvorhabens Recherchen nach Informationen und Literatur zu Alternativmethoden durchzuführen. Im Internet stehen dem Wissenschaftler eine Vielzahl von Informationsquellen online zur Verfügung. Dazu gehören Literatur- und Faktendatenbanken und spezielle Webseiten für Alternativmethoden. Dennoch müssen Wissenschaftler die besten Datenbanken

auswählen und sich durch geeignete Suchstrategien Zugang zu den Informationen verschaffen. Die Anbieter von Informationen müssen neben der Qualität der Informationen auch ihre Auffindbarkeit für die Nutzer sichern. Eine gute Indexierung von Literatur mit Deskriptoren (Schlagwörtern) wird grundsätzlich als eine Voraussetzung für das Auffinden von Informationen betrachtet. Beim Indexieren wird der Inhalt eines Dokuments mit Hilfe von Schlagwörtern (Deskriptoren) gekennzeichnet, damit sie durch Suchabfragen besser gefunden werden.

In einem Sonderforschungsprojekt, gefördert durch das BfR, untersuchte ZEBET die Indexierungssysteme von 6 biomedizinischen Datenbanken hinsichtlich der Indexierung von Alternativmethoden. Es wurden in den Datenbanken MEDLINE, EMBASE, CAB

Abstract, AGRIS, AGRICOLA und AnimAlt-ZEBET Recherchen nach Alternativmethoden mit ausgewählten Suchbegriffen durchgeführt. Die verwendeten Suchbegriffe wurden den Thesauri bzw. Schlagwortlisten der jeweiligen Datenbank entnommen. Dazu gehörten allgemeine Begriffe wie „*Animal Testing Alternatives*“ und spezielle Begriffe für Alternativmethoden wie „*Limulus Amebocyte Lysate Test*“.

Die Auswertung der Ergebnisse zeigte, dass in den Thesauri der Datenbanken MEDLINE, EMBASE, CAB Abstract, AGRIS, AGRICOLA zutreffende Schlagwörter für die Indexierung von Alternativmethoden vorhanden sind, dass jedoch die Vergabe dieser Begriffe, d.h. das eigentliche Indexieren, problematisch zu sein scheint.

www.bfr.bund.de; www.fh-potsdam.de

Poster

Influenza infection of the embryonated hen's egg – an alternative model for *in vivo* evaluation of antiviral compounds

Albert Härtl¹, Andreas Sauerbrei² and Peter Wutzler²

¹Hans-Knöll Institute for Natural Products Research, D-Jena, ²Institute for Antiviral Therapy, Friedrich-Schiller University, D-Jena
e-mail: albert.haertl@hki-jena.de

The aim of the present study was to establish an influenza A virus/egg model accompanied by a high mortality rate in 2-weeks-old chick embryos. Further investigations should assess the effect of antiviral drugs on the survival of infected chick embryos. After the preparation of an artificial air chamber into the egg shell, influenza A virus was placed on

the chorioallantoic membrane of embryonated hen's eggs. When 1 EID₅₀ (50% egg infective dose) of influenza A virus was used nearly 100% of infected chick embryos did not survive the infection up to the day 8 post inoculation. The survival rate of chick embryos could be significantly increased when the antiviral drugs rimantadine, amantadine or

zanamivir were administered into the albumen immediately before or after viral inoculation. While rimantadine and amantadine were effective at relatively high doses of 12.5 mg/kg and 25 mg/kg, zanamivir showed a significant antiviral efficacy at concentrations of 2 mg/kg. After pre- and post-treatment with zanamivir, 54% to 58% of the influenza

A virus-infected chick embryos survived. The therapeutic effect of amantadine as well as the prophylactic and therapeutic effect of rimantadine was significantly lower. While the survival rate of chick

embryos was between 8% and 17% after treatment with rimantadine, between 29% and 33% of embryos survived the infection when amantadine was administered. In conclusion, the described chick

embryo model can be used for the reliable *in vivo* evaluation of potential anti-influenza inhibitors. It offers a realistic alternative in comparison to experiments with small laboratory rodents.

Poster

[Choice tests with pairs of mice: preference for nesting material, nestbox and tubes]

Wahlversuche mit paarweise gehaltenen Labormäusen zur Ermittlung der Präferenz für unterschiedliche Käfigeinrichtungen

Veronika Heizmann¹, Michael Nathaniel² und Sandra Högler³

¹Department für Naturwissenschaften, Veterinärmedizinische Universität Wien, A-Wien, ²Tierärztliche Praxis, A-Schwadorf,

³Department für Pathobiologie, Veterinärmedizinische Universität Wien, A-Wien

E-Mail: veronika.heizmann@vu-wien.ac.at

Die Forderung nach artgemäßer Ruhe-, Bewegungs- und Beschäftigungsmöglichkeit für Labortiere ist auch in der österreichischen Tierversuchsverordnung 2000 enthalten. Präferenzuntersuchungen sind geeignet, die Bedeutung verschiedener Umweltfaktoren für Labortiere zu untersuchen. Es wurden Präferenzuntersuchungen mit gruppenweise und paarweise gehaltenen Labormäusen durchgeführt. 12 juvenile weibliche, 12 juvenile männliche und 12 adulte weibliche Him:OF1 Auszuchtmäuse wurden paarweise getestet. Das Testsystem besteht aus 4 Makrolonkäfigen vom Typ III, die über Plexiglasrohre miteinander verbunden sind. Der unstrukturierte Käfig D enthielt ausschließlich Einstreu, eine Schüssel mit Pellets und eine Trinkwasserflasche, die strukturierten Testkäfige A, B und C zusätzlich Nestmaterial, Nestbox und Kartonrollen in unter-

schiedlicher Kombination. Die Verhaltensbeobachtung erfolgte mittels Videoaufzeichnung und skandierender Momentbeobachtung an 2 aufeinanderfolgenden Tagen für jeweils 2 mal 4 Stunden während der Dunkel- und Hellphase. Nachdem die Mäuse einen der Testkäfige als Nestplatz gewählt hatten (Testsituation 1), wurden in diesem Käfig die zusätzlichen Strukturen entfernt und die Tiere abermals an 2 aufeinanderfolgenden Tagen beobachtet (Testsituation 2 und 3).

In der 1. Testsituation wählten 8 adulte weibliche, 4 juvenile weibliche und 2 juvenile männliche Mäuse den Testkäfig A mit Nestmaterial, Nestbox und Kartonrolle. 8 juvenile männliche, 4 juvenile weibliche und 4 adulte weibliche Mäuse wählten den Testkäfig C mit Nestmaterial und Nestbox. 2 juvenile weibliche Mäuse wählten den Testkäfig B mit Nest-

material und Kartonrollen. In der 2. Testsituation wurden ausschließlich Käfige mit Nestbox (A oder C) gewählt, in der 3. Testsituation mit wenigen Ausnahmen der Testkäfig B. Während der Hellphase ruhten die Mäuse überwiegend gemeinsam im bevorzugten Nest. Während der Dunkelphase nutzten sie das gesamte Testsystem zur Exploration, Lokomotion, Nahrungssuche, Körperpflege und für Nestbauaktivitäten, und so gab es während der Aktivitätszeiten keine Käfigpräferenz.

Die vorliegenden Ergebnisse unterstützen die Forderung nach Nestmaterial und Versteckmöglichkeit als Mindestanforderung für Labormäuse. Um diese Forderung in die Praxis umzusetzen, müssen hygienisch und arbeitstechnisch akzeptable Lösungen gefunden werden.

Vortrag/Lecture

Potentials of '-omics' technologies in terms of replacement, reduction and/or refinement of animal experimentation

Coenraad F. M. Hendriksen, Marian Moelands and Marjolein M. F. van Boxel

Netherlands Centre Alternatives to Animal Use (NCA), Dept. Animals, Science & Society, Utrecht University, NL-Utrecht

e-mail: Coenraad.Hendriksen@nvi-vaccin.nl

Within only a few years, biomolecular engineering has become one of the most promising scientific disciplines in biomedical research, integrating ele-

ments of cell biology, molecular biology, bio-informatics and applied research. Advanced genomic and proteomic high-throughput technologies enable simultane-

ous monitoring of the expression of large numbers of individual genes and proteins, leading to a more profound mechanistic insight in (patho-) physio-



logical processes. Therefore, so-called ‘-omics’ technologies hold great opportunities in a wide range of biomedical research areas, such as for drug discovery (pharmacogenomics), vaccine development (immunogenomics) and safety assessment of chemicals (toxicogenomics). Animal welfare organisations often criticise biomolecular engineering, believing it will lead to an increase of animal use. Indeed, some technologies may initiate scientific questions that require (additional) studies using laboratory animals. However, particularly ‘-omics’ technologies have potential for the replacement, reduction and/or refinement of animal experiments, as they will allow scientific

progress while maintaining and improving our moral principles about laboratory animal use. Combining ‘-omics’ technologies with 3Rs means connecting the holistic approach of animal welfare to its opposite, the reductionist approach of studying complex organisms at gene level. Although the potential of ‘-omics’ to replace animal experimentation will not be extensive, there are many opportunities for reduction and refinement. Better general setup of animal experiments and a science-based selection of animal species will lead to more and scientifically relevant data out of fewer animals. Furthermore, ‘-omics’ technologies will lead to reduction of animal use

by means of e.g. predictive screens, early biomarkers and implementation of gonogo decisions in research strategies. Increased predictability of tests enables the application of earlier, more humane endpoints, shifts of animal tests to later stages of the drug development process, and allows the use of low, subclinical doses of the chemical/drug to be studied. Furthermore, experimental procedures can become less invasive. Until today these 3Rs potentials were hardly explored. A report will be given of the recently performed inventory study on the potentials of ‘-omics’ as a 3Rs tool.

Vortrag/Lecture

The concept of reduction of animal use in biomedical sciences

Coenraad F. M. Hendriksen and Jasmijn de Boo

Utrecht University, NL-Utrecht

e-mail: Coenraad.Hendriksen@nvi-vaccin.nl

Over time, different philosophies have affected our thinking about animals. A conceptual evolution regarding the use of animals and alternative methods is demanded by new developments in research and testing strategies. Russell and Burch first introduced the concept of the 3Rs, where reduction was defined as “reduction in the numbers of animals used to obtain information of a given amount and precision”. In surveying the statistics on animal experimentation we found that the trend in the number of animals used in

biomedical research in Europe was downwards since the early eighties, but levelled out in recent years. Scientific progress, the interplay between reduction, replacement and refinement and the ethical benefits and implications of reduction should also be taken into account when balancing the need for an animal model against the adverse consequences for laboratory animals. There is much room for improvement of experimental design, education and training in statistical methods and in refinement of procedures, harmonisation

of guidelines and new research and production strategies. Reduction may be achieved at the individual experimental level, at a higher level in which decisions are made about a series of experiments, or as a side-effect of economic or other seemingly unrelated developments. Consideration of all three levels led to our revision of the definition of reduction, which now includes any approach that leads to a reduction of the numbers of animals used, regardless of impacts on experimental precision.

Poster

Humane endpoints in biomedical research: an interactive CD ROM

Coenraad F. M. Hendriksen and Iris Boumans

Netherlands Centre Alternatives to Animal Use (NCA), Utrecht University, NL-Utrecht

e-mail: c.f.m.hendriksen@las.vet.uu.nl

The CD ROM “Humane endpoints in biomedical research” is an interactive program for educational and training purposes. A humane endpoint is a refinement alternative to animal experiments. The

goal of this CD ROM is to increase the awareness about and the implementation of humane endpoints. It is suitable for investigators, animal welfare officers, animal technicians and animal caretakers.

In order to implement “humane endpoints” researchers first need to know how to recognise normal and abnormal behaviour of mice and rats. The first part of the CD ROM contains chapters on

normal behaviour, pain and distress, and recognition of clinical signs. General clinical signs such as body weight and water intake, clinical changes related to an organ system, measurable clinical changes as body temperature and abnormal spontaneous behaviour are dealt with. For a few specific areas in biomedical research, those in which animals are often seriously suffering, an overview is given about accompanying clinical signs.

Another part of the CD ROM also contains information about pathology, which may help with the correct assessment of suffering, and with taking measurements for follow-up experiments. The last and the most important part describes the notion "humane endpoints", reasons for applying humane endpoints and an overview of parameters which can be used when applying humane endpoints. The validation of humane endpoints and

responsibilities are discussed and relevant laws, guidelines and reports are also included. The CD ROM further offers many additional images and videos. It is expected that the CD ROM becomes part of the training programme for laboratory animals science intended for researchers, animal welfare officers, animal technicians and animal caretakers in the Netherlands. The CD ROM will be translated in English later on.

Vortrag/Lecture

A reproducible co-culture model of the human distal lung barrier: 24-well-screening for pulmonary toxicology *in vitro*

Maria Iris Hermann, Sabine Fuchs, Ron E. Unger, Kirsten C. Peters and James Kirkpatrick

Institute of Pathology, Johannes Gutenberg-University, D-Mainz
e-mail: hermann@pathologie.klinik.uni-mainz.de

In order to study toxic effects on the two main cell types at the distal lung barrier, the epithelium and endothelium, we have developed a co-culture system based on a human lung cell line with characteristics of type II pneumocytes and Clara cells (NCI H441) and a human dermal microvascular endothelial cell line (ISO-HAS-1). The *in vitro* bilayer model consists of NCI H441 in co-culture with ISO-HAS-1 on opposite sides of a permeable 24-well filter plate (Polycarbonate, Costar). Co-cultures were treated with dexamethasone from day 3 of co-cultivation to generate a polarised epithelial cell monolayer. Functional barrier properties were investigated by measuring trans-bilayer electrical resistance (TER) and paracellular transport of sodium-fluorescein. Immunofluorescence of cell-cell adhesion molecules was performed using standard techniques.

In co-culture with microvascular EC (ISO-HAS-1) NCI H441 established contact inhibited monolayers, showing a continuous, circumferential immunostaining of the tight junctional protein, ZO-1 and the adherens junction protein, E-Cadherin. In addition to a contact inhibited monolayer, ISO-HAS-1 demonstrated constitutive and inducible phenotypic features most akin to primary cultivated human pulmonary microvascular endothelial cells. A phenotypically stable co-culture could be maintained for up to 14 days. Maximum reproducible TER-values of about 550 Ohm*cm² for H441/ISO-HAS-1 were found after 10 to 12 days of co-cultivation. This time period should permit examination of the effects of toxic compounds and related metabolites on barrier properties. Apical exposure to 50-500 µM CdCl₂ resulted in an increase in TER to values about 830 Ohm*cm²

during 4 h. Basolateral exposure to 500 µM CdCl₂ caused a rapid decrease in TER-value to values about 133 Ohm*cm² after 2 h and 25 Ohm*cm² after 4 h. This effect coincided with the loss of E-cadherin (NCI H441) and VE-cadherin (ISO-HAS-1) from the cell-cell contacts and a reorganisation of the actin cytoskeleton. We are currently investigating the influence of cadmium on cytokine release in co-culture.

In conclusion, our co-culture system of NCI H441 with microvascular EC should provide a suitable *in vitro* model to examine the effects of toxic compounds on the distal lung barrier. Additionally, the 24-well setup will enable multiple screening of toxic effects on both lung epithelium and microvascular endothelium, including a possible co-stimulatory impact on the bicellular system.



Vortrag/Lecture

[*In vitro* skin corrosion testing with Epidermal Skin Test 1000 (EST-1000) – a new reconstructed epidermis]

Bestimmung korrosiver Substanzen mit Epidermal Skin Test 1000 (EST-1000) – einer neuen rekonstituierten, humanen Epidermis

Jens J. Hoffmann, Eckard Heisler, Sonja Karpinski und Horst Wilhelm Fuchs

CellSystems Biotechnologie Vertrieb GmbH, D-St. Katharinen

E-Mail: jhoffmann@advancedcellsystems.com

Die Bestimmung des korrosiven oder irritativen Potenzials bestimmter Stoffe ist unverzichtbar, um den Vorschriften des Arbeitsschutzes und der Transport-sicherung gerecht zu werden. Zur Klassifizierung dieser Stoffe kommen vermehrt *in vitro* Testsysteme zum Einsatz, die zunehmend die bislang üblichen Tierversuche ersetzen sollten. In verschiedenen Validierungsstudien ist gezeigt worden, dass sich Hautmodelle sehr gut eignen, um den Einsatz von Labortieren zu minimieren. Deutliche Vorteile bietet dieser Ansatz aufgrund der größeren Reproduzierbarkeit der Ergebnisse auch gegenüber Versuchen mit Zellmonolayern. Weiterhin ermöglicht die Verwendung rekonstituierter Haut die Testung eines größeren Substanzspektrums.

In dieser Studie präsentieren wir Daten zu *Epidermal Skin Test 1000* (EST-1000), einer neuen, humanen, organotypischen Epidermis, die unter anderem

speziell zur Einschätzung des Gefahrenpotenzials bestimmter Stoffe entwickelt wurde. Morphologisch zeigt EST-1000 eine hohe Vergleichbarkeit zur Situation *in vivo*. Die Expression verschiedener charakteristischer Marker wie Ki-67, CK 1/10 bzw. 5/14, Transglutaminase, Kollagen 4, Involucrin, Beta 1 Integrin und Laminin konnten durch immunhistochemische Untersuchungen eindeutig nachgewiesen werden. Eine funktionelle Barriere – vermittelt durch das *Stratum Corneum* – konnte darüber hinaus über die Toleranz gegenüber 1% SDS (ET50 > 90 min) und 1% Triton X-100 (ET50 > 180 min) demonstriert werden. Die topische Applikation von irritativen Substanzen wie z.B. Nickelsulfat induzierte, entsprechend der Physiologie der beteiligten Zelltypen in ihrer nativen Umgebung, die Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren wie IL-1 α und IL-8.

Im Mittelpunkt dieser Untersuchungen stand die interne Validierung von EST-1000 für die Korrosionstestung bestimmter Substanzen gemäß der OECD Richtlinie TG 431. Die von der OECD vorgegebenen 12 Referenzsubstanzen wurden topisch auf das Hautmodell aufgetragen und die Vitalität der Zellen anschließend mit dem Standard MTT-Test bestimmt. Alle Testsubstanzen konnten mit EST-1000 reproduzierbar richtig klassifiziert werden. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass EST-1000 alle Kriterien der OECD TG 431 erfüllt und sich damit für die Testung potenziell korrosiver Substanzen hervorragend eignet. Zusätzlich veranschaulichen die gezeigten Zytokinexpressionsdaten, dass EST-1000 zur Aufklärung umfangreicher toxikologischer und pharmakologischer Fragestellungen (Irritation, Sensibilisierung) eingesetzt werden kann.

Poster

Assessment of the human epidermis model SkinEthic RHE™ for *in vitro* skin corrosion testing according to OECD TG 431

Helena Kandárová¹, Manfred Liebsch¹, Horst Spielmann¹, Elke Genschow¹, Elisabeth Schmidt¹, Dieter Traue¹, Robert Guest², Andrew Whittingham², Neil Warren², Armin O. Gamer¹, Martina Remmele³, Tanja Kaufmann³, Elke Wittmer³ and Bart De Wever⁴

¹ZEBET, Federal Institute for Risk Assessment (BfR), D-Berlin, ²Safepharma Laboratories, UK-Derby, ³Experimental Toxicology and Ecology of BASF AG, D-Ludwigshafen, ⁴Skinethic Laboratories, F-Nice
e-mail: h.kandarova@bfr.bund.de

In the year 1998 the EPISKIN™ and TER *in vitro* corrosivity test were successfully validated and met the acceptance criteria previously defined by the Management Team of the ECVAM International Validation Study. Subse-

quently an ECVAM funded "Catch up" validation study was performed with the human epidermal model EpiDerm™ (Mat Tek, Ashland, USA) and also this method and model met acceptance criteria.

In 2002 the National Co-ordinators

of OECD Test Guideline Programme (WNT) endorsed New Draft Test Guidelines TG 430 (TER) and TG 431 (Human Skin Model) for *In Vitro* Skin Corrosion Testing. In Guideline TG 431 general functional and performance criteria were

defined if other (or new) skin or epidermis models are used in the context of this guideline.

To show that this concept works, in 2003 ZEBET tested several chemicals from the ECVAM validation trial with the SkinEthic reconstituted human epidermal (RHE) model (SkinEthic, F-Nice), applying the validated EpiDerm™ skin corrosion test protocol and prediction model. After minor technical adaptations, classifications obtained

were in accordance with those obtained previously with the validated human skin models EPISKIN™ and EpiDerm™.

From December 2003 to February 2004 a blind trial was conducted at ZEBET (D), Safepharma (UK) and BASF (D) with the 12 reference chemicals specified in OECD Test Guideline 431. In each laboratory three independent determinations were performed. Results obtained with the SkinEthic epidermal model were reproducible, both within

and between laboratories, and over time. Concordance between the *in vitro* predictions of skin corrosivity potential obtained with the SkinEthic epidermal model and the predictions obtained with the accepted tests of OECD TG 430 and TG 431 was very good. The new test was able to distinguish between corrosive and non-corrosive chemicals for all of the reference chemicals.

Poster

[*In vitro* investigations into sediment, particulate suspended matter and water samples to explain the decline in fish populations of the upper Danube river]

***In vitro* Untersuchungen von Sediment-, Schwebstoff- und Wasserproben zur Erklärung des Fischrückgangs in der Donau**

Steffen Keiter¹, Thomas Kosmehl¹, Andrew Rastall², Klaus Aföldi², Lothar Erdinger², Karl Wurm³, Thomas Braunbeck¹ und Henner Hollert¹

¹Institut für Zoologie, Universität Heidelberg, D-Heidelberg, ²Hygiene-Institut, D-Heidelberg,

³Gewässer-ökologisches Labor, D-Starzach

E-Mail: braunbeck@urz.uni-heidelberg.de

Seit Beginn der 90er Jahre gehen die Fischbestände an der oberen Donau signifikant zurück. Besonders die Äsche ist trotz intensiver Besatzmaßnahmen in ihrem Bestand stark gefährdet, obwohl sich Abwasserbelastung und Gewässergüte deutlich verbessert haben.

Die offensichtliche Diskrepanz zwischen Verbesserung der Gewässergüte und Fischrückgang wurde seitdem nicht gelöst. Die Abwasserbelastung wurde zwar durch Aus- und Neubau der Kläranlagen deutlich verbessert, jedoch gibt es zahlreiche Substanzen, die durch Klärung des Wassers nicht eliminiert werden können. Viele Schadstoffeinträge sind kaum im Wasser gelöst, sondern werden dem Wasser durch Adsorption an Schwebstoffe und Sedimente rasch entzogen. Diese Chemikalien gefährden nicht nur die im Sediment

lebenden Organismen, sie können auch aus dem Sediment durch z.B. Hochwasserereignisse remobilisiert und somit wieder bioverfügbar werden. Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden daher zur Abschätzung der ökotoxikologischen Gefährdung vier Sediment-, zwei Schwebstoff- und fünf Wasserproben aus dem Bereich ausgewählter Klärwerke in verschiedenen Expositionspfaden (native Wasser- und Sedimentproben, acetone-extrahierte Sedimentextrakte und XAD-Wasserextrakte) in den folgenden Biotests auf ihr ökotoxikologisches Potenzial untersucht: (1) Zytotoxizitätstest (zelltoxische Wirkung), (2) Comet-Assay mit RTL-W1-Zellen (Gentoxizität), (3) Bakterienkontakttest (Bakterientoxizität), (4) *Yeast Estrogen Screen* (endokrine Wirksamkeit), (5) Fischeitest mit *Danio*

rerio (Embryotoxizität, Teratogenität) und (6) Ames-Test (Mutagenität).

Trotz hoher Verdünnungen einzelner nativer Sediment- und Schwebstoffproben wurde z.B. häufig eine hohe embryotoxische Wirkung beobachtet. Im Hefe-Assay konnte bei allen Wasserextrakten eine signifikante endokrine Wirksamkeit mit 17 β -Estradiol-Äquivalentkonzentration von bis zu 2,3 ng/L nachgewiesen werden. Zusammenfassend konnte in den Biotests gezeigt werden, dass im Untersuchungsgebiet durchaus Belastungsschwerpunkte vorliegen. Auf der Basis der vorliegenden *in vitro* Befunde muss auf eine vergleichsweise hohe Belastungssituation in der Donau geschlossen werden; ein Zusammenhang mit dem Rückgang der Fischpopulationen kann nicht ausgeschlossen werden.



Poster

[Dioxin-like activities in the permanent fish cell line RTL-W1 – depth profiles in Neckar river sediments at the lock area of Lauffen]

Dioxin-ähnliche Wirksamkeit in der permanenten Fischzelllinie RTL-W1 – Tiefenprofile von Sedimentbohrkernen der Stauhaltung Lauffen am Neckar

Stefanie Knauert¹, Matthias Dürr², Ingo Haag³, Thomas Braunbeck¹ und Henner Hollert¹

¹Zoologisches Institut, Universität Heidelberg, D-Heidelberg, ²Institut für Hygiene, D-Halle,

³Institut für Wasserbau der Universität Stuttgart, D-Stuttgart

E-Mail: braunbeck@urz.uni-heidelberg.de

Sedimente stellen Senken für gelöste Wasserinhaltsstoffe dar, die eine hohe Affinität zu Schwebstoffen besitzen. Durch Remobilisierung hochkontaminierter Altablagerungen können Sedimente aber auch zur Quelle einer erneuten Belastung werden. Die Staustufe Lauffen am Neckar ist ein Musterbeispiel für Staustufen mit klarer Differenzierung in hochkontaminierte Alt- und geringer belastete Jungsedimente. Vor diesem Hintergrund wurde das Dioxin-ähnliche Schädigungspotenzial von Sedimenten aus der Neckarstauhaltung Lauffen analysiert.

Verschiedene Sedimentbohrkernproben der Stauhaltung Lauffen wurden in Anlehnung an die Methode von Brack et al. (2000) auf ihre Fähigkeit untersucht, das Entgiftungsenzym Ethoxyre-

sorufin-O-Deethylase (EROD) in der permanenten Fischzelllinie RTL-W1 zu induzieren. Die Überprüfung auf Dioxin-ähnliche Wirksamkeit ergab eine signifikante Untergliederung in oberflächennahe Jungsedimente mit geringerem EROD-Induktionspotenzial und tiefergelegene Altsedimente mit einem sehr hohen Dioxin-ähnlichen Potenzial. Ein sprunghafter Anstieg der EROD-Aktivität ist dabei genau in der Tiefe einer Erosionsdiskordanz in 25 cm Tiefe zu beobachten, die im Rahmen einer früheren Studie ermittelt worden war (Hollert et al., 2003). Für die Bohrkernsegmente unterhalb dieser Tiefe konnte eine sprunghafte Zunahme der ökotoxikologischen Belastung sowohl in Form eines Anstiegs der Schwermetall- und PCB-Konzentrationen um einen Faktor

10 bis 50, als auch in Form einer signifikanten Zunahme des zytotoxischen und mutagenen Potenzials nachgewiesen werden.

Ein Vergleich der Dioxin-ähnlichen Wirksamkeit der Sedimente des untersuchten Standorts mit denjenigen in Sedimenten und Schwebstoffen anderer potenziell belasteter deutscher Flüsse lässt auf einen sehr hohen Kontaminationsgrad der Altsedimente des Standorts Lauffen schließen.

Brack, W., Segner, H., Moder, M. and Schürmann, G. (2000). *Environ. Toxicol. Chem.* 19 (10), 2493-2501.

Hollert, H., Haag, I., Dürr, M. et al. (2003). *UWSF - Z. Umweltchem. Ökotox.* 15, 5-12.

Poster

[Comparative investigations into the genotoxic potential of Rhine river sediments by means of the comet assay with RTG-2- and RTL-W1-cells]

Vergleichende gentoxische Untersuchungen von Sedimenten des Rheins mit RTG-2- und RTL-W1-Zellen mit Hilfe des Comet-Assays

Thomas Kosmehl¹, Jan Wölz¹, Volker Garke¹, Falk Krebs², Lothar Erdinger³, Thomas Braunbeck¹ und Henner Hollert¹

¹Institut für Zoologie der Universität Heidelberg, D-Heidelberg, ²Bundesanstalt für Gewässerkunde, D-Koblenz,

³Hygiene-Institut, D-Heidelberg

E-Mail: braunbeck@urz.uni-heidelberg.de

In der vorliegenden Studie wurde das gentoxische und mutagene Schädigungspotenzial acetonischer Sedimentextrakte von Ober- und Hochrheinproben in den beiden permanenten Fischzelllinien

RTG-2 und RTL-W1 untersucht. Durch den Einsatz unterschiedlicher Testsysteme (Ames-Test mit den Stämmen TA98 und TA100 jeweils mit und ohne exogene S9-Supplementierung, Comet-

Assay mit den Zelllinien RTG-2 mit und ohne exogene S9-Supplementierung sowie RTL-W1) konnten erste Rückschlüsse auf die Art der gentoxischen Belastung gezogen werden. Insgesamt

12 der untersuchten 18 Sedimentproben zeigten eine genotoxische Aktivität im Comet-Assay mit den wenig biotransformationskompetenten RTG-2-Zellen, wogegen alle Sedimente im Comet-Assay mit der Zelllinie RTL-W1 signifikant genotoxisch wirkten. In den RTL-W1-Zellen mit ihrer hohen Biotransformationskapazität konnten deutliche Unterschiede im genotoxischen Potenzial der Sedimente nachgewiesen werden, so dass bei einer abschließenden Bewertung die Effekte in beiden Zelllinien unterschiedlich interpretiert wurden.

Der Einsatz eines S9-Mix im Comet-Assay mit den RTG-2-Zellen zeigte, dass in vielen Fällen Schadstoffe, die einer

Cytochrom P450-abhängigen Bioaktivierung bedürfen, für das genotoxische Schädigungspotenzial verantwortlich gemacht werden konnten (vergleichbar hohe Effekte im RTG-2-Test wie bei den RTL-W1-Zellen). Die Befunde im Ames-Test korrelierten in über 50% der Fälle gut mit den Befunden des Comet-Assays. Große Differenzen zeigten sich jedoch insbesondere für die Oberflächen-sedimente des Hochrheins, die im Comet-Assay deutlich mehr positive Befunde erbrachten.

Ein Vergleich der Bohrkern- und Oberflächenproben ergab für die Gesamtheit der Proben im Comet-Assay keinen signifikanten Unterschied zwischen dem

genotoxischen Schädigungspotenzial, so dass auch für die oberflächennahen (rezenten) Sedimente im Rhein ein vergleichsweise hohes genotoxisches Potenzial dokumentiert werden konnte. Hingegen wurde im Ames-Test für den Großteil der (tieferen) Bohrkernproben ein höheres Schädigungspotenzial als jenes der Oberflächenproben nachgewiesen. Insgesamt belegen die Daten, dass zur umfassenden Untersuchung von Umweltproben beide Testsysteme verwendet werden müssen, um eine falsch-negative Bewertung genotoxischer Proben zu vermeiden.

Poster

Strategies to maintain pluripotency of mouse embryonic stem cells D3

Vivian Kral, Burkhard Flick and Stephan Klug

Institute of Clinical Pharmacology and Toxicology, Dept. of Toxicology, Charité-University Medicine Berlin, D-Berlin
e-mail: vivian.kral@charite.de

Undifferentiated embryonic stem cells (ESC) are characterised by pluripotency and a nearly unlimited self renewal capacity. The pluripotency has to be maintained by differentiation inhibiting strategies and is prerequisite for the possibility of the ESC to differentiate into different cell types and thereby for their applicability, e.g. in the embryonic stem cell test (EST). This *in vitro* assay predicts the embryotoxic potential of test substances by determining their effects on the differentiation of ESC into cardiomyocytes. The aim of the study was to evaluate strategies to inhibit differentiation in the culture of pluripotent ESC D3.

The ESC were cultured for 50 passages under different culture conditions: supplementation with either leukaemia inhibitory factor (LIF) (1000 and 2000

U/ml) or oncostatin-m (OsM) (20 ng/ml) or co-culture with STO-fibroblasts alone or in combination with LIF (1000 U/ml). Every fifth cell passage was investigated for the markers of pluripotency, stage-specific embryonic antigen-1 (SSEA-1) and high alkaline phosphatase activity, using FACScan analysis and an enzyme activity assay. The potency of the ESC to differentiate into cardiomyocytes was morphologically evaluated by the appearance of the contracting cardiomyocytes.

The pluripotency markers in the different ESC populations decreased during the 50 passages after different number of passages. The decrease of the markers correlated with a decreasing capacity to differentiate into cardiomyocytes. But only the decrease of SSEA-1 was observed before or at the same time

when the capacity of ESC to differentiate decreased. Over the first 28 passages, each strategy maintained the differentiation capacity of the ESC. After 33 passages cells cultured with LIF and after 43 passages cells cultured with OsM or STO-feeder-layer in combination with LIF had a reduced capacity to differentiate into cardiomyocytes. The cells cultured with STO-feeder cells maintained unchanged differentiation capacity up to 48 passages.

The differentiation inhibiting strategies using the supplementation of OsM or STO fibroblasts as feeder cells alone or in combination with LIF were significantly more efficient to conserve the capacity of mouse ESC D3 to differentiate into cardiomyocytes than the commonly used LIF.



Vortrag/Lecture

SELDI approaches for liver cancer analysis

Michaela Kröger¹, Suse Beyer¹, Kerstin Fella¹, Matthias Glückmann², Annette Kopp-Schneider³, Carina Ittrich³ and Peter-Jürgen Kramer¹

¹Institute of Toxicology, Merck KGaA, D-Darmstadt, ²Applied Biosystems, D-Darmstadt,

³German Cancer Research Institute, D-Heidelberg

e-mail: Michaela.Kroeger@merck.de

Two studies were performed to analyse complex protein mass spectra, derived from Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization Time Of Flight (SELDI-TOF) mass spectrometry (MS), in order to discover protein expression signatures/biomarkers related to hepatotoxicity and liver cancer. Wistar rats were treated in a high dose and a low dose study with either the hepatocarcinogen NNM (N-Nitrosomorpholine) or a vehicle control. Liver biopsies were taken and SELDI-TOF-MS was performed with protein extracts. Biomarkers were revealed in the data set by univariate analysis using

Ciphergen Software, as well as libraries of the BioConductor Project. Intensity values of several m/z values (proteins) differ significantly between control and treated samples, as well as between tumor and non tumor tissue. Protein signatures were identified by decision tree analysis. Principal Component Analysis (PCA) and Self Organizing Maps (SOM) were used to visualise differences in protein expression due to treatment as well as expression patterns at different time-points. The results revealed that treatment related protein expression changes are detectable at early time-

points, while later time points showed less changes, with exception for the tumor endpoint. Discrimination ability between treated and untreated animals at early time-points increases with dose.

Some of the differentially expressed proteins could be identified by combination of fractionation and mass spectrometry (Fatty acid binding protein, Superoxide dismutase, Ubiquitin, Acyl-CoA binding protein, 10 kDa Heat shock protein). All results were correlated with histopathology data and biological relevance could be determined.

Vortrag/Lecture

[Serological test methods to replace challenge procedures in piglets after maternal immunisation with *E. coli* vaccines]

Serologische Testmethoden als Ersatz für Infektionsversuche an Ferkeln bei *E.coli*-Muttertierimpfstoffen

Marion Krug, Dorothea Hausleithner, Regine Taddey, Peter Volkers, Babett Kobe und Klaus Cüßler

Paul-Ehrlich-Institut, D-Langen

E-Mail: kruma@pei.de

Akute Durchfallerkrankungen durch *E.coli*-Keime stellen ein großes Problem in der Schweinehaltung dar. Durch Impfstoffe, die an die Zuchtsauen verabreicht werden, kann der Antikörpergehalt gegen die bakteriellen Haftantigene im Kolostrum und in der Milch erhöht werden. Das Wirkprinzip der Impfstoffe beruht ausschließlich auf dem Transfer dieser mütterlichen Antikörper an die Saugferkel. Im Rahmen der Zulassung werden noch immer Infektionsversuche an Ferkeln gefordert.

Serologische Testmethoden sind bisher im Europäischen Arzneibuch nur für die Wirksamkeitsprüfung von Chargen am Labortiermodell erlaubt. Um eine Ablösung dieser sehr belastenden Tierversuche durch *in vitro* Methoden zu erreichen, wurden verschiedene Enzymimmunoassays zur Untersuchung auf Antikörper gegen die Haftantigene F4ab, F4ac, F6 und F41 in Serum- und Kolostrumproben entwickelt. Insgesamt wurden 8 in Deutschland zugelassene Impfstoffe in die Untersuchung einbe-

zogen. In zwei ausgesuchten Betrieben wurden jeweils 10 Muttersauen mit einem Produkt nach Herstellerangaben geimpft. Zwei Gruppen mit je 10 ungeimpften Tieren dienten als stallinterne Kontrolle. Dabei zeigten sich bei den geimpften Sauen in Blut und Kolostrum signifikant höhere Antikörpertiter im Vergleich zu den Kontrolltieren. Damit erscheinen alle vier Alternativmethoden zur Ablösung der Infektionsversuche bei Schweinen geeignet.

Poster

[Evaluation of *in vitro* effects of 50 toxic reference chemicals using an electronic cell counting and sizing system versus MTT- and NRU- assay]

Evaluierung zytotoxischer Effekte von 50 ausgewählten Chemikalien auf Mausfibroblasten (Linie L929). Ein Vergleich: WST-8, NRU, Trypanblau und elektronische Vitalitätsbestimmung

Birgit Lewandowski und Toni Lindl

I.A.Z. Institut für angewandte Zellkultur, D-München

E-Mail: i-a-z@t-online.de

Es wurden zwei bereits validierte Testsysteme, welche Stoffwechselprozesse in den Zellen quantifizieren (Neutralrot und MTT/WST-8 Assay) und zwei Testsysteme, die auf der strukturellen Integrität der Zellmembran basieren (elektronische Zellzahlbestimmung mittels CASY-Technologie und Trypanblaufärbung), zur Bestimmung der *in vitro* Toxizität ausgewählt und über Dosis-Wirkungs-

Beziehungen die IC₅₀-Werte von insgesamt 50 ausgewählten Prüfsubstanzen ermittelt. Der Vergleich dieser Ergebnisse mit Werten aus der Literatur zeigt eine hohe Übereinstimmung, wobei die elektronische Zellzahlbestimmung am sensitivsten die *in vitro* Toxizität der Substanzen evaluierte. Die Empfindlichkeit der Testsysteme nahm von MTT/WST-8 über Neutralrot bis Try-

panblau kontinuierlich ab. Es konnte gezeigt werden, dass die Aussagekraft der Ergebnisse aus der elektronischen Zellzählung auf dem hohen Auflösungsvermögen der CASY-Technologie basiert, so dass nicht nur die chemisch induzierte Schädigung der Zellen (Permeabilität der Zellmembran), sondern auch schon erste Anzeichen von Nekrose erkannt werden konnten.

Vortrag/Lecture

The ECVAM validation study of three *in vitro* methods for acute skin irritation – interim report of the validation management team

Manfred Liebsch¹, Philip Botham², Julia Fentem³, Jon Heylings³, Roland Roguet⁴, Thomas Hartung⁵, Chantra Eskes⁵, Sebastian Hoffmann⁵, Tom Cole⁶, Andrew Worth⁵, Valerie Zuang⁵ and Horst Spielmann¹

¹ZEBET im BfR, D-Berlin, ²Syngenta Macclesfield UK-Cheshire, ³Unilever SEAC, Sharnbrook, UK-Bedfordshire, ⁴L'Oréal Life Science Research, F-Clichy, ⁵ECVAM, IHCP, JRC I-Ispra, ⁶ECB, IHCP, JRC, I-Ispra
e-mail: liebsch.zebet@bfr.bund.de

After a successful refinement, following an unsuccessful outcome of a pre-validation study, three *in vitro* tests for acute skin irritation are currently evaluated in a validation study (VS) funded by the EU validation centre ECVAM: two commercially produced human epidermis models, EPISKIN (EPISKIN SNC, Lyon, France) and the EpiDerm (MatTek, Ashland, USA) are evaluated in a common protocol which is the outcome of a co-operation between L'OREAL and ZEBET. In addition, the SIFT (skin integrity function test) using rat skin *ex vivo* is evaluated. The study is managed by ZEBET at the BfR. Each of the tests

will be validated in three laboratories under blind conditions according to international recommendations for the experimental validation of toxicity tests.

In phase 1, during March 2004 - May 2004 20 chemicals (10 irritant (I) and 10 non-irritant (NI)) were tested in the lead laboratories only. In case of a successful outcome, in phase 2, 60 chemicals, 30 I and 30 NI, will be tested in 3 laboratories per test (Sept. 2004 - Jan. 2005).

The following performance criteria were defined for the 3 tests:

1. Reproducibility-overall mean CV should be < 0.3; ANOVA and other statistical analyses should indicate no

statistically significant differences between laboratories;

2. predictive ability: sensitivity ≥ 80% (false negatives ≤ 20%) and specificity ≥ 80% (false positives ≤ 20%).

The proposed acceptance criteria for predictive ability will need to be confirmed by additional statistical analyses using *in vivo* rabbit data. In addition, the data generated during the VS will be analysed post-hoc to evaluate the performance of the tests according to the 3 categories of the GSH (globally harmonised classification system) of the UN.



Vortrag/Lecture

Improving environmental risk assessment using test-systems of various complexity

Matthias Liess

Arbeitsgruppe Effektpropagation, Umweltforschungszentrum, D-Leipzig
e-mail: matthias.liess@ufz.de

One aim of ecotoxicological risk assessment is to predict effects of toxicants in natural systems. For this, various test-systems from the cellular to the community level are used as surrogates. The presentation will inform about the potential and shortcomings of test-systems at low levels of biological organisation in predicting the effects of toxicants in natural systems. In addition it will be presented

how the information gathered from test-systems with a higher level of biological organisation can be used to enhance realism in aquatic risk assessment. The use of such systems – as micro- and mesocosms, as well as monitoring studies – enables to reduce the level of uncertainty when predicting impacts of toxicants on a landscape scale. Towards this end, the presentation shows the importance of

considering environmental stressors, intra and inter-specific biological interactions and demonstrates the advantages to consider metapopulations when assessing effects of toxicants on natural communities. Using this knowledge increases the accuracy in predicting effects of toxicants in natural systems and can help to reduce the amount of animal experiments.

Vortrag/Lecture

Animal testing ethics and human testing Thoughts on our conduct with and our relationship to animals

Alfred Locker

A-Vienna

After many years of experimental work with animals of diverse species, the author felt confronted with the question whether the great expenditure of sacrificed animal life would pay off when compared with the results gained. By self-critically considering his work, he gradually experienced a conversion from an unconcerned experimenter to a man feeling a deep sympathy with his fellow creatures. This motivated him to ponder the *true nature of animals*. Instead of applying ethics – though justified in its own realm – the author preferred to look at the problem using the General Systems Theory (GST), which can describe “the other side” of any system, the side

into which any system may occasionally or necessarily transform. It occurred to him to assume that – provided we see a living organism as a system (as Ludwig von Bertalanffy, the founder of GST, did) – the “other side” of the animal would correspond to an innocent “genius” who suffers for man (thereby assuming a *Christ-like* position), whereas in its transitory life the true essence of the animal is hidden. Thus, by fancifully viewing the role of animals destined to suffer, a connection between GST and theology or religion arises. The consequence for us would be to pay honour to the test animal, irrespective of whether or not painful experiments could be avoided.

The differentiation between a *sacrifice* (spiritually surrendering for a greater good) and a *victim* (involuntarily subjected to suffering) reveals that the experimental animal primarily belongs to the latter. But it can be elevated to the former when the full meaning of its suffering becomes obvious. The same holds true for “human testing”, if, in contrast to the formidable atrocities, e.g. of concentration camps, the momentum of voluntariness is guaranteed, as pioneers of medical research frequently demonstrated by carrying out experiments on themselves.

Vortrag/Lecture

REACH: problems and solutions from the chemical industry's viewpoint

Michael Lulei

Verband der Chemischen Industrie e.V. (VCI), D-Frankfurt/Main
e-mail: lulei@web.de

The future chemicals policy (REACH) will have great consequences on the entire industry at all stages of the supply

chain and also has a direct effect on its capability for innovations and competitiveness. REACH will lead to a consoli-

dation of the product portfolios. The registration costs of many low-volume substances produced for special uses will

be too high. Chemicals with an unfavourable ratio between registration costs and profit will disappear from the market.

Because of this, the chemicals policy should not only be measured with regard to the question of whether it can ensure a high level of protection for human health and the environment, but also in respect of how much it promotes competitiveness and innovation in companies and strengthens their own degree of responsibility. It must also support the ease of communication in the supply chain, ensure clarity and legal security for the companies concerned and be compatible with procedures in other regions of the world.

The draft Regulation proposed by the Commission for the registration, evalua-

tion and authorisation of chemicals (REACH) does not fulfil these prerequisites. Economic impact assessments conducted in various EU member states as well as a pilot trial in which the workability of REACH was tested in four supply chains revealed major problems and shortcomings. Without a simplification of the legal requirements many companies will be overburdened and will not be able to cope.

In order to achieve a balanced and workable Regulation the following steps are necessary in the legislative procedure:

1) Impacts of the proposed provisions in particular on the competitiveness of the European industry, on economic growth, employment and innovation must be examined thoroughly by a neutral party

before the proposal for a Regulation goes in the final phase of the legislative procedure.

2) The workability of the REACH system and the efficiency of its procedures must be fully examined and tried out by companies and public authorities. This should be done in Europe-wide pilot projects jointly with the Commission, competent national authorities and the concerned companies.

A strong need remains for improvements and simplifications to reliably bring about workable and efficient provisions. The VCI has worked out several suggestions for improvements; i.e. to avoid unnecessary bureaucratic and expensive procedures, superfluous tests, and losses of time for new productions and products.

Poster

An *in vivo* and *in vitro* investigation to assess the role of high homocysteine in DNA damage

Ali Mehboob and Ahmad Khan Sageer

Ecotoxicology and Immunotoxicology Lab., Department of Medical Elementology and Toxicology,

Hamdard University, IN-New Delhi

e-mail: mehpar@rediffmail.com

Homocysteine (Hcy) is a sulfur containing amino acid produced from the catabolism of essential amino acid methionine and remethylated to methionine in the presence of methylsynthase using Vit-B12 or Cyanocobalamine as a cofactor and methylene tetrahydrofolate reductase as a co-substrate. Alteration in level of Hcy found to be related to many disorders including cancer.

High Hcy level have been reported in cancer patients but it is not certain that how it is related to cancer. As the mutation plays an important and active role in the development of tumor, so the factor responsible for high rate of mutation would be responsible for cancerous

growth. Study therefore, comprises the collection of blood of the individual having high homocysteine level. The DNA damage was observed by using micronucleus test in the cultured blood cells of the individuals having high level (16.6, 38.7, 54, 78.65 $\mu\text{mol/l}$) of Hcy. There was a significant ($P < 0.01$) induction in the number of micronuclei found when compared to control sample (individual having the normal level of Hcy). The induction in the number of micronuclei was dependent to the level of Hcy in the individuals means the sample of the individual having highest level of Hcy showed the highest number of micronuclei.

We were also interested to perform *in vitro* investigations. So, blood cells were cultured with different concentrations (0, 10, 20, 50, 100 μm) of Hcy. Interestingly the results of this study was in parallel of the *in vivo* findings means a significant enhancement in the frequency of micronuclei was observed and the increment was concentration dependent when compared to control sample (having 0 μm of Hcy). The highest number of micronuclei noted in the sample with highest concentration (100 μm) of Hcy. The results of present study suggest that high homocysteine level causes DNA damage which may lead to mutations and cancer.



Vortrag/Lecture

[VACTRAIN a training programme to introduce the 3R methods into vaccines quality control]

VACTRAIN – Ein Trainingsprogramm zu 3R-Methoden in der Qualitätskontrolle von Impfstoffen

Alexander Mergel¹, Elisabeth Balks¹, Lukas Bruckner², Coenraad F. M. Hendriksen³ und Klaus Cußler¹

¹Paul-Ehrlich-Institut, D-Langen, ²Institut für Viruskrankheiten und Immunprophylaxe, CH-Mittelhäusern,

³Niederländisches Vakzine Institut, NL-Bilthoven

E-Mail: meral@pei.de

VACTRAIN ist ein EU-Projekt im 5. Rahmenprogramm, das mit Hilfe von Workshops und Trainingskursen zum verstärkten Einsatz von Alternativen zu Tierversuchen in der Qualitätskontrolle von Impfstoffen beitragen soll. Im Zeitraum von November 2002 bis März 2004 fanden ein Workshop und 5 Trainingskurse statt. An den Trainingskursen nahmen insgesamt 44 Personen aus 16 europäischen Ländern teil.

Es wurden folgende Themen behandelt:

- Trainingskurs 1 (Mai 2003) IVI: Geflügelimpfstoffe – Fremdvirusabschluss mittels PCR

- Trainingskurs 2 (Mai 2003) PEI: Bakterielle Impfstoffe *ad us. vet.*
- Trainingskurs 3 (September 2003) NVI: DPT-Impfstoffe: Serologische Modelle
- Trainingskurs 4 (März 2004) IVI: Tollwut-Impfstoffe
- Trainingskurs 5 (März 2004) NVI: DPT-Impfstoffe: Neue Technologien in der Qualitätskontrolle

Der Aufbau und die Durchführung der Trainingsprogramme werden beispielhaft anhand von Kurs 2 erläutert. Durch die selbständige Durchführung der Labormethoden, von der Testvorbereitung bis zur

statistischen Auswertung der Ergebnisse, konnten sich die Teilnehmer von der Praktikabilität und der Reproduzierbarkeit der *in vitro* Testsysteme überzeugen. Die praktischen Arbeiten wurden durch zahlreiche Vorträge ergänzt, für die auch externe Referenten, unter anderem von EDQM und ECVAM, gewonnen werden konnten. Die Teilnehmer erhielten umfangreiche Arbeitsunterlagen zu den Vorträgen und Labormethoden, einschließlich der Arbeitsanweisungen. Alle Teilnehmer haben die Präsentationen und die bereitgestellten Arbeitsmittel sowie die Organisation und Durchführung der Laborarbeiten als ausgezeichnet bewertet.

Poster

New animal model for stressfree and objective pain research

Nicole Motzkus, Lubos Budinsky, Marina Sergejeva, Kay Brune and Andreas Hess

Institute for Pharmacology, Pharmacological imaging and image analysis, D-Erlangen

e-mail: andreas.hess@pharmakologie.uni-erlangen.de

Even today a continuous demand exists for developing novel analgesics for pain relief. Traditional behavioural pain examinations in animals are highly stressful and subjective. Non invasive imaging approaches like fMRI in anesthetized animals would significantly reduce the stress for animals and simultaneously refine and improve objective measurements of analgesic effects. Moreover, a model which would allow the investigation of (chronic) pain processes would open a new avenue in pain research. Therefore, we established a heat pain paradigm in a rat-model resulting in reliable and quantifiable BOLD responses in pain related brain

areas nicely comparable to human studies. Moreover a morphine dose response curve as the analgesic gold standard was achieved.

fMRI was performed on a 4.7 T MRI animal scanner. The initial 120 scans, each covering the whole brain, recorded a 4 minutes period without stimulation, the next 60 scans covered 2 minutes of topical heat stimulation followed by 60 scans of no-stimulation and so on. Computer adjustable current outputs (MRI-ThS1-2ch) stimulated the rat hind paw at given temperatures of 35, 40, 45 and 50°C. The set of four different temperatures was repeated 2 times. After that morphine was applied at

dosages between 0.125 to 2 mg/kg and recording proceeded for another 4 stimuli sets. Functional analysis was performed using MRI or BrainVoyager.

Brain areas, already known to be involved in sensory and pain processing were significantly increased in volume and activation (thalamus, somatosensory cortex, cingulate cortex, insula, hypothalamus). Morphine was able to reduce the activity in nearly all structures. The morphine doses response profile appeared to be brain structure dependent and complex.

In conclusion, our computer controlled topical heat stimulation of the rat



hind paw is robust leading to reliable BOLD activation of sensory and pain related pathways. The results can be quantified with respect to brain area, size, and intensity in relation to the tem-

perature applied. Morphine can block these responses. Therefore, this non invasive pain model at minimal animal stress level due to the anaesthesia of the animal is highly objective and well

suited for testing new analgetics and furthermore to study pain chronification.

Poster

Biotechnologically produced three-dimensional skin models provide an *in vitro* method for dermatological tests of cosmetics

Sonja Otten, Marion Lempp, Jörg Riedel, Sabine Greiner, Katharina Kiepfer and Marion Mappes

In Vitro Biotec GmbH, D-Stuttgart
e-mail: otten@invitrobiotec.de

The European Union decided a gradual restriction of the majority of safety toxicological animal tests and a substitution of these tests by validated non-animal *in vitro* methods. The dermatological testing of cosmetics and ingredients in animal experiments will no longer be allowed in the near future. An *in vitro* method making use of biotechnologically produced, artificial human skin has been approved as an *in vitro* test for skin corrosion. In this context, three-dimensional skin models become more and more important for dermatological testing of passive or active ingredients, formulations and ready-to-use cosmetics.

In this study, different ready-to-use cosmetics were tested with regard to

their skin compatibility. Therefore, two different three-dimensional skin models were used. Moreover, toxicity was assessed on the basis of the *Vibrio fischeri* bioassay.

The reconstituted human skin model InSkin-SP was produced by generating a collagen matrix containing primary dermal fibroblasts. Primary keratinocytes were seeded and cultured on this artificial dermis, and proliferation and differentiation of keratinocytes resulted in an epidermis with a fully functional horny layer. This skin equivalent was applied in comparison to the *ex vivo* skin model InSkin-V, a skin explant. The *Vibrio fischeri* bioassay is a well-established and prescribed method rather applied

for detection of toxic components in waste water (ecotoxicity). The naturally light emitting bacteria respond with a measurable reduction in light emission upon exposure to a toxic sample.

For testing of skin compatibility, different ready-to use cosmetics were applied to the skin models which were subsequently analysed by histological methods. Furthermore, expression of various differentiation markers was assessed. Variance in skin compatibility could be observed for different cosmetics. The independent *Vibrio fischeri* bioassay provided good correlation with data obtained from the three-dimensional skin models.

Poster

Development of a high throughput *in vitro* system for lung toxicity testing of substances

Andreas Pahl, Ruzica Puljic and Kay Brune

Department of Pharmacology and Toxicology, University of Erlangen, D-Erlangen
e-mail: pahl@pharmakologie.uni-erlangen.de

There is increasing evidence that toxicologic rather than immunologic processes may be primarily responsible for the development of occupational asthma following exposure to chemical irritants. The analysis of effects of inhalable substances by using cultivated cells of the target organ (i.e. lung) requires the introduction of new *in vitro* techniques in order to achieve adequate

cultivation and exposure. Epithelial damage is common to all forms of asthma and other chronic airway diseases. The direct toxic effects of respiratory hazards to epithelial cells are significant as an initiating event in the development of chronic airway diseases.

We developed a new *in vitro* test system for the evaluation of substances causing lung damage. This *in vitro*

model is based on lung epithelial cells releasing inflammatory mediators upon chemical irritation. Furthermore, other biomarkers were established to estimate the toxic profile of substances. This *in vitro* model and biomarkers were validated with well known toxic compounds. We adapted this *in vitro* model to a new fully automated system for substance testing in 96-well plates. In



this automated system, biomarkers are determined in 384-well plates using real-time quantitative one-tube RT-PCR.

These results suggest that this epithe-

lial cell culture model may allow the evaluation of potentially lung damaging compounds *in vitro* in a high throughput manner. This approach may result in

replacing animal experimentation in toxicity testing of chemicals for lung damage.

Vortrag/Lecture

Ahimsa and alternatives – the concept of the 4th R. The CPCSEA in India

Shiranee Pereira

Consultant, Committee for the Purpose of Control and Supervision of Experiments on Animals, Animal Welfare Division, Govt. of India, IN-Chennai
e-mail: shiraneep@hotmail.com

The *Committee for the Purpose of Control and Supervision of Experiments on Animals* (CPCSEA) in India is one of its kind in the world. It is the statutory body of the Government of India formed by an act of the Indian Parliament. It is body of nominated members and representatives from national regulatory agencies, Ministry of Health and Family Welfare, Ministry of Environment and Forests, national academic and research councils, premier research institutes, eminent scientists and animal welfare organisations. The CPCSEA draws its powers from PCA Act 1960 which states that the duty of the committee “is to take all such measures as may be necessary to ensure that animals are not subject to unnecessary pain or suffering before, during or after the performance of experiments on them”.

With the power to promulgate its own laws, to ensure the humane and ethical use of animals in research and education, the CPCSEA has in 1998 notified in the gazette of India the *Breeding of and*

Experiments on Animals (Control and Supervision) Rules 1998.

The CPCSEA is unique in that the law in itself has enabled the creation of a common platform for recourse and discussion for scientists and animal activists and in this front the CPCSEA works for humane and progressive solutions in the use of animals in experimentation. Interestingly in a country that is caught in a paradox – in violence and sunk in a culture enmeshed in rich cultural and religious traditions, it is a country that yet draws a lot of its power from its belief in “ahimsa” (the philosophy of non violence). It was observed that it was not different in laboratories that used animals. Unethical practices, inhumane and unscientific practices, ignorance to the use of alternatives were a way of science till 1999, when CPCSEA was made functional. For four years the CPSEA waged a battle, rescued thousands of animals brutalised in laboratories, fought legal battles to victory, enforced for the first time in the country

good laboratory practices, guidelines for the use of animals in the production of immunobiologicals, introduced the credo of 3Rs, trained and taught scientific personnel the credibility of humane science and most importantly brought in the concept of the fourth R, “rehabilitation” of used laboratory animals. Today CPCSEA has made it a national policy based on the principle that personnel using experimental animals have a moral responsibility for animals after their use. And costs of after care/rehabilitation of animals post experimentation are to be a part of research costs and should be a scaled in positive correlation with the level of sentience of the animals.

This paper is about Indian law and animal experimentation, the success story of the CPCSEA in India, the battle waged and its victory in inculcating the credo of 4Rs - Reduction, Refinement, Replacement and Rehabilitation of animals used in experimentation.

Poster

[Development and mathematical testing of a three-dimensional model of substance distribution in the cochlea after local application]

Weiterentwicklung und mathematische Testung eines Modells zur 3D-Computersimulation der Wirkstoffverteilung in den Innenohrflüssigkeiten bei lokaler Pharmaka-Applikation

Stefan Plontke¹, Norbert Siedow², Raimund Wegener², Alec N. Salt³, Hans-Peter Zenner¹

¹Universitätsklinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde und Hörforschungszentrum (THRC), D-Tübingen,

²Fraunhofer-Institut für Techno- und Wirtschaftsmathematik, D-Kaiserslautern, ³Department of Otolaryngology, Washington University School of Medicine, USA-St. Louis

E-Mail: Stefan.Plontke@uni-tuebingen.de

Die Etablierung von Verfahren zur lokalen Medikamentenapplikation an das Innenohr als Alternative zur systemischen Therapie von Innenohrerkrankungen erfordert die Durchführung präklinischer pharmakokinetischer Studien. Aufgrund der sehr kleinen Flüssigkeitsräume und der damit verbundenen technischen und analytischen Schwierigkeiten waren bisherige Untersuchungen mit jeweils einer Volumenprobe pro Tier sehr Tierversuchsaufwändig. Computersimulationen können helfen, die Anzahl von Tierversuchen bei pharmakokinetischen Studien am Innenohr deutlich zu reduzieren.

Mit Hilfe eindimensionaler Modelle kann die Wirkstoffdiffusion in der Cochlea mit geringem Rechenaufwand

zunächst abgeschätzt werden. Das ist besonders für inverse Parameterbestimmungen, die zahlreiche Vorwärtssimulationen erfordern, von Nutzen. Mehrdimensionale Modelle können die realen geometrischen Verhältnisse besser repräsentieren. Speziell im basalen Bereich der Cochlea sind auf Grund der geometrischen Verhältnisse die Voraussetzungen einer eindimensionalen Modellierung – die Konstanz der Konzentrationsverteilung über dem cochleären Querschnitt – nicht gegeben. Auf der Grundlage eines dreidimensionalen ANSYS-Simulationsprogramms wurden die bisher beobachteten Unterschiede in den Wirkstoffverteilungen mit Hilfe von ein- und dreidimensionalen Modellen untersucht und durch Einführung geo-

metrischer Korrekturfunktionen approximiert. Des Weiteren wird dargestellt, wie die typische Spiralform der Cochlea die Diffusion beeinflusst und wie dies bei der dreidimensionalen Simulation berücksichtigt wird.

Als Schlussfolgerungen aus dem qualitativen und quantitativen Vergleich ein- und dreidimensionaler Modelle und der Beschreibung der Möglichkeiten und Grenzen einer Modellreduktion lassen sich Konzepte für die Nutzung der Computersimulationen im Rahmen des 3R-Prinzips bei präklinischen pharmakokinetischen Untersuchungen am Innenohr ableiten.

Unterstützt durch das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), ZEBET

Vortrag/Lecture

[Replacement of the *in vivo* neutralisation test for efficacy demonstration of tetanus vaccines *ad us. vet.* for marketing authorisation procedures]

Ersatz des *in vivo* Neutralisationstests bei der Wirksamkeitsprüfung von Tetanusimpfstoffen *ad us. vet.* im Rahmen der Zulassung

Ute Roskopf

Paul-Ehrlich-Institut, D-Langen

E-Mail: rosut@pei.de

Im Rahmen der Zulassung von Tetanusimpfstoffen für Pferde und Schafe wird bislang eine indirekte serologische Bestimmung der Wirksamkeit durchgeführt. Entsprechend der Europäischen

Arzneibuch-Monografie „Tetanusimpfstoffe für Tiere“ soll die Wirksamkeit von Tetanusimpfstoffen *ad us. vet.* durch den Nachweis der Induktion protektiver Antitoxintiter im Zieltier belegt werden.

Eine Testmethode ist jedoch nicht festgeschrieben. Derzeit wird das Serum geimpfter Pferde und Schafe in der Regel *in vivo* in Labortieren (Maus oder Meeresschweinchen) in einem so genannten



Toxinneutralisationstest (TNT) geprüft. Dafür werden den Tieren nach Verabreichung entsprechender Serumverdünnungen letale Dosen an Tetanustoxin injiziert und die Wertigkeit des Impfstoffes über die Überlebensraten ermittelt.

In eigenen Untersuchungen wurden zehn Gruppen à 10 Pferde sowie acht Gruppen à 10 Schafe mit verschiedenen Tetanusimpfstoffen immunisiert und die Seren untersucht. Hierdurch konnte der Verlauf der Tetanus-Antitoxintiter in Seren beider Tierarten über einen

längeren Zeitraum verfolgt werden. Die Seren wurden dabei in zwei verschiedenen ELISA-Systemen getestet: einem Tierart-unabhängigen Doppelt-Antigen-ELISA und einem Tierart-spezifischen indirekten ELISA. In beiden Testsystemen wurde gereinigtes Tetanustoxoid als Antigen verwendet. Für die Bestimmung der Antikörpertiter im Doppelt-Antigen-ELISA wurde der Internationale WHO-Standard vom Pferd als Referenzserum eingesetzt. Im indirekten ELISA erfolgte die Berechnung der Titer anhand mitge-

führter interner Referenzseren vom Pferd bzw. vom Schaf, die gegen den WHO-Standard kalibriert und zusätzlich *in vivo* mittels TNT getestet wurden.

Der Doppelt-Antigen-ELISA erwies sich gerade im niedrigtitrigen Bereich als sehr spezifisch und daher geeignet, den Antitoxinstatus beim Pferd oder Schaf zu überprüfen. Er stellt damit eine erfolgsversprechende *in vitro* Alternative für den Ersatz des TNT zum Wirksamkeitsnachweis von Tetanusimpfstoffen im Zieltier dar.

Vortrag/Lecture

[EU-Cosmetics: timetables for the replacement of animal experiments – comments from the point of view of the German Animal Welfare Federation]

EU-Kosmetik: Zeitpläne für den Ersatz von Tierversuchen – Anmerkungen aus der Sicht des Deutschen Tierschutzbundes

Irmela W. Ruhdel

Deutscher Tierschutzbund e.V./Akademie für Tierschutz, D-Neubiberg
E-Mail: irmela.ruhdel@tierschutzakademie.de

Unter Leitung der Europäischen Kommission beschäftigt sich seit März 2003 eine Arbeitsgruppe mit Interessensvertretern (OECD, Industrie, Verbraucherschutz, Tierschutz) damit, den Ersatz der Tierversuche im Bereich Kosmetik termingerech nach den Vorgaben der 7. Änderung der EU-Kosmetikrichtlinie zu realisieren. Ende August 2003 wurden dafür „*ad hoc groups*“ mit Experten eingerichtet, die für die elf für Kosmetika relevanten Bereiche der Sicherheitsprüfung von Chemikalien Inventarlisten von viel versprechenden Alternativmethoden und deren Status in Bezug auf Entwicklung, Validierung und behördliche Akzeptanz zusammenstellen sollten. Darüber hinaus sollen die Expertengruppen einschätzen, wann mit dem möglichen vollständigen Ersatz der Tierversuche in den genannten Bereichen gerechnet werden könnte.

Anfänglich wurden die Arbeiten der „*ad hoc groups*“ durch das Fehlen eines

klaren Arbeitsauftrags, Zeitmangel und geringe Beteiligung vor allem seitens der Industrie verzögert. Im Mai 2004 konnte letztendlich ein umfangreicher Bericht vorgelegt werden, der nunmehr der Kommission dazu dienen wird, eigene Zeitpläne für den Ersatz von Tierversuchen aufzustellen.

Der Bericht gibt einen umfassenden Überblick über den wissenschaftlichen Stand der Alternativmethodenforschung im Bereich der Sicherheitsprüfung von Chemikalien und verdeutlicht, in welchen Bereichen welche Aktivitäten zum Ersatz von Tierversuchen erforderlich sind.

Aus der Sicht des Deutschen Tierschutzbundes müssen nunmehr umgehend Anstrengungen unternommen werden, um die in dem Bericht formulierten Vorschläge aufzugreifen. Dazu sollten sinnvolle Prüfstrategien mit der Festlegung von „*key tests*“, die bevorzugt entwickelt und validiert werden müs-

sten, erarbeitet werden. Um das enorme Arbeitspensum möglichst schnell zu bewältigen, sollte nicht nur die kosmetische, sondern vor allem auch die chemische Industrie stärker in die Pflicht genommen werden. Die EU-Kommission ist aufgefordert, ausreichende finanzielle Mittel für die Entwicklung und Validierung von Alternativmethoden und für ECVAM bereitzustellen.

Der Bericht liefert wichtige Anregungen für weitere Schritte hinsichtlich des Ersatzes von Tierversuchen. Er darf jedoch keinesfalls dazu benutzt werden, die Termine für das Inkrafttreten der Tier- und Vermarktungsverbote der 7. Änderung der EU-Kosmetikrichtlinie in Frage zu stellen: Die Termine für die Verbote wurden festgelegt und sind unabhängig von der Verfügbarkeit von tierversuchsfreier Methoden umzusetzen.

Vortrag/Lecture

[Efforts of politicians and authorities to include animal welfare related provisions into the new EU Chemicals Regulation – experiences and expectations from the point of view of the German Animal Welfare Federation]

Aktivitäten von Politik und Behörden bei der tierschutzgerechten Ausgestaltung der neuen EU-Chemikalienverordnung – Erfahrungen und Erwartungen aus Sicht des Deutschen Tierschutzbundes

Ursula G. Sauer

Deutscher Tierschutzbund, D-Neubiberg
E-Mail: ursula.sauer@tierschutzakademie.de

Im Oktober 2003 hat die Europäische Kommission den ersten Entwurf für eine neue EU-Chemikalienverordnung vorgelegt. Während zu begrüßen ist, dass angestrebt wird, durch die neuen Regelungen den Umwelt-, Verbraucher- und Arbeitsplatzschutz zu verbessern, sind aus Sicht des Tierschutzes umfangreiche Nachbesserungen im Verordnungsentwurf genauso erforderlich wie angemessene Begleitmaßnahmen, um sicherzustellen, dass das von der Kommission formulierte Ziel, Tierversuche in der neuen Chemikalienpolitik zu vermeiden, erreicht werden kann.

So sollte in der Verordnung verpflichtend vorgeschrieben werden, dass im Zuge der Registrierung, Evaluierung und Autorisierung alter und neuer chemischer Substanzen alle verfügbaren toxikologischen und ökotoxikologischen Daten ohne Ausnahme offen gelegt und

von den Unternehmen gemeinsam genutzt werden müssen. Die Prüfanforderungen in den Anhängen der Verordnung sollten so ausgestaltet werden, dass sichergestellt ist, dass nur solche Daten erhoben werden, die für die sichere Handhabung der betreffenden Substanz erforderlich sind. Zudem sollten alle bereits verfügbaren tierversuchsfreien Verfahren in diese Prüfanforderungen aufgenommen und wirkungsvolle Regelungen verankert werden, damit auch zukünftig neu entwickelte tierversuchsfreie Verfahren unverzüglich in die Anhänge aufgenommen werden und zum Einsatz kommen.

Um weiter zu erreichen, dass bis Inkrafttreten des neuen Systems alle für die Sicherheitsprüfung relevanten Endpunkte mit aussagekräftigen tierversuchsfreien Prüfstrategien ermittelt werden können, sollten sowohl auf nationaler als

auch auf europäischer Ebene die Förderaktivitäten zur Entwicklung und Validierung tierversuchsfreier Verfahren intensiviert und gezielt im Hinblick auf die Bereitstellung von Methoden zur Erfüllung der Prüfanforderungen der neuen Chemikalienverordnung ausgerichtet und koordiniert werden.

In Verfolgung dieser Ziele können sowohl die Abgeordneten des Europäischen Parlamentes als auch die Mitglieder der zuständigen Ministerräte sowie nationale und europäische Behörden mit ihren jeweiligen Einflussmöglichkeiten einen wesentlichen Beitrag leisten. Anhand konkreter Beispiele und Erfahrungsberichte wird ausgeführt, welche Erwartungen der Deutsche Tierschutzbund in diesem Zusammenhang an die jeweiligen Verantwortlichen stellt.

Vortrag/Lecture

[Efforts in the EU to replace animal experimentation for the determination of shellfish toxins from the point of view of the German Animal Welfare Federation]

Aktivitäten in der EU zum Ersatz von Tierversuchen zur Bestimmung von Muscheltoxinen aus der Sicht des Deutschen Tierschutzbundes

Ursula Sauer

Deutscher Tierschutzbund, D-Neubiberg
E-Mail: ursula.sauer@tierschutzakademie.de

Da Muscheln Algengifte enthalten können, die beim Menschen Magen-Darm- oder sogar bisweilen tödlich verlaufende neurologische Erkrankungen verursa-

chen können, ist EU-weit vorgeschrieben, dass derartige Meeresfrüchte vor der Vermarktung auf ihre Unbedenklichkeit hin geprüft werden müssen. Derzeit ist

hierfür als Standardmethode der so genannte *Mouse Bioassay* vorgeschrieben, mit dem Tod der Tiere als Endpunkt. Jeweils drei Mäusen wird dabei in einer



sehr schmerzhaften Prozedur Muschel-extrakt in die Bauchhöhle injiziert. Anschließend wird anhand der Zeitdauer, die bis zum letzten keuchenden Atemzug der Mäuse verstreicht, die Menge Muscheltoxine in dem Extrakt berechnet. Dieser äußerst belastende Tierversuch ist bislang nie standardisiert oder validiert worden. Zudem gibt es wissenschaftliche Belege dafür, dass er weder aussagekräftig noch zuverlässig ist. Regelmäßig treten sowohl falsch positive als auch falsch negative Testergebnisse auf, zumal bestimmte Toxine in der Maus erst oberhalb für den Menschen gefährlicher Schwellenwerte erfasst werden können.

Daher gibt es in verschiedenen EU-Mitgliedsstaaten Bestrebungen, den Maustest zu ersetzen oder die Tierzahlen

und die Belastung für die Tiere zu reduzieren. So wird der Versuch im Vereinigten Königreich mit zwei anstelle von drei Mäusen durchgeführt, die Tiere werden vor der Verabreichung des Muschelextraktes anästhesiert und verbleiben bis zu ihrem Tod in der Narkose. In Deutschland hingegen wird seit Jahren ohne Einschränkung des Verbraucherschutzes gänzlich auf den Maustest verzichtet. Stattdessen werden die Toxine hier mit physikalisch-chemischen Verfahren nachgewiesen. Derartige Maßnahmen sind nach den Regelungen der Europäischen Versuchstierrichtlinie gesetzlich vorgeschrieben. Dennoch wurden Deutschland und das Vereinigte Königreich von der Europäischen Kommission angemahnt, dass ihre Prüfpro-

gramme nicht mit den Vorschriften zum Muscheltoxin-Nachweis in Einklang stehen.

Offensichtlich besteht hier ein Gesetzeskonflikt zwischen zwei gültigen EU-Richtlinien. Obwohl aber dieses Problem seit Jahren bekannt ist, ist nach wie vor nicht ersichtlich, dass die Europäische Kommission alle Anstrengungen unternimmt, den Konflikt zu lösen. Im Vortrag wird dargelegt, wie Muscheltoxine tierversuchsfrei nachgewiesen werden können, welche Probleme derzeit die EU-weite Abschaffung des *Mouse Bioassay* behindern und welche Voraussetzungen geschaffen werden müssen, um die bestehenden Engpässe überwinden zu können.

Poster

[Primary rat hepatocytes in 96-wells as a basic system for pharmacological testing by high-throughput screening]

Primäre Rattenhepatozyten im 96-well-Kulturformat als Basis für die pharmakologische Testung im Hochdurchsatz-Screening

Ines Schöffner, Julia Petters und Bruno Christ

M.-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I, Bereich Molekulare Hepatologie, ZAMED, D-Halle

E-Mail: ines.schaeffner@epost.de

Neuentwickelte Medikamente bedürfen vor der klinischen Prüfung der sicherheitspharmakologischen Testung gemäß der Richtlinie ICH-S7A. Sie sieht Tierversuche oder *in vitro* Testsysteme vor, sofern sie relevante und statistisch abgesicherte Aussagen zur Pharmakologie und Toxikologie neuer Wirkstoffe liefern. Um die Zahl von Versuchstieren gering zu halten, sollte hier ein Testverfahren entwickelt werden, das im Hochdurchsatz-Screening die Einschätzung der pharmakologisch-toxikologischen Wirkungen neuartiger Medikamente und anderer Xenobiotika erlaubt. Hierzu wurden primäre Rattenleberzellen verwendet, die im 96-well-Format über maximal 9 Tage kultiviert wurden. In definierten Zeitabständen wurden dem serumfreien Medium verschiedene Testsubstanzen wie alpha- oder beta-Naphthoflavon, Phenobarbital, Resveratrol

u.a. zugesetzt und der Einfluss auf die Metabolisierungskapazität von Ethoxy- bzw. Pentoxyresorufin durch Cytochrom P450-Isoenzyme der Subfamilien 1A bzw. 2B fluorimetrisch bestimmt. Die Ergebnisse wurden auf die Proteinkonzentration in den einzelnen wells normiert. So konnte nachgewiesen werden, dass die kurzzeitige Inkubation mit alpha- oder beta-Naphthoflavon die CYP1A1-Aktivität hemmt, Langzeitinkubationen jedoch die Enzyme CYP1A1 und CYP2B1 aktivieren. Die Ergebnisse zeigen, dass mit diesem Testsystem eine zeit- und dosisabhängige Wirkung der getesteten Substanzen nachgewiesen werden kann. Diese stehen im Einklang mit aus der Literatur bekannten Daten. Mit dem Test konnte auch die konzentrationsabhängige Schädigung der Zellen als Maß für die zytotoxische Wirkung der getesteten Substanzen gezeigt werden.

In weiterführenden Untersuchungen wurde der Test an eine PCR-Analytik (quantitative Real-time PCR) angepasst. So ist es möglich, die Wirkung einer Substanz auf jedes beliebige Protein als potenzielles pharmakologisches Target zu untersuchen.

Das hier vorgestellte Kultursystem primärer Hepatozyten im 96-well-Format ermöglicht die schnelle und zuverlässige Testung der zeit- und konzentrationsabhängigen Wirkung neuartiger Stoffe. Es stellt somit eine kostengünstige *in vitro* Methode zur Abschätzung der pharmakologischen und toxikologischen Potenziale eines Wirkstoffes für die Anwendung in der pharmazeutischen, chemischen sowie Kosmetikindustrie dar und bietet eine ethisch vertretbare Alternative zu Tierversuchen im Sinne des 3R-Konzeptes.

Vortrag/Lecture

[DNA fingerprinting for the authentication and coding of human cell lines]

DNA Fingerprinting zur Authentifizierung und Kodierung von humanen Zelllinien

Richard Scheithauer¹, Walther Parson¹, Stefan Schmidt² und Reinhard Kofler^{2,3}

¹Institut für Gerichtliche Medizin, Medizinische Universität, A-Innsbruck, ²Tiroler Krebsforschungsinstitut, Medizinische Universität, A-Innsbruck, ³Division für Molekulare Pathophysiologie, Medizinische Universität, A-Innsbruck

E-Mail: richard.scheithauer@uibk.ac.at

DNA Profiling (synonym: DNA Fingerprinting) dient in der Gerichtsmedizin der Identifizierung von menschlichen Tatortspuren, aber darüber hinaus von DNA-haltigem Material aller Art. Analysiert werden in erster Linie Primatenspezifische Short Tandem Repeats (STR). Die Technik ist, wie gerade Arbeiten aus jüngerer Zeit zeigen, grundsätzlich auch für die Authentifizierung und die Überprüfung auf Kontamination von humanen Zelllinien geeignet und damit ein gutes Mittel zur Qualitätskontrolle.

Die forensische Standard-Methodik ist geeignet, mit 1-3 ng DNA z.B. 11 oder 16 STRs zu analysieren. Die Verwen-

dung von kommerziell erhältlichen Kits hat, abgesehen von den Kosten, zahlreiche Vorteile: Die Loci und Allele sind sequenziert, die Allelfrequenzen und Mutationsraten sind bekannt und es wird die international anerkannte Nomenklatur verwendet. Damit sind die Ergebnisse international vergleichbar und der Gedanke, STR Analysen routinemäßig nicht nur zur internen Qualitätskontrolle einzusetzen, sondern auch zur Errichtung einer Referenz-Datenbank, ist nahe liegend.

Eine Methode zur Qualitätskontrolle muss jedoch erst einmal selbst ihre Validität unter Beweis stellen, und hier ist noch weitere Forschung nötig. Die

Mutationsrate der in der Forensik analysierten Loci kann statistisch berücksichtigt werden. Zusätzliche Probleme für die Zelllinien Überwachung sind aber aus der hohen genetischen Instabilität von Krebszellen zu erwarten. Vorgestellt werden dazu die Daten einer kürzlich abgeschlossenen Studie. Die Ergebnisse zeigen, dass die Auswertung die Definition von Algorithmen und erhebliche Erfahrung erfordert.

Danksagung:

Die Förderung der Ko-Expression von CYP1A2/NAT2 durch BfR/ZEBET sei dankbar erwähnt.

Vortrag/Lecture

[New GenPharmTox technologies :

- Coexpression of CYP1A2 and polymorphic NAT2
- High throughput screening for CYPs]

Neue Technologien aus der GenPharmTox: - Ko-Expression von CYP1A2 und NAT2 (polymorph) - Hochdurchsatzverfahren für CYPs

Jürgen Scheuenpflug, Niels Krebsfänger und Johannes Döhmer

GenPharmTox BioTech AG, D-Planegg/Martinsried

E-Mail: juergen.scheuenpflug@genpharmtox.de

Um das komplexe Zusammenspiel von Phase I- und Phase II-Enzymen, insbesondere den NAT2-Polymorphismus darzustellen, wurden zur Erweiterung der V79-Zellbatterie[®] die humanen polymorphen NAT2-Formen *4, *5B, *6A und *13 sowie humanes CYP1A2 in einen Expressionsvektor kloniert und stabil in V79 Zellen integriert und k-exprimiert. Die Integration intakter

DNA und Transkription dieser DNA in RNA wurden durch verschiedene PCR-Verfahren verifiziert. Die Expression wurde durch *in situ*-Immunfluoreszenz in den Zellen nachgewiesen. Mit Marker-substraten wurden charakteristische Enzymwerte ermittelt. Ausgewählte Klone mit physiologisch relevanten Enzymaktivitäten wurden zur metabolischen und toxikologischen Unter-

suchung verschiedener aromatischer Amine eingesetzt. Die NAT2-Polymorphismus abhängige N-Acetylierung des 2-Aminofluorens zum N-Ac-Aminofluoren wurde ermittelt. Die Prüfung des kooperativen Effektes von CYP1A2 und NAT2 auf die mutagene Wirkung des 2-Aminofluorens ergab eine deutliche Reduzierung der Mutationsrate durch NAT2. Die physiologische Relevanz



der Ergebnisse im Vergleich mit anderen Expressionssystemen wird diskutiert.

Basierend auf einer 96-Lochplatte mit integriertem Fluoreszenzfarbstoff als O₂-Sensor wurde ein Hochdurchsatz-Verfahren zur Messung des CYP-abhängigen Metabolismus von Fremdstoffen

entwickelt. Der gemeinsame Nenner aller CYP-abhängiger Reaktionen ist O₂-Verbrauch, der zur Messung des Metabolismus genutzt wurde. Damit lassen sich aufwändige Analytik-Verfahren zum Nachweis CYP-spezifischer Markerreaktionen ersetzen. Die Repro-

duzierbarkeit des Verfahrens wurde anhand 10 verschiedener CYP-spezifischer Substrate geprüft und bestätigt. Die Entwicklung des Verfahrens bis zum *Proof of Concept* wird ausführlich dargestellt.

Poster

Reduction and replacement of fetal calf serum in the Embryonic Stem Cell Test (EST)

Katharina Schlechter, Roland Buesen, Birgitta Slawik, Horst Spielmann and Andrea Seiler

National Center for Documentation and Evaluation of Alternative Methods to Animal Experiments (ZEBET),
Federal Institute for Risk Assessment (BfR), D-Berlin
e-mail: k.schlechter@bfr.bund.de

The Embryonic Stem Cell Test (EST) is a scientifically validated *in vitro* method to assess the teratogenic/embryotoxic potential of chemicals and drugs. The assay benefits from the fact that under specific culture conditions embryonic stem (ES) cells display the developmental process of early myocardial differentiation. To evaluate the embryotoxic potential of a test compound, the inhibition of differentiation is observed by microscopic analysis of contracting myocardial cells. This toxicological endpoint is compared to the cytotoxic effects of the same substance. Using a biostatistical prediction model (PM) the EST is able to categorise a test chemical as strongly, weakly, or non-embryotoxic.

The EST is a well established and

standardised *in vitro* assay. However, the cell culture medium has to be supplemented with fetal calf serum (FCS) to provide a proper myocardial differentiation. FCS has a great lot to lot variability with regard to its composition, e.g. quantity of proteins, hormones and cytokines, which has an important influence on ES cell differentiation *in vitro*. Although selected FCS batches perform very well in the EST, serum-free culture conditions would provide several advantages: (1) Totally defined culture conditions would simplify the establishment of the EST in other laboratories. (2) Constant amounts of ingredients, e.g. albumin, could afford a reproducible bioavailability of substances and would minimise the variation of results. (3)

Highly standardised culture conditions provide the basis for applying this method in automated screening systems.

In our project several attempts have been made to replace the undefined "black box" FCS in the EST. Chemically-defined substitutes have been tested in combination with different growth factors known to be important for cardiogenesis *in vivo*. First results on the successful induction of myocardial differentiation without the use of FCS will be presented.

In conclusion, a well-defined cell culture medium is an important prerequisite for applying the EST in high-throughput screening systems.

Poster

Histochemical examination of the effects of drugs, detergents and other agents on leukocytes – induction of apoptosis

Hans Schmidt

Institut f. Physiologische Chemie, Medizinische Fakultät, Martin-Luther Universität D-Halle (Saale)
e-mail: poz.schmidt@web.de

Systemic morphological changes in leukocytes after exposure to chemically rather different compounds (like e.g., drugs and detergents) are studied and described. These changes are recorded by the cytochemical detection of phe-

noloxidase (EC 1.14.18.1). They can be ranged into the initial stages of apoptosis. To it belong the formation of small vesicles and their coalescence as well as the development of so-called eye-like cells with variably sized "eyes". Both

phenomena correlate with the fragmentation of the cell nucleus. It is in dispute at present whether the protuberances of eosinophiles in the small intestine of rats correspond to apoptotic alterations. At least these protuberances which



contain in addition to cytoplasm and eosinophil granules fragments of the nucleus remind of amitotic cell divisions. Thus, the phenoloxidase reaction

makes feasible the detection of *in vitro* and *in vivo* apoptotic processes. It reveals that the apoptosis of leukocytes serves mainly the defence. Simultane-

ously, the enzymatic reaction allows *in vitro* to gain insight into the biological effects of compounds when acting on leukocytes.

Vortrag/Lecture

Chemical food safety assessments: a targeted approach for process related contaminants without the use of toxicological studies

Gabriele Scholz

Nestlé Research Center, Quality & Safety, CH-Lausanne
e-mail: gabriele.scholz@rdls.nestle.com

In 2002, the finding of Swedish researchers of considerable levels of acrylamide in food triggered a worldwide effort of research in research laboratories, the food industry and National Food Authorities. The goal was to identify the sources and mechanism of formation of this chemical in food, to develop appropriate analytical methods, to determine levels in food, to evaluate the toxicity of the compound, to estimate the exposure of consumers and, finally, to assess a possible health risk to the consumer. These efforts are still ongoing and will be used early in 2005 by the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives for a final risk assessment.

Acrylamide is formed in food from the reaction of the free amino acid

asparagine with reducing sugars upon heating to high temperatures, mostly in carbohydrate rich foods (French fries, potato crisps, roasted coffee, cereals etc.). Analogous to the mechanism of acrylamide formation, other vinylogous compounds can potentially be formed from any of the other free amino acids present in food.

An approach will be presented that allows the prioritisation of potential processing contaminants with respect to toxicity, exposure and safety based on the following model estimations:

Exposure will be estimated by
(i) computational modelling of contaminant formation, identification of potential contaminants,
(ii) estimation of formation based on

precursor levels in raw materials and estimated conversion rates
(iii) estimation of exposure based on consumption data.

Toxicity will be assessed by
(i) information on chronic toxicity and carcinogenicity from publicly available databases
(ii) in the absence of Information, use of QSAR programs to estimate toxicity and/or mutagenicity
(iii) application of the "Threshold of Toxicological Concern" approach.

We demonstrate in this study that under certain conditions, in the absence of information, a primary evaluation of a safety concern and prioritisation of research needs is feasible without the use of animal experiments.

Vortrag/Lecture

Validation study on percutaneous absorption via human skin models

Sylvia Schreiber¹, Ashraf Mahmoud¹, Alexander Vuia¹, Maria Rübhelke², Martin Schaller², Hans Christian Korting², Elisabeth Schmidt³, Manfred Liebsch³, Frank Netzlaff⁴, Ulrich Schäfer⁴, Claus-Michael Lehr⁴, Frank Niedorf⁵, Manfred Kietzmann⁵, Udo Bock⁶ and Monika Schäfer-Korting¹

¹Institut für Pharmazie, Freie Universität, D-Berlin, ²Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Ludwig-Maximilians-Universität, D-München, ³Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) – ZEBET, D-Berlin, ⁴Saarland University, Dept. of Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, D-Saarbrücken, ⁵Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie, Stiftung Tierärztliche Hochschule, D-Hannover, ⁶Across Barriers GmbH, D-Saarbrücken
e-mail: sschreib@zedat.fu-berlin.de

Recent changes in legislation affecting safety assessment, i.e. the EU White Paper and the 7th Amendment to the EC Cosmetic Directive stimulate the development of *in vitro* tests for risk

assessment. In 2004 the OECD test guideline 428 has been adopted to standardise experiments on cutaneous absorption of cosmetic ingredients and industrial chemicals. Since there is,

however, a clear shortage of human skin for safety testing a current BMBF supported validation study compares essential *in vitro* methods for testing percutaneous absorption to identify the model/s



of best validity, reproducibility, and predictive value with respect to *in vivo* absorption in man. Organotypic human skin models (EpiDermTM, EpiSkin[®], Skinethic[®]) are in the specific scope of this study.

The start-up phase (protocol development) of the study covered the setting and first refinement of test conditions for

the OECD test substances testosterone, caffeine and benzoic acid in human and animal skin as well as in the skin models. Experiments under identical and most strictly controlled test conditions (protocol transfer) clearly demonstrated an improvement of reliability of the results. Moreover, there is a slight tendency to a higher consistency of the data obtained

by the human skin models. This led to the current prevalidation phase. An increased number of test substances covering a large range of logP and molecular weight as well as additional finite dose experiments will generate additional data which should result in a validated method for skin absorption testing.

Vortrag/Lecture

Olympus cell[^]R – imaging station for life cell microscopy

Christian Seel

Olympus BioSystems, D-Planegg

e-mail: christian.seel@olympus-biosystems.com

The Olympus cell family – analySIS[^]B, analySIS[^]D, cell[^]M and cell[^]R – is a family of imaging stations with user-friendly software environments for all fluorescence microscopy applications in the cell and molecular biology field. analySIS[^]B is the basic platform while cell[^]R is the most extensive system, meeting the most demanding requirements for experiments in real time. Just like a real-life family, the members of this product family resemble one another

in appearance. They all have the same “look & feel” and the packages are mutually upgradeable.

cell[^]R is the modular imaging workstation for a broad range of life science experiments for use with the Olympus microscopes of the IX and BX series. The unique all-in-one MT20 illumination system was specially designed for fast wavelength switch and attenuation, meeting requirements for experiments involving real-time acquisition via

highly sensitive digital cameras. All hardware (including peripheral devices) is synchronised by an extremely precise real-time control board. This ensures the greatest accuracy for experiment timing. The cell[^]R software is a powerful and comprehensive platform that features an intuitive and user-friendly graphical drag&drop interface. This makes setting up even complex experiments efficient and convenient.

Vortrag/Lecture

Regulatory use of (Q)SARs in toxicological hazard assessment

Horst Spielmann, Ingrid Gerner, Thomas Hoefler, Manfred Liebsch and Matthias Herzler

ZEBET (National Center for Documentation and Evaluation of Alternative Methods to Animal Experiments) at the BfR (Federal Institute for Risk Assessment), D-Berlin

e-mail: zebet@bfr.bund.de

The New Chemicals policy of the European Commission (REACH = Registration, Evaluation and Authorisation of Chemicals) suggests to replace animal tests for the assessment of acute human health hazards by using information based on (Q)SARs and *in vitro* test results within substance-tailored testing and assessment schemes in order to reduce the costs of testing and the number of test animals employed.

At the BfR, the Competent Authority (CA) for the regulation of the health effects of chemicals in Germany, the authors have compiled a regulatory

database using data on chemicals with a purity >95%, which were submitted within the current notification procedure for New Chemicals of the European Union. We have used this database to develop (Q)SAR rules for the prediction of acute local lesions and for the prediction of skin sensitisation to be used within the new REACH system of the EU.

Some of the(Q)SARs for the prediction of local irritation/corrosion and the SARs for prediction of sensitisation potential were published together with detailed description of the methods used

for their development. These (Q)SARs and an expert system supporting their use will be submitted for official validation and application within regulatory hazard assessment strategies to the European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM).

Main features of the BfR (Q)SAR prediction rules are:

- two sets of structural alerts for the prediction of skin sensitisation hazard classification as defined by the European risk phrase R43, comprising 15 rules for chemical substructures which are sensitising by direct action



with cells or proteins, and 3 rules for substructures acting indirectly, i.e. requiring biochemical transformation.

• a decision support system (DSS) for the prediction of skin and/or eye lesion

potential built from information extracted from our database. This DSS combines SARs defining reactive chemical substructures relevant for local lesions to be classified, and QSARs for the

prediction of the absence of such a potential.

The impact of a potential use of (Q)SARs on current EU testing strategies will be discussed.

Poster

Animal experiments in the context of quality control of medical drugs

Review of the European Pharmacopoeia, 4th edition, 2002

Gisbert Sponer and Franz P. Gruber

SET, D-Mainz

e-mail: info@tierversuche-ersatz.de

In the 4th edition of the European Pharmacopoeia, animal experiments are described, which are required for the quality control of pharmaceuticals. This refers to investigations regarding both biological activity and safety aspects of the medication. The latter include investigations to find contaminations with histamines and pyrogenic substances and tests for abnormal toxicity. Even though the safety of medical drugs is of great importance, it should be examined whether these tests are still indispensable (in terms of § 7 of the German Animal

Protection Law of 2002). The determination of histamine content may also be possible by chemical-analytical methods, which could represent an alternative to the animal experiment. The testing of abnormal toxicity should be scientifically questioned due to its lack of specificity. Although the *in vitro* test detecting bacterial endotoxins is mentioned in many monographs, the *in vivo* test on rabbits to test for pyrogenicity is still mentioned in some other monographs. The *in vivo* test should be rechallenged as to whether it can be replaced. In light of the global

trade in medications, which must also fulfill national quality standards, a reduction in animal experiments can only be reached by fruitful cooperation between pharmaceutical companies, health authorities and the commissions of the pharmacopoeias, leading to the formation of a consensus. The International Conference on Harmonization could prove an auspicious panel to take up this subject and to contribute to an internationally accepted and scientifically based reduction of animal experiments.

Poster

Toxicity evaluation of ocular contact lens solutions

Dagmara Sprudza¹, Leontine Antonovica¹, Marite Bake¹ and Irina Šestakova²

¹Rigas Stradins University, Institute of Occupational and Environmental Health Laboratory of Hygiene and Occupational Diseases, LR-Riga, ²Latvia Institute of Organic Synthesis, LR-Riga

e-mail: dagmara-IOEH@rsu.lv

The toxic effect has been tested on monolayer culture of cells NIH 3T3 (ECACC) (fibroblasts of mouse embryo) for the following solutions:

1. Solution for ocular lens MULTISON (M), made by Henson Ltd.
2. Solution in which the lenses are kept (K-), made by Ocular Sciences Inc.
3. Phenol (K+) 50 mg/ml was tried to the positive control.

The testing of the toxic effect was made according to the Guidance Document on Using *in vitro* Data to Estimate *in vivo* Starting Doses for Acute Toxicity Based on Recommendations from an International Workshop organised by the

Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Centre for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM) National Toxicology Program.

The results are following: Solutions K- is not toxic, and solution M has slight toxicity, inhibitions coefficient IC₅₀ is 37 ml; if solution M is diluted by 20 times, it loses its toxic effect. IC₅₀ for phenols (K+) is 0.6 mg/ml. Solutions K- do not make any effect on cells and morphology. Solution M (50.0 and 15.8 ml) causes the death of cells, but does not

change their morphology. Phenol (K+) increases the death of cells, and changes their morphology.

Irritation effect of solutions for lenses "MULTISON" has been tested on three albino rabbits (body weight of 2-3 kg) according to EN ISO 10993-10 "Biological evaluation of medical devices. Part 10: Tests for irritation and delayed-type hypersensitivity B.3 Ocular irritation test". The conditions for keeping the animals during the test were according to ISO 10993-2 and general animal requirements. After the dropping of solutions both eyes of the animals were tested. They were observed after an hour, then



after 2, 48, 72 hrs and during the period of 21 days. Grade of any reactions was observed in accordance with special system for grading (4 scale) ocular lesions. The following was observed: cornea, area of cornea involved, iris, conjunctivae, chemosis discharge. Ophthalmoscope was used for testing the eyes.

Results: After the testing we have come to conclusion that solution MULTISAN is slightly toxic which corresponds to its disinfectant feature. The solution's leftovers on the lenses cannot make any harm to the eye, as the amount of the solution is naturally diluted into the eyes' mucous membrane. It was

confirmed with the rabbit experiment – during the experiment there was no state of lachrimation, photophobia, swelling of lids, sap and pain in the eyes, opacity of cornea, as well as other inflammatory signs of the eyes or their conjunctives.

Poster

SEFREC: First steps of an interactive database about serum free cell lines

Claudio Strebel

CePower GmbH, CH-Wädenswil
e-mail: c.strebel@cepower.ch

SEFREC is a interactive database to register so much information as possible about serum free cell lines. Periodic updates will be done in order to refresh the database. From different sources data will be collected, controlled and approved for using. In the SEFREC database all information like cell line, medium, suppliers are linked.

The poster shows an example of the process of an input and output of information.

The collected data are cell line, cell bank, applications, media, medium suppliers, kind of medium and scientific reports.

The data will be collected in a new

database management system: SEFREC (=SERum FRee Cell).

SEFREC was created with the software Firebird 1.5.

Firebird is a relational database offering many ANSI SQL-92 features that runs on Linux, Windows, and a variety of Unix platforms. Firebird is a commercially independent project of C and C++ programmers, technical advisors and supporters developing and enhancing a multi-platform relational database management system based on the source code released by Inprise Corp.

To get the newest information contact will be taken with medium and cell line suppliers. Data from existing database

will be integrated if they are updated, for example the database of FOA, InVitrogen and JRH Biosciences.

During the project the database is located on a local server. At the end of the project the whole database will be transferred on a new server. Registered user could use SEFREC as free. As a interactive database, SEFREC will be continuously refreshed thanks to the co-operation with ALTEX.

Acknowledgement: This project is sponsored by Foundation Research 3R, Project number 87-03, duration: 1,5 years. End of the project 2005.

Poster

New cell based analysing system for reduction of animal tests

Elke Thedinga¹, Axel Kob¹, Heiko Holst¹, Andreas Keuer¹, Heiko Palzer¹, Sabine Drechsler¹, Ricarda Niendorf¹, Werner Baumann², Ingo Freund³, Mirko Lehmann³ and Ralph Ehret¹

¹Bionas GmbH, D-Rostock, ²Biophysics Institute, Bioscience Department, University Rostock, D-Rostock,

³Micronas GmbH, D-Freiburg

e-mail: elke.thedinga@bionas.de

It's a matter of common knowledge that preclinical drug development is absolute essential. Useful test systems were developed for high throughput or for high content screening. We developed a cell based system BIONAS®2500 for high content screening that allows to

predict pharmacological and cytotoxic properties of potential new drugs.

Oxygen consumption, acidification and adhesion showed to be important parameters in cell metabolism. Changes of these parameters in dependence of test compounds are evident for metabolic

cell behaviour or for cytotoxic effects. The combination of biological cells and silicon chips with Interdigitated Electrode Structures, Ion Sensitive Field Effect Transistors and Clark-type oxygen sensors create a new living analysing system. The assay can be performed



from a few hours to several days. Its advantage is that physiological parameters can be detected continuously and online during the entire assay time. It is also possible to change the concentration of the test substances during the test phase, e.g. regeneration/recovery effects can

be monitored after displacement of the substance. Therefore, with our BIONAS®2500 analysing system we can generate more information per cell assay than accepted endpoint assays.

A validation for drug screening has been started with some reference chemi-

cals of the MEIC list. Of course, IC_{50} values can be determined with our analysing system. But the BIONAS®2500 system allows a more detailed overview of physiological cell culture experiments.

Vortrag/Lecture

Gene expression monitoring in immunotoxicology – DNA arrays and real time PCR

Helga Tuschl, Christa Nöhammer and Waltraud K. Novak

ARC Seibersdorf Research GmbH, A-Seibersdorf
e-mail: helga.tuschl@arcs.ac.at

The technology of gene expression analysis by microarrays is well suited to characterise immune function and immunopathological processes with special impact in allergy, both for the identification of sensitising agents and the development of new therapeutics. The ARC Seibersdorf research developed different slides for application in biochip technology with unique, propriety hydrophobic and hydrophilic coatings ensuring a high density of reactive groups binding an optimum amount of oligonucleotides or DNA fragments. Our lab concentrated on the development of a pilot array for im-

munotoxicity testing consisting of oligonucleotide probes for 20 different cytokine and chemokine genes. For every gene, three probes at different locations in the coding regions, but as close as possible to the 3' end were designed as 50mer oligonucleotides. The probes were spotted in four replicates per array. Several target labelling methods, different labelling dyes and various slide surfaces were tested. With the 3DNA dendrimere labelling system from Genisphere the gene expression of target genes could be determined in as little as 2 μ g of total RNA. The array was

validated by real-time PCR of the same cytokine genes in dendritic cells treated with different low molecular weight chemicals as a model for chemical sensitisation. The transcriptional activation of IL-1 α , IL-1 β , MIP-1 α , and MIP-2 α by model allergens was detected.

An improved chip is now under development containing oligonucleotides of about 60 immune relevant genes and is being validated in the screening for the immunotoxic potential of chemicals. Results obtained with THP-1 cells and monocyte-derived dendritic cells will be reported.

Poster

Flow-cytometric methods used for *in vitro* cytotoxicity screening

Helga Tuschl and Christina E. Schwab

ARC Seibersdorf Research GmbH, A-Seibersdorf
e-mail: helga.tuschl@arcs.ac.at

Several studies have proved Ekwall's concept of "basal cytotoxicity" showing that human toxicity can be predicted by a test battery of *in vitro* methods. One principal demand for such *in vitro* screening tests is their ease of performance and a high throughput. These objectives are met by flow cytometry as this technique offers the possibility of multiparameter assays of a high number of cells within short time. A protocol on

the determination of cell cycle and apoptosis by propidium iodide staining, apoptosis by annexin V binding, mitochondrial membrane potential with the fluorescent probe JC-1 and DNA strand breaks in apoptotic cells with the TUNEL (= terminal deoxynucleotidyltransferase dUTP nick end labelling) assay was applied. HepG2, YAC-1 and AHH-1 cells were exposed to six compounds (acetaminophen, isoniazid,

digoxin, malathion, paraquat and 2,4-dichlorophenoxy acetic acid) for 24 h and 48 h. In addition, the effect of long-term application of acetaminophen, paraquat and 2,4-dichlorophenoxy acetic acid on cell numbers and induction of apoptosis/necrosis was evaluated in HepG2 cells.

IC_{50} values obtained in the present study were similar to those reported in the MEIC study and the Registry of



Cytotoxicity. The determination of cell death by apoptosis and necrosis during a 28 days repeated dosage testing revealed a high rate of apoptosis induction by the test chemicals.

The results showed that flow cytometric methods are well suited to screen for the cytotoxicity of chemicals, both in adherent cells and in cells grown in suspension. Furthermore, flow-cyto-

metric assays are valuable means for studying mechanisms of toxicity.

Vortrag/Lecture

Skin irritation: mechanistic studies using reconstructed human epidermis

Thomas Welss and Klausrudolf Schröder

VTB-Skin/Hair Physiology, Henkel KGaA, D-Düsseldorf

e-mail: Thomas.Welss@Henkel.com

Skin irritation is the most common, environmentally based, adverse reaction in humans. Symptoms are signs of a complex chain of biochemical and molecular responses following contact to a multitude of various substances. Even though considerable attention has been invested in attempts to understand the underlying mechanisms of skin irritation, to date, the biological responses are still poorly understood. The aim of this study was to evaluate cellular mechanisms of skin irritation *in vitro* using skin equivalents by investigating the roles of cytokines in the onset and regulation of skin irritation. As IL-1 α is im-

portant for the onset of cutaneous inflammation, we treated *in vitro* skin models systemically with recombinant human IL-1 α and examined the supernatants for released, secondary cytokines by ELISA. Thereby, we detected a specific and dose-dependent release of IL-8. Following exposure of epidermis models to surfactants, the secretion profiles and the intracellular abundance of cytokines were monitored at various time-points from 1 to 96 hours. In parallel, we analysed the differential gene expression by two semi-quantitative Multiplex RT-PCR-systems. In summary, 18 hours post-stimulus we deter-

mined an IL-1 α threshold dependent release of the secondary cytokine IL-8. Furthermore, we suggest a molecular recovery phase *in vitro*: after a maximal release of IL-8 at 18 to 24 hours, the epidermis models significantly diminished the release of IL-8, although the concentration of IL-1 α was effectual to induce IL-8 release. Further anti-inflammatory responses seem to be involved in the regulation of secondary inflammatory cytokines.

This studies were supported by an award of COLIPA.

Vortrag/Lecture

***In silico* prediction of receptor-mediated environmental toxic phenomena – application to endocrine disruption**

Markus A. Lill, Max Dobler and Angelo Vedani

Biographics Laboratory 3R, CH-4056 Basel

An objective of our institution is to establish a virtual laboratory to allow for a reliable *in silico* estimation of harmful effects triggered by drugs, chemicals and their metabolites. In the recent past, we have developed the underlying technology (multi-dimensional QSAR: *Quasar* and *Raptor*) and compiled a pilot system including the 3D models of three

receptors known to mediate endocrine-disrupting effects (the aryl hydrocarbon receptor, the estrogen receptor and the androgen receptor, respectively) and validated them against 345 compounds (drugs, chemicals, toxins). Within this set-up we could demonstrate that our concepts are able to both recognise toxic compounds substantially different from

those used in the training set as well as to classify harmless compounds clearly as being non-toxic. This suggests that our approach can be used for the prediction of adverse effects of drug molecules and chemicals.

www.biograf.ch