

- Zeitaufwands für die Tätigkeitsfelder der Tierschutzbeauftragten. *Der Tierschutzbeauftragte* 3/97, 199-203.
- Güttner, J., Bruhin, H. und Heinecke, H. (1993). *Wörterbuch der Versuchstierkunde*. Stuttgart, Jena: G. Fischer Verlag.
- Klein, J. (1999). Die ethische Problematik des Tierversuchs. *Der Tierschutzbeauftragte* 1/99, 3-12.
- Kolar, R. (2000). Die Abwägung der ethischen Vertretbarkeit von Tierversuchen: Theorie und Praxis. *ALTEX* 17, 227-234.
- Labahn, D. und Völkel, M. (1997). Ethisch-rechtliche Aspekte als Orientierung und Entscheidungshilfe über einen Antrag auf Genehmigung eines Tierversuchsvorhabens (431-434). In H. Schöffl, H. Spielmann und H. A. Tritthart (Hrsg.), *Ersatz- und Ergänzungsmethoden zu Tierversuchen; Band IV, Forschung ohne Tierversuche* 1996. Wien, New York: Springer Verlag.
- Lindl, T. (2000). *Zell- und Gewebekultur*, 4. Aufl. Heidelberg, Berlin: Spektrum Verlag.
- Lorz, A. und Metzger, E. (1999). *Tierschutzgesetz. 5. Auflage. Kommentar* (46, 277-278). München: C. H. Beck.
- Nevalainen, T. et. al. (2000). FELASA recommendations for the education and training of persons carrying out animal experiments (Category B). *Laboratory Animals* (2000), 34.
- Rusche, B. (1997) Erste Ergebnisse über eine neue Umfrage bei den Mitgliedern in beratenden Kommissionen nach § 15 Tierschutzgesetz in der Bundesrepublik Deutschland (387-394). In H. Schöffl et al. (Hrsg.), *Forschung ohne Tierversuche* 1996. Wien, New York: Springer Verlag.
- Swindle, M. M. and Adams, R. J. (1988). *Experimental Surgery and Physiology: Induced Animal Models of Human Disease*. Baltimore, USA: Williams and Wilkins.
- Teutsch, G. M. (1994). Zur Typologie ethischer Konzepte in der Mensch-Tier-Beziehung. *Der Tierschutzbeauftragte* 1/94, 22-24.
- Teutsch, G. M. (2000). Mensch und Mitgeschöpf unter ethischem Aspekt. *ALTEX* 17, 163-213.
- TVT (1997). Empfehlung zur ethischen Abwägung bei der Planung von Tierversuchen. *Merkblatt Nr. 50 der Tierärztlichen Vereinigung für Tierschutz*. <http://www.tierschutz-tvt.de/merkblaetter.html>
- Völkel, M. und Labahn, D. (1997). Die Belastung der Versuchstiere nach Einschätzung der Antragsteller von Versuchsgenehmigungen - Forderung von Kriterien zur ethischen Rechtsanwendung (395-405). In H. Schöffl, H. Spielmann und H. A. Tritthart (Hrsg.), *Ersatz- und Ergänzungsmethoden zu Tierversuchen; Band IV, Forschung ohne Tierversuche* 1996. Wien, New York: Springer Verlag.

Korrespondenzadresse

Prof. Dr. Toni Lindl
Institut für angewandte Zellkultur
Balanstr. 6
D-81669 München

* Nach dem Promotionsrecht kann von deutschen Fakultäten der Titel Dr. med. auch an Personen vergeben werden, die nicht Medizin studiert haben.



Linz 2001

10. Kongress über Alternativen zu Tierversuchen, 28.-30. September 2001

7. Jahrestagung der MEGAT – Mitteleuropäische Gesellschaft für Alternativmethoden zu Tierversuchen

Vorläufiges Programm (Stand 3.8.2001)

Freitag, 28.9.2001

► 12:30 Begrüssung

Freie Vorträge I

Vorsitz: **Franz P. Gruber, CH-Zürich**

► 13:00-13:20 **Cornelia B. Reininger, D-München**

The Cell Function Analyser (CFA) – a Physiological *in vitro* Vascular Model

and Potential Alternative to Animal Experiments

► 13:20-13:40 **Karin Weißer, D-Langen** Fortschritte bei der Reduzierung von Tierversuchen in Arzneibuchvorschriften zur Prüfung von Impfstoffen

► 13:40-14:00 **Annette Bartmann, D-Frankfurt**

Die Blut-Hirn-Schranke *in vitro* und

ihre Anwendung: Standardisierung, Validierung und *in vitro* / *in vivo* Korrelation

► 14:00-14:20 **Peter Maier, CH-Münsingen**

ecopa – European Consensus Platform on Alternatives

► 14:20-15:00 **Pause, Poster und Kaffee**

Transgene Tiere und Leidensbewertung Vorsitz: *Claudia Mertens*, CH-Winterthur

► **15:00-15:20 Birgit Salomon**, A-Graz
Das Lebensbilanzmodell zur Bewertung der Leiden transgener Versuchstiere

Recht und Ethik

Vorsitz: *Roman Kolar*, D-Neubiberg

► **15:20-15:40 Friedrich Harrer**, A-Salzburg
Das Unvermögen der Wissenschaft, ethische Regeln zu entwickeln

► **15:40-16:00 Gieri Bolliger**, CH-Zürich
Die rechtliche Erfassung des Tierversuchswesens durch die EU

Stammzellen

Vorsitz: *Susanne Bremer*, I-Ispra

► **16:00-16:20 Andrea Seiler**, D-Berlin
Etablierung molekularer Endpunkte zur Embryotoxizitätsprüfung mit Stammzellen

► **16:20-16:40 Anna M. Wobus**, D-Gatersleben
Humane Stammzellen - Potenzial und Perspektiven

► **16:40-18:00 Poster: Besichtigung der Poster in Anwesenheit der Autoren**

Samstag, 29.9.2001

Ökotoxikologie

Vorsitz: *Manfred Liebsch*, D-Berlin

► **9:00-9:20 Nina Schweigert**, CH-Dübendorf
Entwicklung einer zellulären Testbatterie für einen routinemässigen Einsatz in der aquatischen Ökotoxikologie

► **9:20-9:40 Roland Nagel**, D-Dresden
DarT: Der Embryotest mit dem Zebrafisch *Danio rerio* – ein allgemeines Modell in Ökotoxikologie und Toxikologie?

► **9:40-10:00 Thomas Zechmeister**, A-Wien

Comparison of the Mouse Bioassay with Suggested Alternatives (PCR, ELISA) for Botulinum Neurotoxin C1 Detection in Environmental and Veterinary Samples

Standardisierung von Zellkulturen Vorsitz: *Walter Pfaller*, A-Innsbruck

► **10:00-10:10 Thomas Hartung**, D-Konstanz
Good Cell Culture Practice (GCCP) for the Standardisation and Quality Assurance of *in vitro* Studies

► **10:10-10:30 Bettina Husen**, D-Göttingen
Immortalisierung von ovariellen Granulosa- und Thekazellen des Weißbüschelaffen (*Callithrix jacchus*)

► **10:30-10:50 Gerhard Gstraunthaler**, A-Innsbruck
Serumfreie Zellkultur

► **10:50-11:10 N.N.**
Ethische, wissenschaftliche und ökonomische Probleme bei der Gewinnung von foetalem Kälberserum für die Zellkultur

► **11:10-11:40 Pause, Poster und Kaffee**

► **11:40-13:00 Poster: Besichtigung der Poster in Anwesenheit der Autoren**

► **13:00-14:30 Mittagspause**

Pharmakologie und Toxikologie

Vorsitz: *Horst Spielmann*, D-Berlin

► **14:30-14:50 Inga Ast**, D-Berlin
Normotherme Hämoperfusion isolierter Schweineherzen: Standardisierung eines neuen Modells für elektrophysiologische Messungen mit dem Schwerpunkt QT-Streckenmessung

► **14:50-15:10 Wilhelm Haverkamp**, D-Münstern
In vitro-Methoden zur Erfassung reproduktionsverlängernder Effekte von Pharmaka in der Sicherheitspharmakologie

► **15:10-15:30 Niels Krebsfänger**, D-Planegg/Martinsried
Mit der richtigen Substanz in den Men-

schen: Die V79-Zellbatterie™ in der industriellen Praxis

► **15:30-15:50 Willi Halle**, D-Berlin
Renaissance der Zytotoxizitätsprüfung als Ersatzmethode zur LD₅₀

► **15:50-16:30 Pause, Poster und Kaffee**

► **16:30-17:30 Postersession I**
Vorsitz: *Peter Maier*, CH-Münsingen

Diskussion ausgewählter Poster

► **18:00 MEGAT-Mitglieder-versammlung**

► **19:00 Abfahrt zum Abendempfang**

► **20:00 Empfang am Pöstlingberg**

Sonntag, 30.9.2001

Freie Vorträge II

Vorsitz: *Peter Maier*, CH-Münsingen

► **9:00-9:20 Thomas Montag**, D-Langen
Vergleich des alternativen Pyrogentests mit humanem Vollblut mit dem Kaninchen-Pyrogentest

► **9:20-9:40 Stefan Fennrich**, D-Konstanz
Neue Einsatzbereiche des Vollblutpyrogentests zum Ersatz des Kaninchenversuchs: Medizinprodukte/Biokompatibilität

► **9:40-10:00 Isabella Sieber**, CH-Zürich
Replacement of Mouse and Rat Antibody Production (MAP/RAP) Test by Polymerase Chain Reaction Assays

► **10:00-10:20 Uwe Nickel**, D-Bonn
Xenotransplantationsforschung - Eine Annäherung aus Sicht des Tierschutzes

► **10:20-11:00 Pause, Poster und Kaffee**

Die neue Chemikalienpolitik der EU Vorsitz: *Manfred Liebsch*, D-Berlin

► **11:00-11:20 Rüdiger Bias**, D-Ludwigshafen



Die neue Chemikalienpolitik der EU: Konsequenzen für die Industrie

► **11:20-11:40 Ursula Sauer,**
D-Neubiberg

Die neue EU-Chemikalienpolitik: Chance für tierversuchsfreie Verfahren?

► **11:40-12:00 Horst Spielmann,**
D-Berlin

The New EU Strategy for a Future Chemicals Policy (White Paper): Evaluation of Progress from a Regulator's Point of View

Informationsbeschaffung über das Internet

Vorsitz: **Horst Spielmann, D-Berlin**

► **12:00-12:20 Barbara Grune, D-Berlin**
Suchstrategien nach 3R-Methoden im Internet

► **12:20-13:00 Postersession II**
Vorsitz: **Thomas Hartung,**
D-Konstanz

Diskussion ausgewählter Poster

► **13:00 Preisverleihungen**

► **13:10 Ende der Tagung/**
Schlussworte

Freitag, 28. September 2001:

Ars Electronica Center

Exklusiv für Sie haben wir eine 1,5 stündige Sonderführung im Ars Electronica Center, dem Museum der Zukunft, organisiert. Fünf Stockwerke zum Kennenlernen, Ausprobieren, Angreifen, Spielen, Selbstgestalten und Lernen.

Beginn: 20.00 Uhr, Treffpunkt beim Ars Electronica Center (AEC)

Preis: pro Person: ATS 350,-/Euro 25,44 (!!! Mindestteilnehmeranzahl: 25 Personen !!!)

Bitte unbedingt anmelden. Ohne genügend Anmeldungen findet die Sonderführung nicht statt.



Vortrag

Normotherme Hämoperfusion isolierter Schweineherzen: Standardisierung eines neuen Modells für elektrophysiologische Messungen mit dem Schwerpunkt QT-Streckenmessung

Inga Ast, Eckhard Mothes, Dagmar Heydeck, Susanne Wagner und Bruno Christ
Mediport Biotechnik GmbH, D-Berlin
E-mail: ast@mediport.net

Einleitung

Das proarrhythmische Risiko von Arzneimitteln ist in den letzten Jahren intensiv diskutiert worden. Daher hat das CPMP (Committee for Proprietary Medicinal Products) die sorgfältige Überprüfung des QT-Intervalls verlängernden Potentials besonders von primär nicht herzwirksamen Substanzen gefordert (CPMP/986/96). Die Mediport Biotechnik GmbH hat das isoliert normotherm hämoperfundierte Schweineherz als standardisiertes *in vitro* Testmodell für elektrophysiologische Messungen am Herzen etabliert. Vorge stellt werden die Ergebnisse der Studien zur Entwicklung eines standardisierten EKG-Messplatzes.

Material und Methoden

Es wurden Herzen von weiblichen weißen Schlachtschweinen mit einem Lebergewicht von 70 bis 100 kg und ei-

nem Herzgewicht von 300 bis 500 g verwendet. Die Konservierung erfolgte mit Kardioplegielösung bei 4°C. Die Herzen wurden mit autologem Blut (38°C) reperfundiert. Die Messung der elektrophysiologischen Parameter erfolgte mit einem 12-Kanal-EKG in Anlehnung an Wilson und Einthoven. Zur elektrophysiologischen Charakterisierung des Modells wurden 9 Herzen 4 Stunden perfundiert. Bei neun Herzen wurde entweder Sotalol oder Lidocain verabreicht. Sechs dieser Herzen wurden während 3,5 h Perfusion mit zwei Konzentrationen Sotalol behandelt. Weitere drei Herzen erhielten 6 µg/ml Lidocain.

Ergebnisse

Nach einer Anpassungsphase von 60 Minuten blieben bei Perfusion ohne Sotalol-Verabreichung (n=9) die Werte für QT und QRS bis zum Versuchsende stabil. Die Zu-

gabe von Sotalol führte zu einer konzentrationsabhängigen Verlängerung des QT-Intervalls um 29 ± 12 ms (entspricht 9 ± 4 %) nach 4 µg/ml Sotalol, bzw. 47 ± 16 ms (entspricht 15 ± 6 %, alle Angaben als Mittelwert $\pm$ SEM) nach 8 µg/ml Sotalol. Bei einem Herz konnten nach Gabe von Sotalol Torsades des Pointes-Arrhythmien beobachtet werden, ein Herz zeigte Tachyarrhythmien, drei Herzen entwickelten Bradyarrhythmien. Bei den mit Lidocain behandelten Herzen kam es zu keiner Zunahme der QT-Zeit.

Diskussion

Mit einer Perfusionsdauer von 4 Stunden ist das Modell des isoliert hämoperfundierten Schweineherzens über einen deutlich längeren Zeitraum stabil als Langendorff-perfundierte Kleinsäugerherzen (Perfusionsdauer maximal 2 h). Dies ermöglicht bei der Beurteilung von möglichen kardialen Effekten von Arzneimitteln einen längeren Beobachtungszeitraum nach Substanzverabreichung. Die gewonnenen Daten korrelieren gut mit *in vivo* sowie *in vitro* Studienergebnissen unter Einsatz von Sotalol. Für den Einsatz als Standard-Testmodell sprechen die sehr gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, die physiologische und anatomische Ähnlichkeit des Schweine- mit dem Menschenherzen und die Reduktion von Tierversuchen.

Vortrag

Die Blut-Hirn-Schranke *in vitro* und ihre Anwendung: Standardisierung, Validierung und *in vitro*-/*in vivo*-Korrelation

Annette Bartmann, Meik Sladek, Tanja Schimpf, Bianka Lorenz, Bernd Eilbacher und Woitek Danysz

Merz Pharmaceuticals GmbH, Präklin. Forschung & Entwicklung, D-Frankfurt/M.

E-mail: anette.bartmann@merz.de

Zu seiner Versorgung mit Energie- und Aufbaustoffen wird das Gehirn von einem dichten Netz aus Blutgefäßen umschlossen, und innerhalb der feinen Kapillaren liegt anatomisch die sog. Blut-Hirn-Schranke (BHS). Die Innenseite der Kapillaren wird dabei von hochspezialisierten und -differenzierten Endothelzellen ausgekleidet, die untereinander sehr feste Zell-Zellkontakte ("tight junctions") bilden. Von den Zellen des Kapillarendothels, umgeben von einer Basalmembran sowie engangliegenden Astrozytenfortsätzen auf der Hirnseite, werden jedoch eine Anzahl von spezifischen Proteinen exprimiert, die für metabolische, protektive und Transport-Eigenschaften der BHS verantwortlich sind. Man kann die BHS demzufolge als regulatorisches Interface betrachten, das den Stofftransport in das und aus dem Gehirn kontrolliert. Während die Durchlässigkeit der BHS für hydrophile Substanzen und Ionen sehr gering

ist, können lipophile Substanzen die BHS leichter überwinden. Eben diese Barriere, die prinzipiell einen Schutz vor raschen Milieuveränderungen und toxischen Substanzen für das äußerst empfindliche Gehirn bietet, kann aber unter Umständen ein ernsthaftes Problem darstellen, wenn Wirkstoffe und Medikamente das Gehirn zur Behandlung pathologischer Zustände erreichen sollen. Da in den letzten Jahren, bedingt durch die Zunahme neuropathologischer Erkrankungen, die Forschung in diese Richtung verstärkt wurde, besteht ein steigender Bedarf an Modellen, die die „Hirnverfügbarkeit“ von Substanzen zuverlässig überprüfen können. Bisher wurden diese Untersuchungen fast ausschließlich an sehr aufwändigen Tiermodellen durchgeführt, die direkt die „Hirnverfügbarkeit“ messen oder aber anhand der pharmakologischen Wirkung einen Rückschluß auf die Wirksamkeit zulassen.

Ziel unserer Untersuchungen war daher, ein *in vitro*-Modell der BHS zu etablieren, das

- die strukturellen und funktionalen Eigenschaften und Charakteristika der BHS *in vivo* exprimiert
- zur Überprüfung der Hirngängigkeit von ganz unterschiedlichen Substanzen eingesetzt werden kann
- eine gute Aussagekraft und relevante Vorhersage gewährleistet (*in vitro*-/*in vivo*-Korrelation)

Durch die Anwendung spezieller Methoden wie Mikrotrypsinierung, Kryokonservierung und Co-Kultivierung von Kapillarendothel und Astrozyten ist es gelungen, ein Zellkulturmodell der BHS *in vitro* zu etablieren, das die *in vivo*-Situation sehr gut simuliert.

Die Standardisierung und Validierung des BHS-Modells wurde anhand zahlreicher Parameter und verschiedener Substanzen (Modellsubstanzen, Entwicklungssubstanzen, Medikamente) vorgenommen, der Transport dieser im BHS-*in vitro*-Modell bestimmt und mit *in vivo*-Daten verglichen (Tiermodell des maximalen Elektroschocks, MES). Der Vergleich weist eine sehr gute Übereinstimmung und somit eine valide Vorhersagekraft des *in vitro*-Modells auf.

Projektförderung durch das BMBF (FKZ 0311466A)

Vortrag

Die rechtliche Erfassung des Tierversuchswesens durch die EU

Gieri Bolliger

CH-Zürich

E-mail: gieri.bo@bluewin.ch

Die tierexperimentelle Forschung wird durch die Legislatur der Europäischen Union nur partiell erfasst. Verbindliche Normen finden sich in verschiedenen Erlassen des EU-Rechts, hauptsächlich aber in der sog. Tierversuchsrichtlinie 86/609/EWG des Rates vom 24.11.1986 zur Annäherung der Rechts- und Verwaltungsvorschriften der Mitgliedstaaten zum Schutz der für Versuche und andere wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere. Die Richtlinie stellt jedoch keine ei-

gentliche Tierschutz-, sondern vielmehr eine Harmonisierungsmassnahme dar, deren primäres Ziel in der Vereinheitlichung mitgliedstaatlicher Bestimmungen liegt, damit diese nicht zu – für das Funktionieren des Gemeinsamen Markts nachteiligen – Wettbewerbsverzerrungen oder Handelshemmnissen führen.

Der Geltungsbereich der Tierversuchsrichtlinie, die lediglich Hauptziele festlegt und den einzelnen EU-Staaten erheblichen Spielraum in der nationalen Umsetzung

lässt, ist in verschiedener Hinsicht eingeschränkt. Einerseits werden nur Eingriffe an Wirbeltieren erfasst, andererseits findet der Erlass einzig auf kommerzielle Experimente Anwendung, die der „Entwicklung, Herstellung, Qualitäts-, Wirksamkeits- und Unbedenklichkeitsprüfung von Arzneimitteln, Lebensmitteln und anderen Stoffen oder Produkten“ oder dem „Schutz der natürlichen Umwelt im Interesse der Gesundheit oder des Wohlbefindens von Mensch und Tier“ dienen. Von wenigen Spezialfällen abgesehen gilt die Richtlinie somit lediglich im Bereich der angewandten Forschung und schützt ausschliesslich Tiere, die zur Stoff- und Produktentwicklung und -prüfung sowie im Rahmen des Umweltschutzes verwendet werden.

Verschiedene bedeutende Forschungsgebiete werden hingegen mangels Binnenmarktrelevanz von einer unionsweiten

Regelung von vornherein ausgeklammert und primär der nationalen Regelung zugewiesen. Hiervon betroffen sind neben Tierexperimenten im Rahmen der Lehre und studentischen Ausbildung sowie für militärische und sog. wehrmedizinische Zwecke insbesondere auch die gesamte Grundlagenforschung einschliesslich dem

stetig an Bedeutung gewinnenden Bereich der Gentechnologie an Tieren.

Der Umstand, dass viele Forschungsgebiete der Tierversuchsrichtlinie nicht unterstehen, führt in der Praxis nicht nur zu unterschiedlichen nationalen Regelungen, sondern mitunter auch zu unter tier-schützerischen Gesichtspunkten inakzep-

tablen Missständen. Der Vortrag wird sich mit den Möglichkeiten und kompetenzrechtlichen Grenzen einer Ausweitung des Anwendungsbereichs des Erlasses auf das gesamte Gebiet der tierexperimentellen Forschung sowie allfällig notwendigen flankierenden Massnahmen und Änderungen im Vertragswerk der EU befassen.

Vortrag

Neue Einsatzbereiche des Vollblutpyrogentests zum Ersatz des Kaninchenversuchs: Medizinprodukte/Biokompatibilität

Stefan Fennrich, Karin Kullmann, Albrecht Wendel und Thomas Hartung
Universität D-Konstanz

E-mail: Thomas.Hartung@uni-konstanz.de

Hintergrund dieses neuen Testsystems ist die Prüfung auf Freiheit von Pyrogenen (fieberauslösenden Kontaminationen) in injizierbaren Arzneimitteln. Als „Goldener Standard“ ist der Versuch am Kaninchen in internationalen Regelwerken vorgeschrieben. Der Vollblutpyrogentest (VBT) macht sich das Wissen zunutze, dass das nach Stimulation durch Pyrogene von Blut-Monozyten ausgeschüttete Zytokin Interleukin-1 β (IL-1 β) die Fieberreaktion des Organismus auslöst. Die Probe wird mit einer kleinen Menge humanen Vollbluts inkubiert. Bei Anwesenheit von irgendwelchen pyrogenen Verunreinigungen wird IL-1 β ausgeschüttet, die-

ses wird im ELISA detektiert. Der in der Routine etablierte Limulus-Test (LAL) detektiert dagegen lediglich Endotoxine Gram-negativer Bakterien. Für Medizinprodukte eingesetzt kann er nur in einem Eluat (durch Auswaschen des Materials erhaltene Lösung) enthaltenes Endotoxin erfassen. Dieses wird i.d.R. im LAL-Test geprüft, der regelmäßig mit dem Kaninchen-Pyrogentest abgeglichen werden muss. Direkt können Materialien nur durch Implantation in ein Versuchstier auf Verträglichkeit mit einem Organismus geprüft werden. Der Vollbluttest könnte hier zu einer Reduktion von Versuchstieren führen, indem zunächst die Entzündungsreaktion *in vitro* durch Blutkontakt mit der relevanten Spezies untersucht wird.

Mit diesem Hintergrund wurde der VBT für Prüfung von Medizinprodukten/Biomaterialien adaptiert. Filtermaterial (Nitrozellulose), Zellkultur-, Plastikware (Polypropylen, Polystyrol) und Alginat (Mikroverkapselungen), Knochenersatzstoffe und Wundefliese wurden u.a. getestet. Dabei können sowohl die Ausgangssubstanzen in Form einer Lösung oder eines Pulvers als auch das Material selber durch direkten Kontakt geprüft werden. Der VBT misst in der richtigen Spezies mit dem Vorteil, auch Nicht-Endotoxine (breites Spektrum) zu erfassen. Der direkte Kontakt limitiert zudem nicht auf auswaschbare Pyrogene.

Somit besteht die Aussicht, dass auch in Regelwerken für Medizinprodukte vorgeschriebene Pyrogentests am Kaninchen sinnvoll durch die neue Vollblutmethode ersetzt werden können. Entsprechende Bemühungen zur Aufnahme in die ISO 10993 sind im Gange.

Vortrag

Suchstrategien nach 3R-Methoden im Internet

Barbara Grune, Antje Dörendahl, Susanne Skolik und Horst Spielmann

Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch (ZEBET), Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV), D-Berlin

E-Mail: grune.zebet@bgvv.de

Das Tierschutzgesetz fordert von den Wissenschaftlern zur Vorbereitung von Tierexperimenten die Ausschöpfung aller Informationsmöglichkeiten und die Diskussion der Literatur; es soll nachvollziehbar darlegt werden, was unternommen wurde, um Tierversuche zu ersetzen, die Tierzahlen zu reduzieren und das Leiden der Tiere im Versuch zu mindern.

Wird das Informationsangebot im Internet diesem Anspruch gerecht? - Zur Beantwortung dieser Frage werden als erstes in einer Übersicht die derzeit verfügbaren Informationsquellen für Alternativmethoden im Internet dargestellt. Neben den klassischen bibliographischen Datenbanken gehören dazu z.B. spezielle Faktendatenbanken und Webseiten. Darauf

aufbauend werden unter Berücksichtigung der grundsätzlichen Regeln für Recherchen (*Information Retrieval*) die verfügbaren *Web-Search*-Möglichkeiten und die sich daraus ergebenden Suchstrategien nach 3R-Methoden im Internet diskutiert.

ZEBET führt seit seiner Gründung 1989 im Rahmen seines Informationsdienstes Recherchen nach Alternativmethoden durch. Die Erfahrungen von 12 Jahren Recherchearbeit werden zusammenfassend dargestellt. Abschließend wird über aktuelle Forschungsthemen berichtet. Dazu gehören Projekte, die sich mit der Indexierung von Informationen für Alternativmethoden befassen.

Vortrag

Serumfreie Zellkultur

Gerhard Gstraunthaler

Institut für Physiologie, Universität A-Innsbruck

E-mail: gerhard.gstraunthaler@uibk.ac.at

Werden Zellen aus dem Gewebsverband entnommen und in Kultur gebracht, müssen vornehmlich durch das Kulturmedium jene Umgebungsbedingungen geschaffen werden, welchen die Zelle *in vivo* ausgesetzt war. Zur optimalen Kultivierung, d.h. zu Wachstum, Proliferation und zell-spezifischen Differenzierung *in vitro*, benötigen eukaryonte Zellen tierischen und humanen Ursprungs den Zusatz von Serum.

Mit dem Serum werden notwendige Hormone und Wachstumsfaktoren, Anheftungsfaktoren und Komponenten der extrazellulären Matrix, Bindungs- und Transportproteine, Plasmalipide, sowie Vitamine und Spurenelemente in das Kulturmedium eingebracht. Neben tierischen Seren unterschiedlichen Entwicklungsstadiums und Alters der Tiere (fetal, neugeboren oder adult) kommen auch Seren verschiedener Spezies (Rind, Pferd,

Schwein, Ziege, Mensch, etc.) zum Einsatz. Die Verwendung von Serum birgt jedoch auch eine Reihe von Nachteilen. Serum ist ein undefinierter Mediumzusatz, die genaue Zahl der Inhaltsstoffe ist bis heute nicht bekannt. Auch die quantitative Zusammensetzung, sowohl der einzelnen Serumarten wie auch der jeweiligen Chargen ein und desselben Serums, unterliegen starken Schwankungen. Trotz höchster Qualitätsstandards können im weiteren unbekannte Viren, Mykoplasmen oder Prionen in Seren enthalten sein.

Um die qualitativen und quantitativen Schwankungen der Serumzusammensetzung zu vermeiden und damit definierte Kulturbedingungen zu schaffen, wurde einerseits nach einem Serumersatz gesucht und andererseits versucht, einzelne Serumbestandteile, wie Hormone oder Wachstumsfaktoren in gereinigter Form einem serumfreien Medium zuzusetzen. Dies

führte zur Entwicklung von serum-freien, sog. definierten Medien.

Serumfreie Medien sind heute für eine Vielzahl von Primärkulturen und Zelllinien beschrieben. Dabei werden einem chemisch definierten Basalmedium gereinigte oder auch gentechnisch hergestellte, rekombinante Hormone und Wachstumsfaktoren zugegeben. Bindungs- und Transportproteine sowie Spurenelemente sind ebenfalls identifiziert worden. Auch langkettige ungesättigte Fettsäuren sind als essentielle Mediensupplemente beschrieben. Die über das Serum eingebrachten Anheftungsfaktoren und Komponenten der extrazellulären Matrix müssen in manchen Fällen durch entsprechende Beschichtung der Kulturgefäße bzw. Wachstumsunterlagen bereitgestellt werden.

Die Entwicklung serumfreier Kulturmedien eröffnete neue Perspektiven in der Zell- und Gewebekultur. Tierisches Serum kann heute vollständig ersetzt werden. Die genaue Kenntnis der Ansprüche spezifischer Zelltypen an mitogene Faktoren und Hormone erlaubt gezielte Einblicke in die endokrine Regulation von Zellstoffwechsel und -proliferation und ermöglicht die spezifische Selektion verschiedener Zellarten unter serum-freien, chemisch definierten Kulturbedingungen.

Vortrag

Renaissance der Zytotoxizitätsprüfung als Ersatzmethode zur LD₅₀

Willi Halle und Manfred Liebsch

Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch (ZEBET), Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV), D-Berlin

E-Mail: liebsch.zebet@bgvv.de

Auf Initiative des US amerikanischen Umweltverbandes EDF und der Umweltbehörde EPA sollen in den USA bis zum Jahr 2004 für ca. 1500 sogenannte Altstoffe (Chemikalien, die bereits vor 1980 auf dem Markt waren) mit einer Jahresproduktion über 10.000 Tonnen toxikologische Grunddaten erhoben werden, zu denen unter anderem die Abschätzung der akut oralen Toxizität gehört. Für die Bestimmung der akut oralen Toxizität stand früher nur die LD₅₀ Methode (OECD 401) zur Verfügung; heute existieren drei aner-

kannte *in vivo* Alternativmethoden, und zwar die *Fixed-Dose-Procedure* (FDP, OECD 420), die *Acute-Toxic-Class Method* (ATC, OECD 423) und die *Up-and-Down-Procedure* (UDP, OECD 425). Die Einsparung an Versuchstieren ergibt sich bei den beiden letztgenannten Verfahren durch eine konsekutive Dosierung, d.h. man nähert sich schrittweise dem „wahren“ Wert der LD₅₀ (UDP) oder schrittweise der auf der LD₅₀ basierten Giftigkeitsklasse (ATC). Das Ergebnis jeder Dosierung wird abgewartet, bevor die nächste

(gleiche, niedrigere oder höhere) Dosierung vorgenommen wird. Dabei ist die Zahl der notwendigen aufeinander folgenden Schritte klein, wenn die Startdosis dicht an der „wahren“ LD₅₀ liegt, und wird um so größer, je weiter entfernt von der wahren LD₅₀ man das Experiment startet.

Wir haben daher vorgeschlagen, das mehrfach publizierte und dabei immer wieder reproduzierte lineare Regressionsmodell zur Vorhersage akut oraler Toxizität aus *in vitro* Daten dazu zu verwenden, die optimale Startdosis für die ATC und die UDP zu ermitteln, um den Tierversuch mit der geringst möglichen Versuchstierzahl durchzuführen. Auf einem im Oktober 2000 abgehaltenen öffentlichen Workshop der US-Bundesbehörden, veranstaltet von ICCVAM, hat sich eine der vier Arbeitsgruppen intensiv mit der Analyse dieses Ansatzes befasst, mit dem Ergebnis, dass in beiden Verfahren (ATC und UDP) bis zu 40% der Tiere eingespart werden können. US Laboratorien wurden

daher aufgefordert, auf der Basis eines von uns verfassten "Guidance Document" mit einem *in vitro* Standard Zytotoxizitätstest (Neutralrot Aufnahme Test) zunächst eine Abschätzung der LD₅₀ vorzunehmen und damit den Tierversuch zu starten. Durch unabhängige Tests in den USA (an Primär-

zellen und einer Zelllinie) mit Referenzstoffen wurde im Frühjahr 2001 das Vorhersagemodell bestätigt. Damit hat nicht nur das Konzept des Einsatzes von Daten zur basalen Zytotoxizität an Bedeutung gewonnen, sondern es wird endlich unter standardisierten Bedingungen eine harte

in vitro *in vivo* Datenbasis erzeugt. Auf lange Sicht planen die US Behörden sogar die Validierung einer *in vitro* Testbatterie, die eine genauere Vorhersage der akut oralen Giftigkeit erlaubt, sodass die Tierversuche eventuell ganz ersetzt werden können.

Vortrag

Das Unvermögen der Wissenschaft, ethische Regeln zu entwickeln

Friedrich Harrer

Universität A-Salzburg

E-mail: Theresa.Pfeifenberger@sbg.ac.at

I Das Postulat: eine angewandte Weltethik, die menschliches Handeln würdigt, prüft und gegebenenfalls verhindert.

Niemand wird behaupten, dass es diese Weltethik gibt; ebenso wird niemand bezweifeln, dass ein derartiges *Korrektiv* dringend benötigt würde.

Die Forderung, eine angewandte Weltethik zu schaffen, ist nicht neu. Konrad Lorenz hat ihre Unverzichtbarkeit vor allem mit dem Zusammentreffen zweier Faktoren begründet: Durch den Tod Gottes sind auch ethische Bindungen weggefallen; das dadurch entstandene Vakuum ist deshalb so gefährlich, weil die Naturwissenschaften den menschlichen Handlungsspielraum ins Grenzenlose erweitert haben.

II Gründe, die das Fehlen einer angewandten Weltethik erklären könnten

1) Die moderne Auseinandersetzung (20. Jh.) mit Fragen der Ethik erfolgte oft akademisch; die großen Probleme der Menschheit (Krieg, Verhältnis zur Mit- oder Umwelt usw.) standen nicht im Vordergrund (Albert Schweitzer repräsentiert insoweit die Ausnahme). Beispiel: Die umfassendste philosophische Ethik des 20. Jhs. („Ethik“, 4. Auflage 1962) von Nicolai Hartmann ist 821 Seiten stark. Das Wort „Tierschutz“ kommt darin nicht vor.

2) Die zeitgenössische „angewandte Ethik“ zerfällt in zahllose „Bereichsethiken“ (vgl. etwa Nida-Rümelin, Hrsg, Angewandte Ethik - Die Bereich-

sethiken und ihre theoretische Fundierung, 1996). So existiert z.B. auch ein Teilgebiet „Wirtschaftsethik“ oder „Wissenschaftsethik“. Diese Teilethiken erfüllen indes nur ancillarische Funktion; ihre praktische Bedeutung ist bescheiden.

3) Das Engagement der Wissenschaftler für ethische Fragen ist (insgesamt betrachtet) gering. Über Ursachen kann man nur spekulieren. Die Konzentration auf „das eigene Fach“ spielt wohl eine Rolle; Gleichgültigkeit gegenüber „dem Rest der Welt“ lässt sich nicht selten beobachten (der Nobelpreisträger Karl von Frisch empfand den Anschluss Österreichs an das Deutsche Reich im März 1938 wegen des Wegfalls der Zollschranken als „Erleichterung, besonders wenn man häufig wissenschaftliche Apparate oder gar Bienenvölker mitzunehmen hatte“; Nicolai Hartmann bemerkte im Vorwort zur dritten Auflage seiner „Ethik“, die er im Jahr 1949 publiziert hatte, dass „die Unruhe des letzten Jahrzehnts einer Umarbeitung nicht günstig war“).

Vortrag

Good Cell Culture Practice (GCCP) for the Standardisation and Quality Assurance of *in vitro* Studies

Thomas Hartung¹ and Gerhard Gstraunthaler²

¹Biochemical Pharmacology, University of D-Konstanz

²Institute of Physiology, University of A-Innsbruck

E-mail: Thomas.Hartung@uni-konstanz.de

The cultivation of eukaryotic cells has become a powerful technique in basic cell and molecular biological research, pharmacology, toxicology, applied biotechnology and *in vitro* alternatives. Despite the widespread use and broad applications of cell and tissue cultures, *in vitro*

work is carried in very different ways by tissue culture laboratories. Therefore, Good Cell Culture Practice aims to guide tissue culture laboratories towards the mandatory quality assurance, such as well defined and precisely described culture protocols for optimal communication

and reproduction of culture conditions, and for making possible any interlaboratory comparability of data and scientific results obtained with cultured cells. The maintenance of high standards is fundamental to all good scientific practice, and is essential to securing the reproducibility, credibility, acceptance and proper application of any results produced. Therefore, also in cell and tissue culture, minimal requirements for quality standards have to be defined.

This work was initiated at the 3rd World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, I-Bologna, 1999 (Gstraunthaler and Hartung, 1999; Hartung and Gstraunthaler, 2000; Hartung et al., 2000), and pursued as a task force installed by ECVAM, the Eu-

ropean Centre for the Validation of Alternative Methods. The issues and topics that have been stressed by these guidelines are as follows: (a) origin and nomenclature of cultured cells in use, (b)

basal characterisation of cell culture systems and maintenance of differentiated functions, (c) culture media, culture conditions and handling of cell culture systems, (d) storage of cells, cell culture

collections and cell line banking, (e) education and training of cell culture personell, (f) safety, (g) patenting and (h) ethical issues. Here, a summary of the current status of elaboration is given.

Vortrag

In vitro Methoden zur Erfassung repolarisationsverlängernder Effekte von Pharmaka in der Sicherheitspharmakologie

Wilhelm Haverkamp

Universitätsklinikum Münster, Medizinische Klinik und Poliklinik, Kardiologie und Angiologie, D-Münster

E-mail: haverkw@uni-muenster.de

Die Verlängerung der myokardialen Repolarisation durch Medikamente, die sich in einer Verlängerung des QT-Intervalls im Oberflächen-EKG widerspiegelt, hat in jüngster Zeit viel Aufmerksamkeit erregt. Zwar werden schon seit langem Medikamente, die eine QT-Verlängerung bewirken, bei der Behandlung von Rhythmusstörungen eingesetzt (z.B. Chinidin, Sotalol, Amiodaron). Es gibt allerdings auch zahlreiche bei nicht-kardiovaskulärer Indikation eingesetzte Medikamente, die in der Lage sind, das QT-Intervall zu verlängern. Hierzu gehören u.a. Makrolid-Antibiotika (z.B. Erythromycin,

Clarithromycin, Spiramycin), manche Fluorochinolone (z.B. Sparfloxacin, Grepafloxacin), Trimethoprim-Sulfamethoxazol, Zytostatika (z.B. Tamoxifen), ein Teil der modernen Antihistaminika (z.B. Terfenadin und Astemizol), Darmmotilitätsanreger (Cisaprid), Antiparkinsonmittel wie Amantadin und Budipin, Antimalariamittel (z.B. Chinin und Halofantrin) und auch zahlreiche Psychopharmaka. In vielen Fällen handelt es sich um Medikamente, von denen lange Zeit nicht bekannt war, dass sie kardielle Effekte entfalten. Bei diesen Substanzen ist die QT-Verlängerung unerwünscht, da im Einzel-

fall eine mit lebensbedrohlichen Herzrhythmusstörungen vom Typ der *Torsade de Pointes* einhergehende überschießende Verlängerung des QT-Intervalls resultieren kann.

In vitro Methoden spielen bei der Erfassung solcher Medikamenteneffekte eine maßgebliche Rolle. Als derzeit eingesetzte Modelle zu nennen sind: heterologe Expressionssysteme (z.B. *Xenopus* Oocyten), die es ermöglichen, den Effekt von Pharmaka auf Ionenkanäle zu untersuchen; isolierte Kardiomyozyten und Herzmuskelpräparate, die die Ableitung von Aktionspotentialen erlauben, sowie Untersuchungen an isolierten Herzen (z.B. Kaninchen, Meerschweinchen). Die aufgeführten Modelle sind für das Screening neuer Medikamente geeignet. Sie ergänzen sich hinsichtlich ihrer Wertigkeit bei der Erfassung repolarisationsverlängernder Medikamenteneffekte. Ihr Vorteil gegenüber *in vivo* Methoden ist, dass sie eine Untersuchung der repolarisationsverlängernden Effekte von Medikamenten unter standardisierten Bedingungen erlauben.

Vortrag

Immortalisierung von ovariellen Granulosa- und Thekazellen des Weißbüschelaffen (*Callithrix jacchus*)

Bettina Husen¹, Kai Lieder², Alexandra Marten¹, Angelika Jurdzinski¹, Harald Petry², Wolfgang Lüke² und Almuth Einspanier¹

¹Abteilung Reproduktionsbiologie, ²Abteilung Virologie/Immunologie, Deutsches Primatenzentrum, D-Göttingen

E-mail: aeinspa@gwdg.de

In der biomedizinischen Forschung geht die Tendenz verstärkt dahin, mit Primaten wie dem Weißbüschelaffen zu arbeiten, der sich sehr leicht in Gefangenschaft halten und züchten läßt. Da Weißbüschelaffen dem Menschen stammesgeschichtlich sehr nahe stehen, sind an ihnen gewonnene Versuchsergebnisse vergleichsweise gut auf den Menschen übertragbar.

Um dem steigenden Bedarf an Affen als Versuchstiere entgegenzuwirken, ist es wünschenswert, geeignete Zellkultursysteme zu entwickeln, die die Experimente am lebenden Tier ersetzen oder erheblich reduzieren können.

In diesem Projekt wird mit zwei verschiedenen Zelltypen aus ovariellen Gewebe von Weißbüschelaffen eine Metho-

de zur Etablierung permanenter Zelllinien (Immortalisierung) entwickelt. Die hierfür benötigten Eierstöcke werden bei der Sterilisierung von Weißbüschelaffen aus Gründen der haltungsbedingten Geburtenkontrolle gewonnen. Aus den Eierstöcken werden Granulosa- und Thekazellen isoliert. Diese hoch spezialisierten Zellen sorgen im gesunden Organismus für die Produktion der weiblichen Geschlechtshormone und für die Ernährung und Entwicklung reifender Eizellen. Hierdurch sind sie an der Steuerung hormonabhängiger Prozesse wie Menstruationszyklus und Schwangerschaft und damit ursächlich an Störungen der weiblichen Reproduktion und der Entstehung hormonabhängiger Tumore beteiligt. Darüber hinaus spielen sie eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von Kontrazeptiva. Es besteht ein großes In-

teresse daran, mehr über Kontrollmechanismen und die Wirkung verschiedener Pharmaka in diesen Zellen zu wissen.

Mit Hilfe von nicht-liposomalen Lipiden konnte ein virales Onkogen, das sogenannte große T-Antigen, in die Primärkulturen von Granulosa- und Thekazellen eingeführt werden. Dieses Onkogen sorgt in den meisten Fällen durch Wechselwirkung mit verschiedenen zellulären Proteinen dafür, daß die Zellen teilungsfähig bleiben. Es ist bekannt, dass viele Zelllinien nach der Immortalisierung entarten, d.h. sie

verlieren ihre ursprünglichen Eigenschaften und scheiden für viele Fragestellungen aus. Um solche aus dem Projekt auszuschließen, werden alle entstandenen Zelllinien hinsichtlich ihrer bekannten gewebetypischen Eigenschaften (z.B. Hormonempfindlichkeit und Enzymausstattung) untersucht. Bis jetzt sehen alle erhaltenen Zelllinien den Primärzellen morphologisch sehr ähnlich. Es konnten die Steroidhormonrezeptoren nachgewiesen werden, die auch *in vivo* typisch sind. Granulosa- und Thekazelllinien sind in der Lage, nach ent-

sprechender Stimulation das Steroidhormon Progesteron zu produzieren. Sie stellen damit ein vielversprechendes *in vitro* System dar, das sowohl in der Grundlagenforschung als auch für das pharmakologische Wirkstoffscreening als definiertes, alternatives Testsystem eingesetzt werden könnte.

Dieses Projekt wird gefördert durch die Stiftung zur Förderung der Erforschung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zur Einschränkung von Tierversuchen (set).

Vortrag

Mit der richtigen Substanz in den Menschen: Die V79-Zellbatterie™ in der industriellen Praxis

Niels Krebsfänger und Johannes Doehmer

GenPharmTox BioTech AG, D-Planegg/Martinsried

www.genpharmtox.de

E-mail: niels.krebsfaenger@genpharmtox.de, ceo@genpharmtox.de

Die V79-Zellbatterie™ umfaßt eine Vielzahl gentechnologisch konstruierter Zelllinien zur heterologen Expression Fremdstoff-metabolisierender Enzyme: alle relevanten hepatischen Cytochrome P450 des Menschen, Cytochrome aus Lunge und Nebennierenrinde, Polymorphismen, Phase II-Enzyme, sowie orthologe Formen aus Ratte, Maus und Fisch. Der erfolgreiche Einsatz der V79-Zellbatterie™ in der Toxikologie (Zytotoxizität, Genotoxizität, Mutagenität), im Fremdstoffmetabolismus

(Enzym-Screening, Metaboliten-Profil, Enzym-Kinetik, Arzneimittel-Interaktion) und bei speziellen Fragestellungen (*Custom-designed Cell lines*, Polymorphismen, Spezies-Vergleiche) und die hohe Prädiktivität der Ergebnisse für den Menschen ist durch eine Vielzahl wissenschaftlicher Publikationen belegt.

Bisher im akademischen Umfeld entwickelt, stellt der jetzige Einsatz im industriellen Routine-Maßstab im Zuge der Gründung der GenPharmTox BioTech AG

neue Herausforderungen an die V79-Technologie: Reproduzierbarkeit, Planung und Dokumentation nach den Grundsätzen der Guten Laborpraxis (GLP), Assay-Minialisierung und Automatisierung zur Erhöhung von Kapazität und Ökonomie, Entwicklung von Screening-Assays für toxikologische und metabolische Fragestellungen. Daraus ergeben sich Chancen für die Pharmazeutische Industrie durch eine qualitativ verbesserte Charakterisierung und damit erfolgreichere Auswahl von Substanzen in der Arzneimittelentwicklung, für die Chemische Industrie im Rahmen der Chemikalienbewertung und für den Tierschutz durch den Einsatz der V79-Zellbatterie™ in der industriellen Praxis und ein professionelles weltweites Marketing.

Keywords: V79-Zellbatterie™, Cytochrom P450, GLP, *in vitro* Screening, Toxikologie, Metabolismus, Tierschutz

Vortrag

ecopa – European Consensus Platform on Alternatives

Peter Maier

3R Research Foundation Switzerland, CH-Münsingen

E-mail: peter.maier@swissonline.ch

ecopa, the European Consensus Platform for Alternatives in Animal Experimentation will be founded at the 2nd workshop entitled "The new EU Chemical Policy" and will be held in Brussels from October 26–28, 2001. Members of *ecopa* are National Consensus Platforms in Europe (voting members) and associate members

(individuals, societies, associations, institutions). National Platforms and *ecopa* adheres to the 3R concept of refinement, reduction and replacement. National Platforms have to comprise the four concerned parties in the field of 3R-methods to animal experimentation, i.e. academia, animal welfare, industry and government.

ecopa strives to raise public, government and scientific awareness for a better acceptance of alternatives in animal experimentation. The goal is to facilitate the exchange of scientific information, expertise and experience between National Consensus Platforms, EU, government, industry, animal welfare and science institutions. *ecopa* will organise conferences and seminars, publish documents, collect and circulate information and support scientific and educative initiatives. The final goal is the further development and implementation of 3R methods in Europe and worldwide.

At the moment, a working group (J. Castell, Spain; K. Gabrielson, Sweden; B.

Garthoff, Germany; P. Maier, Switzerland; V. Rogiers, Belgium; A. Van Irsel, (Netherlands) prepares the statutes, sets criteria for acceptance as voting member, defines the structure of the society,

organises the second workshop and took already actions concerning the statement to the 6th framework programme of the EU. All the documents prepared are presented on <http://www.ecopa.tsx.org> and are open

for comments and suggestions. The final approval will take place by the General Assembly at the foundation meeting in the frame of the 2nd ecopa workshop in October 2001.

Vortrag

Vergleich des alternativen Pyrogentests mit humanem Vollblut mit dem Kaninchen-Pyrogentest

Thomas Montag, Ursula Lüderitz-Püchel, Ingo Spreitzer und Matthias Fischer
Paul-Ehrlich-Institut, D-Langen
E-mail: month@pei.de

Der Kaninchentest gilt als der "Goldene Standard" bei der Testung von Arzneimitteln auf pyrogene (fiebereerzeugende) Verunreinigungen und wird vom Europäischen Arzneibuch für eine Reihe von Präparaten vorgeschrieben. Dazu wird die zu testende Substanz jeweils drei Tieren in die Ohrvene appliziert und deren Temperatur- bzw. Fieberentwicklung über einige Zeit registriert. Beim alternativen Test wird die menschliche Fieberreaktion *in vitro* nachvollzogen, indem man verdünntes humanes Blut mit der Testprobe reagieren lässt und anschließend die Konzentration fiebereerzeugender Mediatoren (hier humanes Interleukin-1) bestimmt. Inzwischen wurde beim *European Directorate for the Quality of Medicines, European Pharmacopoeia Commission* eine Expertengruppe einge-

richtet, welche die Aufnahme alternativer *in vitro* Pyrogentests in das Europäische Arzneibuch zur Ablösung des Kaninchentests vorbereiten soll.

Vor der Einführung eines neuen Testprinzips in die Prüfung von Arzneimitteln muss eine sorgfältige Validierung an den etablierten Methoden erfolgen, damit keine Sicherheitslücken für den Patienten entstehen. Deshalb sollte in einer Vergleichsstudie zwischen dem humanen Vollbluttest und dem Kaninchen-Pyrogentest geklärt werden, ob die neue *in vitro* Methode eine gleichwertige Alternative zum Tierversuch am Kaninchen darstellt. Nach einem Vorversuch zur Dosisfindung wurden im Hauptversuch Albumine verschiedener Hersteller mit Endotoxin/Lipopolysaccharid kontaminiert und in beiden Methoden

untersucht. Insgesamt acht Humanalbumine verschiedener Hersteller für den therapeutischen Einsatz beim Menschen in den Konzentrationen 5%, 20% und 25% wurden mit jeweils 5 bzw. 10 Internationalen Einheiten Endotoxin versetzt. Die einzelnen Proben wurden an jeweils drei Kaninchen und parallel mit dem Blut von jeweils zwei Spendern getestet. Im Vorversuch und in der Hauptstudie wurden insgesamt 270 Tiere eingesetzt. Die Temperaturdaten aus dem Kaninchenpyrogentest und die Interleukin-1-Daten aus dem humanen Vollbluttest wurden miteinander verglichen.

Die Auswertung der Studie ergab absolute Übereinstimmung von Kaninchen-Pyrogentest und dem alternativen Pyrogentest mit humanem Vollblut. Der neue Test war ausnahmslos in der Lage, die pyrogenhaltigen Präparate zu erkennen und die Ergebnisse der Tierversuche mit 100%iger Sicherheit vorherzusagen. Für die Präparatengruppe der therapeutischen Humanalbumine wurde somit die wichtigste Voraussetzung zur Ablösung des Tierversuchs bzw. zur Einführung des alternativen Pyrogentests in das Europäische Arzneibuch erfüllt.

Vortrag

DarT: Der Embryotest mit dem Zebrafisch *Danio rerio* – ein allgemeines Modell in Ökotoxikologie und Toxikologie?

Roland Nagel
Institut für Hydrobiologie, Technische Universität D-Dresden
E-mail: rnagel@rccs.urz.tu-dresden.de

Bei dem akuten Fischtest handelt es sich um einen Tierversuch, dessen ökotoxikologische Relevanz diskussionswürdig ist. Trotzdem gehört das Ergebnis dieses Tests nach wie vor zum Grunddatensatz in der Chemikalienbewertung.

Der Embryotest mit dem Zebrafisch *Danio rerio* ist als Ersatzmethode für den akuten Fischtest vorgeschlagen worden

(Schulte und Nagel, 1994). Zur Validierung wurde erfolgreich ein internationaler Laborvergleichsversuch durchgeführt, dessen Ergebnisse vorgestellt werden. Ausgehend von Ergebnissen zur Chemikalienprüfung und den Ergebnissen von Friccus et al. (1995), hat der DIN-Arbeitskreis „7.6 Fischei-Test“ den Test modifiziert, validiert und mittlerweile eine

Normvorschrift für die Abwasserprüfung vorgelegt.

Aufgrund der Schnelligkeit und der Erfassung von unterschiedlichen Endpunkten innerhalb eines Tests ist der Embryotest auch eine gute Basis für die Betrachtung von quantitativen-Struktur-Wirkungs-Beziehungen (QSAR).

Neben diesen Einsatzmöglichkeiten in der Ökotoxikologie wurde auch der Einsatz zur Beantwortung von toxikologischen Fragen geprüft. Dazu gehören Störungen in der Pigmentierung (Maiwald, 1997) oder die Frage, ob auch eine Veränderung der Herzschlagfrequenz untersucht werden kann (Zeller, 1995). Weitere wichtige Einsatzmöglichkeiten sind die Prüfung von teratogenen Substanzen und der Einsatz des Embryotests als Screening-Test im Rahmen der präklinischen Untersuchungen (Bachmann et al., 2001).

Aufgrund der vielfältigen Einsatzmöglichkeiten sowohl in der Ökotoxikologie als auch in der Toxikologie werden wir für den Embryotest künftig die Abkürzung *DarT* verwenden, wobei diese Abkürzung für *Danio rerio* Toxizitätstest oder für *Danio rerio* Teratogenitätstest stehen kann.

Literatur

Bachmann, J., Jäckh, R. and Nagel, R. (2001). The *Danio rerio* teratogenicity assay (*DarT*). Poster auf diesem Kongreß.

Friccius, T., Schulte, C., Ensenbach, U., Seel, P. und Nagel, R. (1995). Der Embryotest mit dem Zebrafisch - eine neue Möglichkeit zur Prüfung und Bewertung der Toxizität von Abwasserproben. *Vom Wasser* 84, 497-418.

Maiwald, S. (1997). Wirkung von Lösungsvermittlern und lipophilen Substanzen auf die Embryonalentwicklung des Zebrafisch (Brachydanio rerio). Diplomarbeit, TU Dresden.

Schulte, C. and Nagel, R. (1994). Testing acute toxicity in the embryo of zebrafish, *Brachydanio rerio*, as an alternative to the acute fish test: preliminary results. *ATLA* 22, 12-19.

Zeller, Y. (1995). Einfluß von herzwirksamen Pharmaka auf die Embryonalentwicklung des Zebrafisch (Brachydanio rerio), unter besonderer Berücksichtigung von cardiogenen Effekten. Diplomarbeit, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.

Vortrag

Xenotransplantationsforschung - Eine Annäherung aus Sicht des Tierschutzes

Uwe Nickel

Deutscher Tierschutzbund, D-Bonn

E-mail: Uwe.Nickel@t-online.de

Die Xenotransplantationsforschung befasst sich mit den Möglichkeiten, tierliche Organe, Gewebe oder Zellen auf den Menschen zu übertragen. Im tierexperimentellen Bereich werden dazu auch transgene Tiermodelle erzeugt und eingesetzt. Ein Ziel ist es, die Engpässe bei der Verfügbarkeit menschlicher Spenderorgane zu überwinden.

Zur Mitte der 90iger Jahre wurde die Option, ganze Tierorgane auf den Menschen zu übertragen, sehr optimistisch be-

wertet. So ging Sandoz noch 1996 davon aus, dass bereits im Jahr 2000 über 6.000 solcher Übertragungen stattfinden werden, und im Jahr 2010 mehr als 500.000. Inzwischen sind diese Daten von der Zeit eingeholt, und die Prognosen sind verhalten geworden: Frühestens in 10 bis 15 Jahren wird, wenn überhaupt, mit der Transplantation tierlicher Organe in der klinischen Praxis gerechnet.

Zunehmend skeptisch bewerten Fachwissenschaftler und Kliniker insbesondere:

- die Überwindung der Abstoßung und Gewährleistung der physiologischen Funktionalität,
 - die Beherrschung xenogener Infektionen und
 - die (sozialen) Belastungen beim Humanempfänger und dessen Angehörigen.
- Völlig ungeklärt scheinen darüber hinaus die ethischen, insbesondere tierethischen Implikationen.

Vor diesem Hintergrund ist der Frage nachzugehen, ob die Xenotransplantation aus wissenschaftlicher, klinischer und (human-) ethischer Sicht eine realistische Option ist, um der Verknappung menschlicher Spenderorgane zu begegnen, ob es Alternativen zu diesem Ansatz gibt und vor allem: ob bzw. inwieweit die Xenotransplantationsforschung mit (transgenen) Tieren aus tierethischer und tierenschutzrechtlicher Sicht zu rechtfertigen ist.

Vortrag

The Cell Function Analyser (CFA) - a Physiological *in vitro* Vascular Model and Potential Alternative to Animal Experiments

Cornelia B. Reininger

E-mail: cornelia.reininger@nycomed-amersham.de

Cell-vessel wall interactions (adhesion, emigration) and cell-cell cohesion (aggregation) have been assessed primarily in animal experiments. The cell function analyser (CFA) is an *in vitro* vascular model, in which the three components of Virchow's triad are present in a highly standardised and variable form. The CFA permits visual and quantitative analysis of

cellular adhesion, emigration and aggregation under physiologically relevant flow conditions (i.e. to the arteries and to the microcirculation). Although the method does not entail the use of a living animal or of animal tissue, as is true for animal experiments, with the CFA specimen fixation and histomorphological analysis after the experiment is possible. The effi-

cacy of the method for platelet function testing has been verified by numerous clinical studies. The wide variability of test parameters make CFA suitable for *in vitro* analysis of other cell-vessel-wall-mediated processes, such as inflammation, wound healing and tumour metastasis. We present: 1) a description of the CFA method and underlying hemodynamic principles, 2) a review of clinical and experimental results with platelets and, 3) the first results of convective flow-mediated leukocyte-endothelial interactions. The CFA provides an *in vitro* alternative to animal experiments, can be classified as a replacement method and possesses an analysis spectrum that will greatly reduce the overall need for the previous.

Vortrag

Das Lebensbilanzmodell zur Bewertung der Leiden transgener Versuchstiere

Birgit Salomon¹, Helmut Appl¹, Harald Schöffl¹, Helmut A. Tritthart^{1,2}, Heinz Juan^{1,3}

¹zet – Zentrum für Ersatz- und Ergänzungsmethoden zu Tierversuchen, Österreich; ²Institut für medizinische Physik der Universität A-Graz; ³Institut für Biomedizinische Forschung der Universität A-Graz

E-mail: info@zet.or.at

Die Bewertung der „Leiden“ eines Versuchstieres, also die Graduierung aller bei ihm auftretenden Unwohlseinsempfindungen, ist die Voraussetzung für das, von einigen europäischen Gesetzgebern eingeforderte, ethisch/moralische Abwägen des zukünftigen potenziellen Nutzens eines Tierexperiments gegenüber den Belastungen eines Tieres. Auch Aussagen über die 3R-Relevanz eines Tiermodells können letztendlich nicht ohne exakte Leidensanalysen getroffen werden.

Derzeit existiert kein Modell, das eine objektive, umfassende, vergleichbare und praktikierbare Bewertung der Leiden ei-

nes Versuchstieres ermöglicht, weder für den Bereich der konventionell gezüchteten und noch viel weniger für den Bereich der transgenen Versuchstiere.

In den letzten zweieinhalb Jahren wurde von uns ein neues Leidenbewertungssystem – „Das Lebensbilanzmodell“ – ausgearbeitet. Dieses Modell erlaubt eine abgestufte Beurteilung der Belastungen aller Versuchstiere. Im Gegensatz zur gängigen Meinung geht dieses Modell davon aus, daß der Tierversuch selbst nur eine Leidensquelle im Leben des Versuchstieres darstellt. Um die Qualen oder auch Nicht-Qualen eines Versuchstieres rich-

tig einschätzen zu können, muß diesem System zur Folge, und letztendlich auch in Übereinstimmung mit Russell und Burch, die Lebensbelastung eines Tieres bewertet werden. Es müssen alle potentiell leidensinduzierenden Parameter hinsichtlich ihrer Konsequenzen auf das tierische Wohlbefinden evaluiert werden. Dies ist insbesondere für transgene Tiere, die oft zeitlebens mit Transfektionsbedingten Defekten behaftet sind, aber auch für alle unter unzureichenden, nicht tiergerechten Haltungs-, Pflege-, Transport- etc. Bedingungen leidenden „konventionellen“ Labortiere von großer Bedeutung.

Die theoretischen Grundlagen des Lebensbilanzmodells werden in unserem Beitrag erörtert und hinsichtlich der Möglichkeiten in die praktische Umsetzung einer Bewertung unterzogen. Es ist unserer Meinung nach unabdingbar, gerade für transgene Tiere ein Bewertungssystem zur Verfügung zu haben, das allen Besonderheiten dieser immer größer werdenden Tiergruppe gerecht wird.

Vortrag

Die neue EU-Chemikalienpolitik: Chance für tierversuchsfreie Verfahren?

Ursula Sauer

Akademie für Tierschutz, D-Neubiberg

E-mail: ursula.sauer@tierschutzakademie.de

Im Editorial in *ALTEX* 2/2001 wurde dargelegt, dass alle Forderungen, die der Deutsche Tierschutzbund zur neuen EU-Chemikalienpolitik gestellt hatte, im Weißbuch der Europäischen Kommission aufgegriffen wurden. Und es ist in der Tat eine kleine Sensation, was da im Weißbuch vorgeschlagen wird: Für chemische Stoffe, die in Produktionsvolumina von jährlich unter 10 Tonnen auf den Markt kommen, sollen nur Daten aus tierversuchsfreien Verfahren vorgelegt werden, damit sie als sicher eingestuft werden und vermarktet werden dürfen.

Doch die Tierschützer feiern bislang nicht. Bis zur Umsetzung dieser längst überfälligen Maßgaben ist es noch ein weiter Weg. Konkrete Angaben darüber, welche Verfahren die tierversuchsfreie

Prüfstrategie beinhalten soll, fehlen im Weißbuch. Und für Stoffe, die in mittleren oder hohen Produktionsvolumina auf den Markt kommen, ist nach wie vor vorgesehen, Testkataloge mit den in den Anhängen der EU-Richtlinie 67/548 aufgeführten Tierversuchen vorzuschreiben. Hier erfolgte lediglich der Zusatz, dass man die Tierversuche nicht mehr blindlings abarbeiten soll, sondern vorher überlegen muss, welche Daten für die Einstufung einer bestimmten Chemikalie erforderlich sein könnten. Solange aber Prüfstrategien mit Tierversuchen nicht vollständig abgeschafft sind, muss man davon ausgehen, dass die schlimmsten Vorstellungen wahr werden und dass tatsächlich für die Prüfung alter und neuer Chemikalien in den nächsten Jahrzehnten vie-

le Millionen Versuchstiere sterben, ohne dass dies letztendlich dem Verbraucher- oder Umweltschutz dient.

Auch die Einteilung der Chemikalien in niedrig-, mittel- und hochvolumige Stoffe zur Abstufung der Prüfanforderungen entsprechend der Produktionsmenge wurde im Weißbuch beibehalten, wenn auch mit anderen Schwellenwerten als in der bestehenden Chemikaliengesetzgebung. Dies trägt jedoch nicht dazu bei, die Sicherheit von Chemikalien zu verbessern. Schwellenwerte zur Abstufung von Prüfanforderungen sind immer willkürlich gewählt. Es gibt keinen Zusammenhang zwischen der Giftigkeit eines Stoffes und seiner Produktionsmenge. Wie bereits in *ALTEX* 4/2000 dargelegt, können aus der Sicht des Deutschen Tierschutzbundes Mensch und Natur am besten vor unbekannten Gefahren durch Chemikalien geschützt werden, wenn für alle Produktionsvolumina tierversuchsfreie Prüfstrategien festgeschrieben werden. Dabei müssen zunächst bereits vorhandene Daten gesammelt und ausgewertet werden. Anschließend müssen noch erforderliche Daten mit Computerverfahren, physikalisch-chemischen Methoden

sowie mit *in vitro* Untersuchungen erhoben werden. Sollten zu bestimmten Endpunkten noch keine fertig entwickelten oder anerkannten tierversuchsfreien Verfahren verfügbar sein, müssen derartige Lücken durch die Förderung der Weiterentwicklung vielversprechender Ansätze umgehend geschlossen werden. Da die neue Chemikalienpolitik ein europäisches Anliegen ist, sollte dies am besten als Förderschwerpunkt im Rahmen des 6. Forschungsrahmenprogramms der Europäischen Kommission erfolgen.

Das Weißbuch muss nun von den zuständigen Ministerräten und vom Europäischen Parlament kommentiert werden. Anschließend wird die Europäische Kommission auf der Grundlage dieser Kommentare Entwürfe für neue Chemikalienrichtlinien vorlegen. Der europäische Umweltministerrat hat am 7. und 8. Juni 2001 bereits über das Weißbuch diskutiert und seine Forderungen für eine neue EU-Chemikalienpolitik in sogenannten *Council Conclusions* zusammengefasst. Es ist höchst bedauerlich, dass es die Umweltminister der Europäischen Union bei ihrer Kommentierung des Weißbuchs versäumt haben, eine konkrete Ausgestaltung tierversuchsfreier Prüfstrategien und deren Verankerung für alle Produktionsvolumina zu fordern. Ihre Stellungnahme zu den im Weißbuch ver-

ankerten Maßgaben in bezug auf niedrigvolumige Stoffen klingt sogar so, als ob sie nicht daran glauben, dass Sicherheitsbewertungen allein aufgrund von Daten aus tierversuchsfreien Untersuchungen möglich sind: „Der Rat bittet die Kommission, die Datenanforderungen an die Substanzen, die in Produktionsvolumina unter 10 Tonnen vermarktet werden, weiter zu untersuchen, um sicherzugehen, dass die vorgelegten Informationen zur Klassifizierung und Einstufung und zur Ermittlung erforderlicher Maßnahmen ausreichen. Die Daten müssen ebenfalls ausreichen, um Fälle unbeabsichtigter Freisetzung handhaben zu können und um den Schutz der Gesundheit und der Sicherheit der Arbeiter zu gewährleisten, während gleichzeitig ein Minimum an Tierversuchen sichergestellt ist.“

Im Europäischen Parlament hat Frau Inger Schiörling von den Grünen Schwedens am 15. Juli 2001 im Umweltausschuss einen Bericht zum Weißbuch vorgelegt. Spätestens im Herbst soll im Plenum über diesen Bericht abgestimmt werden. Bleibt zu hoffen, dass das europäische Parlament – so wie im Bereich der Kosmetika – ein klares Bekenntnis zur Abschaffung von Tierversuchen abgibt.

Auch ECVAM hat sich des Themas angenommen und hält in diesem Jahr Workshops ab, in denen Experten Prüfstrategien

mit tierversuchsfreien Verfahren für die Chemikaliientestung ausarbeiten und festhalten, für welche Endpunkte noch tierversuchsfreie Verfahren entwickelt werden müssen. Aus der Sicht des Tierschutzes sollte es eine Selbstverständlichkeit sein, dass die Empfehlungen derartiger Workshops, die ja von einer Einrichtung der Europäischen Kommission organisiert werden, anschließend auch von der Kommission aufgegriffen werden, wenn es um die Ausgestaltung der Richtlinienentwürfe geht. Die neue EU-Chemikalienpolitik ist eine Chance, im Bereich der Sicherheitsprüfungen ein Umdenken einzuleiten. Tierversuchsfreie Teststrategien sind keine Zukunftsvision, sondern können bereits heute verwirklicht werden. Auch im Bereich der Chemikalienpolitik zeigt sich in diesen Tagen deutlich, dass ein zuverlässiger Schutz des Menschen und seiner Umwelt nur in Verbindung mit einem umfassenden Tierschutz erreicht werden kann. Wie dies aus der Sicht des Tierschutzes geschehen kann, soll im Vortrag verdeutlicht werden.

Dr. Ursula G. Sauer
Deutscher Tierschutzbund
Akademie für Tierschutz
Spechtstr. 1
D-85579 Neubiberg
E-mail: akademie@tierschutzbund.de

Vortrag

Entwicklung einer zellulären Testbatterie für einen routinemässigen Einsatz in der aquatischen Ökotoxikologie

Nina Schweigert, Renata Behra, Patricia Burkhardt-Holm, Beate Escher und Rik I.L. Eggen

Eidgenössische Anstalt für Wasserversorgung, Abwasserreinigung und Gewässerschutz (EAWAG), CH-Dübendorf

E-mail: schweigert@eawag.ch

Sowohl die Wasserrahmenrichtlinie der EU, als auch die Gewässerschutzverordnung der Schweiz streben an, die Gewässer vor nachhaltigen Einwirkungen zu schützen. Um derartige Einwirkungen feststellen zu können, sind entsprechende ökotoxikologische Testverfahren nötig, mit denen Wasserproben gescreent werden können. Heute werden für die Eva-

luierung der Wasserqualität meistens standardisierte Kurzzeittests verwendet, bei denen Algen, Daphnien und auch eine grosse Anzahl von Fischen verwendet werden. Die Organismen werden meistens Abwässern ausgesetzt, und nach 2–4 Tagen wird die Anzahl toter Organismen bestimmt und die überlebenden Organismen werden auf augenscheinliche Schäden

überprüft. Alle Fische werden am Ende der Tests getötet. Der Einsatz dieser akuten Tests ist äusserst fragwürdig, da sie nicht besonders sensitiv sind, vor allem aber bleiben chronische Schäden, wie z.B. DNA-Schäden oder endokrine Wirkungen, unerkannt. Auch können mit diesen Tests keine Aussagen über Wirkmechanismen gemacht werden, wodurch die Ursachenfindung und das Erkennen einer Kausalität zwischen Exposition und Effekt sehr schwierig wird.

Der Einsatz von alternativen Testverfahren wird aber bisher dadurch verhindert, dass keine standardisierten und validierten Methoden vorhanden sind. Für einen Routineeinsatz bieten sich in erster Linie zelluläre Testverfahren an, da sie sowohl kostengünstig und schnell durchzuführen, aber auch sensitiv sind. Durch die Verwendung einer Reihe zellulärer Tests können ausserdem bekannte toxische Antworten,

wie z.B. östrogene Effekte, DNA-Schäden und Neurotoxizität, abgedeckt werden.

Mit wenigen Ausnahmen sind die bisher entwickelten Testverfahren aber kaum evaluiert und standardisiert. Eine Standardisierung würde auch den Einsatz dieser Verfahren bei der ökotoxikologischen Bewertung von Chemikalien fördern, wo bisher auch die oben

beschriebenen Testverfahren verwendet werden.

An der EAWAG wird in der Ökotoxikologie seit längerem Mechanismen-orientierte Forschung betrieben. Diese ist die Basis für die momentane Entwicklung und Validierung der modular aufgebauten, zellulären Testbatterie. Das Ziel ist es, mit dieser Testbatterie (i) möglichst viele bekannte to-

xische Mechanismen abzudecken, (ii) qualitative und quantitative Aussagen machen zu können und (iii) nach Implementierung und bei routinemässigem Einsatz zu einer massiven Reduktion der Tierversuche in der Ökotoxikologie beizutragen. Im Vortrag werden das Konzept, das Potential dieser Testbatterie, Entwicklungsstatus und die Forschungslücken präsentiert und diskutiert.

Vortrag

Etablierung molekularer Endpunkte zur Embryotoxizitätsprüfung mit Stammzellen

Andrea Seiler, Anke Visan, Ingeborg Pohl, Elke Genschow, Roland Büsen und Horst Spielmann

Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch (ZEBET), Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV), D-Berlin

E-mail: zebet@bgvv.de

Pluripotente embryonale Stammzellen der Maus können in Zellkultur mit Hilfe des „Leucemia Inhibitory Factor“ (LIF) im undifferenzierten Stadium kultiviert werden. Unter definierten Kulturbedingungen und ohne Einwirkung von LIF können ES Zellen in verschiedene Zellen der drei Keimblätter Endoderm, Ectoderm und Mesoderm differenzieren. Der embryonale Stammzelltest (EST), der in den letzten Jahren bei ZEBET entwickelt wurde, nutzt die Fähigkeit dieser embryonalen Stammzellen, *in vitro* in rhythmisch kontrahierende Herzmuskelzellen zu differenzieren, die mikroskopisch detektiert werden können.

Mit dem EST wird der Einfluss von teratogenen und embryotoxischen Testchemikalien auf die Differenzierung von em-

bryonalen Stammzellen in kontrahierende Herzmuskelzellen untersucht. Diese Ergebnisse werden in Relation zum zytotoxischen Effekt der Substanzen auf ES-Zellen und auf differenzierte Zellen (3T3 Maus-Fibroblasten) bewertet. Anhand von Konzentrations-Wirkungskurven werden Halbhemmkonzentrationen (ID_{50} , IC_{50}) bestimmt, die der Klassifizierung der Testsubstanzen in drei Embryotoxizitätsklassen nicht-, schwach- oder stark embryotoxisch dienen. Die Klassifizierung erfolgt mittels eines statistischen Prädiktionsmodells.

Trotz der erfolgreich verlaufenden ECVAM Validierungsstudie weist der EST einige Nachteile auf. Die Testdauer ist mit 10 Tagen verhältnismäßig lang und die

mikroskopische Auswertung der Kontraktion der sich entwickelnden Herzmuskelzellen zeitaufwendig und die Erfassung kaum automatisierbar. Darüber hinaus wird nur die Differenzierung in Herzmuskelzellen (mesodermal) erfasst.

Ziel unserer gegenwärtigen Arbeiten in Kooperation mit Vertretern der pharmazeutischen Industrie ist die Weiterentwicklung des EST. Neben der Herzzelldifferenzierung sollen neue relevante Endpunkte auf molekularer Ebene durch FACS-Analysen, *TaqMan PCR* und der *Microarray* Technik erfasst werden. Diese sollen weitere Gewebe wie z.B. neuronale Differenzierung, Angiogenese/Vaskulogenese und Knorpel- und Knochen-differenzierung einschließen. Darüber hinaus sollen die Testdauer verkürzt und die Methode für den Einsatz im *High Throughput Screening* (HTS) optimiert werden.

Erste Ergebnisse zur Erfassung der Herzzell- und Neuronendifferenzierung durch spezifische Anfärbung von gewebespezifischen Markerproteinen und dem semi-quantitativen Nachweis mittels der FACS Analyse weisen darauf hin, dass die neuen molekularen Endpunkte zu einer Verbesserung der Embryotoxizitätsprüfung mit Stammzellen führen werden.

Vortrag

Replacement of Mouse and Rat Antibody Production (MAP / RAP) Test by Polymerase Chain Reaction Assays

Isabella Sieber and Frank Bootz

Institute of Laboratory Animal Science, University of CH-Zürich

E-mail: fobo@ltk.unizh.ch

Rodent viruses may be transmitted through contaminated biological materials such as transplantable tumors, cell lines or other bio-

logical material. Such inadvertent transmission may cause endemic infections in the recipient colony resulting in clinical disease

and/or compromised research results. To avoid this, biological material has to be screened for pathogens before introduction into rodents. Currently, this is being done using the mouse antibody production (MAP) or the rat antibody production (RAP) test. The MAP-test protocol runs according to the following pattern. The presence of indigenous viruses in biological materials may be recognised by inoculating adult mice from virus-free colonies. Sera are collected from the mice and tested for antibodies after 30 days. The sera generated by the



mouse/rat antibody production test are usually evaluated by Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) or by Immunofluorescence Assay (IFA).

We decided to test and validate an alternative assay using polymerase chain reaction (PCR / RT-PCR) technology to detect viral contamination directly in biological material. Thereby, it is essential that all pathogens can be detected by this alternative route with the same sensitivity as with

the MAP/RAP test. The aim of this study therefore is the validation of our new PCR assays and the comparison of PCR and MAP test.

This is being done by using routine samples submitted to our diagnostic lab for MAP testing as well as experimentally spiked samples. For 13 of 15 viruses the PCR tested so far, it seems to be more sensitive and more specific in detecting murine viruses. PCR has also a much shorter turn-

around time than the MAP test (PCR 2 days, MAP test 5 weeks). Furthermore, PCR screening clearly contributes to the principles of 3R as a replacement technique as it eliminates the need for using animals to screen for murine viruses in biological material.

Keywords: 3R, MAP/RAP test, PCR, *replacement* technique, murine viruses, biological material

Vortrag

The New EU Strategy for a Future Chemicals Policy (White Paper): Evaluation of Progress from a Regulator's Point of View

Horst Spielmann

Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch (ZEBET), Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV), D-Berlin

E-Mail: zebet@bgvv.de

Increasing concern that current EU chemicals policy does not provide sufficient protection led to a debate at the informal Council of Environment Ministers in Chester in April 1998. The present system for general industrial chemicals distinguishes between "existing substances" i.e. all chemicals declared to be on the market in September 1981, and "new substances" i.e. those placed on the market since that date.

The current number of existing substances marketed in volumes above 1 tonne is estimated at 30,000. Some 140 of these substances have been identified as priority substances and are subject to comprehensive risk assessment carried out by Member State authorities.

There is a general lack of knowledge about the properties and the uses of exist-

ing substances. The risk assessment process is slow and resource-intensive and does not allow the system to work efficiently and effectively. The allocation of responsibilities is inappropriate because the authorities are responsible for the assessment instead of the enterprises which produce, import or use the substances. Furthermore, current legislation only requires the manufacturers and importers of substances to provide information, but not the downstream users (industrial users and formulators).

In order to achieve the overriding goal of sustainable development, the Commission has identified a number of objectives that must be met in order to achieve sustainable development in the chemicals industry within the framework of the Single Market.

► Protection of human health and the environment.

► Maintenance and enhancement of the competitiveness of the EU chemical industry.

► Prevent fragmentation of the internal market.

► Increased transparency. Consumers need access to information on chemicals to enable them to make informed decisions about the substances they use and enterprises need to understand the regulatory process.

► Integration with international efforts. The global nature of the chemicals industry and the trans-boundary impact of certain chemical substances have made chemical safety an international issue.

► Promotion of non-animal testing. Protection of human health and the environment, including wildlife, should be balanced against protection of the welfare of laboratory animals. The Commission will therefore promote further development and validation of non-animal test methods.

The importance of the new EU strategy for a new chemicals policy for existing chemicals as described in the White Paper of the Commission will be reviewed and examples of a new risk assessment approach will be given, which is primarily based on information obtained in non-animal testing procedures.



Vortrag

Fortschritte bei der Reduzierung von Tierversuchen in Arzneibuchvorschriften zur Prüfung von Impfstoffen

Karin Weißer

Paul-Ehrlich-Institut, D-Langen

E-mail: weika@pei.de

Impfstoffe sind Arzneimittel, die aufgrund ihrer biologischen Herkunft einer besonders strengen Qualitätskontrolle unterliegen. Jede Charge wird auf der Grundlage der Prüfvorschriften des Europäischen Arzneibuchs auf Identität, Reinheit/Toxizität und Wirksamkeit geprüft und muß den dort genannten Mindestanforderungen entsprechen. Viele dieser Toxizitäts- und Wirksamkeitsprüfungen stellen Tierversuche dar.

In den Jahren 1993-95 wurde am Paul-Ehrlich-Institut in Deutschland ein vom BMBF (Bundesministerium für Bildung und Forschung) gefördertes Projekt durchgeführt mit dem Ziel, sämtliche Tierversuche in den Arzneibuchmonographien von Immunpräparaten kritisch zu begutachten und Vorschläge zur Änderung der Methoden im Sinne des Tierschutzes zu machen.

Es wurden insgesamt 117 Tierversuche, die sich in 73 Monographien von immunbiologischen Human- und Veterinärpräparaten befinden, bearbeitet. Auf der Grundlage einer ausführlichen Literaturrecherche sowie einer detaillierten Befragung der Prüfer bezüglich ihrer praktischen Erfahrung und Einschätzung wurde für jeden Tierversuch eine Beurteilung über dessen Relevanz und über mögliche Alternativen verfaßt. Daraus wurden konkrete Vorschläge zur Änderung einer jeweiligen Monographie erstellt.

Seit dieser Zeit bis heute stellt sich nun die zusätzliche Aufgabe, die erarbeiteten Vorschläge in konkrete Änderungen bestehender Monographien des Europäischen Arzneibuchs umzusetzen sowie die gewonnenen Erkenntnisse in neue Monographien einfließen zu lassen. Nur so können die Ergebnisse des Projektes einen

konkreten Nutzen im Sinne des Tierschutzes erzielen. Zu diesem Ziel führen zwei Wege:

Besonders vielversprechende Änderungsvorschläge wurden direkt als sog. „requests for revision“ bei der Europäischen Arzneibuchkommission eingereicht. Dabei konnte in den meisten Fällen erreicht werden, daß die Änderungen, die eines der 3 R betreffen, im „rapid revision“-Verfahren bearbeitet wurden. Dies kann die Zeit vom Einbringen der Revision bis zur Implementierung (Inkrafttreten der Änderung) von über 2 Jahren auf ca. 1/2 Jahr verkürzen.

Parallel dazu werden von den deutschen Vertretern in den Expertengruppen 15 und 15 V des Europäischen Arzneibuchs die Erkenntnisse über die Reduktion von Tierversuchen von vornherein bei Neufassungen von Monographien eingebracht, um sicherzustellen, daß so wenig Tiere wie möglich für die Bewertung neuer Präparate eingesetzt werden oder der Einsatz womöglich ganz vermieden werden kann.

Über die Bilanz dieser Arbeit bis heute - sowohl auf dem Gebiet der Human- als auch der Veterinärpräparate -, aber auch über die Schwierigkeiten, die erforderliche Hartnäckigkeit und über Rückschläge wird berichtet.

Vortrag

Humane Stammzellen – Potenzial und Perspektiven

Anna M. Wobus

In Vitro Differentiation Group, Institut für Pflanzengenetik (IPK), D-Gatersleben

E-mail: wobusam@ipk-gatersleben.de

Stammzellen sind durch ihre Fähigkeit zur Proliferation (*self-renewal*) und der Eigenschaft, sich in differenzierte Zellen zu entwickeln, charakterisiert. Neben den totipotenten embryonalen Stammzellen, die bei höheren Säugern in der Zygote und den ersten Teilungsstadien vorkommen, wurden pluripotente embryonale Stammzellen (ES-Zellen) aus frühen Embryonalstadien und aus primordialen Keimzellen (EG-Zellen) als permanente Zelllinien etabliert. Darüberhinaus können fötale Stammzellen aus Geweben des Fötus, sowie somatische (= adulte) Stammzellen aus bestimmten Geweben des erwachsenen Organismus isoliert werden.

Alle diese Stammzellen unterscheiden sich hinsichtlich ihres Proliferations- und Entwicklungspotenzials. Die Kenntnis dieser Eigenschaften ist von zentraler Bedeutung für den Einsatz von Stammzellen in der medizinischen Forschung und Therapie. Kriterien der Verwendung von Stammzellen für regenerative Zelltherapien sind: (i) Vermehrungsfähigkeit in Kultur, (ii) Entwicklungsfähigkeit und genetische Stabilität nach Langzeitkultur, und (iii) Integration und Funktion des Transplantats im Empfängerorganismus.

Vor dem Hintergrund langjähriger eigener Arbeiten an ES-Zellen der Maus wird ein Überblick über das Potenzial em-

bryonaler und somatischer Stammzellen des Menschen gegeben. Die Eigenschaften embryonaler Stammzellen von Maus und Mensch werden vergleichend analysiert. Das hohe Entwicklungspotenzial von ES-Zellen legt ihre Eignung für regenerative Zellersatztherapien nahe. Darüber hinaus sind ES-Zellen in der Embryotoxikologie, Pharmakologie sowie zur Analyse embryonaler Entwicklungsprozesse *in vitro* einsetzbar. Aufgrund der Nutzung früher Embryonen zur Etablierung von humanen ES-Zelllinien stößt ihr Einsatz jedoch an ethische Grenzen. Alternativen zu ES/EG-Zellen ergeben sich mit der Differenzierung sowie Transdifferenzierung fetaler und adulter Stammzellen. Jedoch sind die Mechanismen der Regulation von Proliferation, Differenzierung bzw. Transdifferenzierung adulter Stammzellen noch weitgehend unbekannt. Dies begründet eine vergleichende Forschung an allen Stammzell-Systemen.

Vortrag

Comparison of the Mouse Bioassay with Suggested Alternatives (PCR, ELISA) for Botulinum Neurotoxin C1 Detection in Environmental and Veterinary Samples

Thomas C. Zechmeister¹, Martina Fuchsberger¹, Alexander K. T. Kirschner², Alexander Eiler³, Tonie E. Rocke⁴, Friedrich Pittner⁵, Renate Rosengarten¹, Alois Herzig⁶, Robert Mach⁷ and Andreas H. Farnleitner⁷

¹Institute of Bacteriology, Mycology and Hygiene, University of Veterinary Medicine, A-Vienna; ²ENVIRO Environmental Research Group, D-Eisenstadt; ³Inst. of Medical Biology, University A-Vienna; ⁴U.S. Fish and Wildlife Service, National Wildlife Health Research Center, USA-Wisconsin 53711; ⁵Inst. of Biochemistry and Molecular Cell Biology, Vienna Biocenter, University A-Vienna; ⁶Biological Research Institute of Burgenland, A-Ilmitz; ⁷Institute of Biochemical Technology and Microbiology 172/5, Technical University, A-Vienna

E-mail: Thomas.Zechmeister@vu-wien.ac.at

For botulinum neurotoxin detection detailed evaluation of alternative techniques (PCR and ELISA) in sensitivity and specificity is fundamental for the replacement of the currently used mouse bioassay.

Botulinum neurotoxin serotype C1 (BoNT C1), a potent toxin produced by toxigenic clostridia in the environment, causes a paralytic disease and fatal intoxication, which is probably the most important disease of water fowl and poultry worldwide (avian botulism). In Austria,

botulism epidemics are mainly located in the eastern part of the country, especially in the national park Neusiedler See-Seewinkel. In shallow aquatic ecosystems BoNT C1 can be produced under anaerobic conditions and appropriate substrate availability in different anaerobic habitats/microenvironment like sediments, benthic invertebrates, algal mats or vertebrate carcasses.

Techniques which enable rapid and sensitive detection of BoNT C1 and BoNT C1

genes are thus a prerequisite for monitoring BoNT production in the environment providing the basis for efficient botulism management programs. In our polyphasic approach BoNT C1 was detected by the mouse bioassay and compared with the results of a recently developed ELISA assay. BoNT C1 genes were determined by a nested PCR approach of cultivated and non cultivated samples, respectively. All samples (avian carcasses, fly larvae, avian faeces, sediments) were taken from high and low risk areas from the national park Neusiedler See – Seewinkel in bi-weekly intervals over one year.

In all investigated samples the ELISA assay showed a highly significant correlation with the mouse bioassay. In contrast, both PCR approaches showed low correlation to the ELISA assay and mouse bioassay. Both PCR techniques determine the presence of BoNT C1 genes in many cases, but samples showed no toxin expression during cultivation. Currently, the ELISA assay seems to be a useful candidate for toxin monitoring, whereas qualitative PCR techniques overestimate the potential for toxin production.

Future research should focus on a quantitative approach including quantitative PCR and ELISA techniques to monitor mRNA, DNA and protein level.



Poster

The *Danio rerio* Teratogenicity Assay (DART)

Jean Bachmann¹, Rudolf Jäckh² and Roland Nagel¹

¹Dresden University of Technology, Institute of Hydrobiology, D-Dresden

²BASF Aktiengesellschaft, Department of Toxicology, D-Ludwigshafen

E-mail: rnagel@rsc.urz.tu-dresden.de

Short-term and cost-effective screening assays to evaluate carcinogenic or mutagenic effects of chemicals are available and widely used in toxicology.

A screening assay using zebrafish embryos (*Danio rerio*) to detect the teratogenic potential of substances in mammals was developed. The zebrafish is an important model in developmental biology and genetics, as well as in ecotoxicology.

Approximately 50 chemicals and drugs,

including mammalian teratogenic and mammalian non-teratogenic substances as well as substances showing ambiguous results in common laboratory mammals were investigated with DART. Toxicological endpoints, e.g. gross-structural anomalies, growth-retardation and delay of development were examined at defined points in time. The first results are very promising. In 88.5% of the substances tested, the findings in zebrafish embryos correspond with

results in mammals. In 7.7% a false positive result was found, whereas 3.8% of the substances tested showed a false negative result.

Therefore, owing to our results we believe that this method offers possibilities for an *in vitro* teratogenicity assay which allows a rapid, simple, and cost-effective screening of a large number of substances with little amounts of test material required, which is of specific interest for drugs and other chemicals in an early inventory phase. It also provides a useful tool for the selective investigation of metabolites and onto particular effects and modes of action.

Finally, in terms of the 3R this method might be an alternative or a supplemental method to reduce the number, pain and suffering of laboratory animals.

Poster

Untersuchung der Anti-Angiogenese *in vitro*

Mahtab Bahramsoltani, Hana Hünig und Johanna Plendl

Institut für Veterinär Anatomie, Freie Universität D-Berlin

E-mail: plendl@zedat.fu-berlin.de

Die Neubildung von Blutgefäßen (Angiogenese) durch Endothelzellen spielt beim gesunden Erwachsenen bis auf wenige Ausnahmen (heilende Wunden, monatlicher Zyklus im Ovar) keine Rolle. Sie ist jedoch eine entscheidende Voraussetzung für das Wachstum und die Metastasierung von Tumoren, weil sie die Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff gewährleistet. Während die Produktion oder Aktivierung von Angiogenesefaktoren die Angiogenese stimuliert, führen Anti-Angiogenesefaktoren zu einer Inhibierung. Folglich ist die Anti-Angiogenese, die Hemmung der Blutgefäße, eine neue vielversprechende Methode zur Behandlung von Tumoren.

Die Forschung zur Anti-Angiogenese steht noch weitgehend am Anfang. Die Identifizierung von Substanzen mit anti-angiogener Wirkung erfolgt weltweit vor allem in Tierversuchen, von denen insbesondere die am Auge verschiedener

Versuchstiere mit nicht vermeidbaren Schmerzen verbunden sind.

Dies war der Anlaß des ersten Teils unserer Studie, in der wir Reinkulturen von mikrovaskulären Endothelzellen aus dem Ovar von Schlachtrindern etabliert und so die Grundlage für ein *in vitro* Modell der Angiogenese geschaffen haben, welches die Möglichkeit bietet, die einzelnen Stadien der Angiogenese zu untersuchen (Plendl, 2000). Um eine objektive und vergleichbare Aussage über die anti-angiogene Wirkung verschiedener Faktoren zu treffen, ist es notwendig, eine reproduzierbare Methode zur Quantifizierung der Angiogenese zu schaffen.

Die von uns isolierten Endothelzellkulturen durchlaufen unter Zugabe eines Gemisches angiogener Faktoren, nach Erreichen der Konfluenz („Kopfsteinpflaster-Muster“), folgende Stadien der Angiogenese: I Bildung von Pseudopodien; II Mi-

gration und Proliferation; III Lineare Aneinanderreihung; IV Dreidimensionale Organisation mit Bildung gefäßähnlicher Strukturen; V Bildung eines Lumens innerhalb dieser Strukturen.

Die Phasen I bis III werden in unserem Modell semiquantitativ erfaßt, d.h. es wird der Zeitraum gemessen, in dem die jeweilige Phase durchlaufen wird. Bei den sich letztendlich bildenden gefäßähnlichen Strukturen können mittels Morphometrie (Axiovision, Zeiss, D-Jena) die durch sie eingenommene Fläche, das Verhältnis dieser zur Gesamtfläche, ihre Länge und die Anzahl der Verzweigungspunkte angegeben werden.

Die zur Zeit vorliegenden Ergebnisse der noch laufenden Untersuchungen zeigen, daß mit der von uns entwickelten Methode erfolgreich und reproduzierbar die Angiogenese bzw. Anti-Angiogenese quantifiziert werden kann.

Dieses Projekt wird in dankenswerter Weise von der Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch (ZEBET) im Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV), D-Berlin, unterstützt.

Poster

Thoraxmodell zur Nutzung von Herz-Lungen-Präparaten in der Experimentellen Radiologie

Jürgen Biederer und Martin Heller

Klinik für Diagnostische Radiologie am Klinikum der Christian-Albrechts-Universität D-Kiel

E-mail: juergen.biederer@rad.uni-kiel.de

Einleitung

Experimentelle Studien zur Untersuchung der Lunge mit Magnetresonanztomographie (MRT) und Röntgenverfahren erfordern definierte, realitätsnahe Bedingungen. Bei Strahlenexposition oder für Gefäßinterventionen ist ein Einsatz freiwilliger Probanden undenkbar. Um nicht Versuchstiere heranziehen zu müssen, wurde ein Spezialbehälter für Herz-Lungen-Präparate aus Schlachttieren entwickelt.

Material und Methoden

Das Modell besteht aus doppelwandigen, transparenten Kunststoffhalbschalen mit

den Innenkonturen der Thoraxwand eines Schweines. Zugang zum eingelegten Herz-Lungen-Präparat besteht über den Trachealtubus sowie Katheter in Pulmonalarterie und Aorta ascendens. Trachea und Bronchialsystem stehen mit der Außenluft in Verbindung. Die Lunge wird mit einem kontinuierlichen Unterdruck von 20-30 hPa in der künstlichen Thoraxhöhle entfaltet. Ein flexibel gestaltetes Zwerchfellteil ermöglicht die Simulation von Atembewegungen. Alle verwendeten Materialien sind antimagnetisch und MRT-kompatibel. Um signalgebende und strahlenabsorbierende Eigenschaften einer

natürlichen Thoraxwand zu simulieren, kann die Doppelhülle des Phantoms mit einer Salzlösung gefüllt werden. Frische Herz-Lungen-Organpakete von Schweinen werden aus einer nahen Schlachtereibezogen.

Ergebnisse

Die Konstruktion ermöglicht eine vollständige Entfaltung der explantierten Lunge. Gase oder Aerosole können einfach über Trachea und Bronchien verabreicht werden. Mit einer externen Pumpe kann bei geringer Flußrate ein Kreislauf über die Lungengefäße hergestellt werden. Zugang zu den Gefäßen zur Erprobung oder zum Training von radiologischen Interventionen ist gegeben. Ein Herz-Lungen-Präparat kann bis zu 9 Stunden genutzt werden. Das Modell wurde erfolgreich für den Einsatz in der Magnetresonanztomographie, in der Röntgendiagnostik - einschließlich Angiographie und intravaskulärem Kathetereinsatz - und in der Computertomographie gete-

stet und wird bereits für entsprechende Studien genutzt. Eine spezielle Ausführung für transthorakale Punktionen wird zur Zeit entwickelt.

Diskussion

Das Thoraxmodell simuliert unter Verwendung einfachen Schlachtmaterials

realitätsnahe Bedingungen zur Untersuchung der Lunge und ihrer Gefäße. Die Anwendbarkeit auf die MRT und alle Röntgenverfahren einschließlich Gefäßuntersuchungen mit Kontrastmittel und Computertomographie wurde erfolgreich getestet. Gezielte Manipulation des Lungengewebes ermöglicht eine Simulation

pathologischer Prozesse unter Bedingungen, die der Situation *in vivo* vergleichbar sind. Spezielle Vorteile des Modells sind die hohe Flexibilität bei der Planung von Versuchen und geringe Kosten des verwendeten Materials unter völligem Verzicht auf den Einsatz von Versuchstieren (Patente beantragt).

Poster

Comparison of *in vitro* Partition Parameters to Predict Drug Permeation through Different Biological Membranes

Udo Bock, Eleonore Haltner and Stefan Schmitz

Across Barriers, Science Park Saar, D-Saarbrücken

E-mail: u.bock@acrossbarriers.de

Permeation and penetration studies are of importance during the development of topical formulations in pharmaceutical and cosmetic industry. These studies are time consuming and costly. Thus, it becomes necessary for screening purposes to assess a large number of drugs using alternative parameters which are being determined during early development.

Physicochemical profiling (measured pKa, LogP, K-IAM, aqueous solubility)

of potential drug candidate can help understanding and predicting their absorption and distribution since lipophilicity and aqueous solubility are the most important properties which determine the permeation of a drug through biological membranes

A comparison and evaluation of these parameters for a highly variable set of compounds will be presented.

The quantitative determination of permeated (Franz cell) amount of the drugs were done by HPLC after processing samples at different time points during 48 h of the receptor compartment.

Permeability experiments on Caco-2 monolayers were performed using 12-well plates at 37°C and KRB (pH 7.4).

As a permeation method the model of Prof. Loth was used (Saarbruecker Modell). The drug preparation was filled in a cavity of a teflon punch. This punch was applied to the surface of the skin and optimal contact of skin and drug preparation was achieved by placing a weight of 0.5 kg on top of the punch for 2 minutes. After this the weight was removed and the punch was fixed in its position during study time. Thermostatisation of the whole apparatus was done by transferring it into an incubator at 32°C.

Poster

Contribution of Human Embryonic Stem Cells to the 3R Concept

Susanne Bremer and Martin Paparella

Joint Research Center, Institute for Health and Consumer Protection, ECVAM, I-Ispra

E-mail: susanne.bremer@jrc.it

Stem cell research made headlines in late 1998 when American scientists had successfully isolated and cultured the long awaited human embryonic stem cells. Embryonic stem cells are the earliest cells from which body organs are developed and have the ability to grow into the 210 different cell types in the human body. Recent medical research raises hope that the cells can be coaxed into replacing tissues whose function has been lost or compromised as a result of injury or disease. For example, someone with diabetes might be given replace-

ment pancreatic cells that produce normal amounts of insulin. Similar treatments might be developed for Parkinson's and Alzheimer's diseases. In theory, almost any type of tissue could be grown from a batch of stem cells. But that promise comes with a price — these truly revolutionary medical breakthroughs will require the destruction of human embryos. Standing in the way of research are questions about how we should use human embryos. For those who view embryos as human lives deserving of the same respect as a child or

adult, research that kills embryos is not acceptable. For those who view embryos as a collection of cells akin to other human tissue, research is acceptable and relatively uncontroversial.

What about the already established human embryonic stem cell lines deriving from legal abortions? Is it ethically justifiable to use these cells in basic research areas and in toxicology where they can be used as an unlimited source for different cell types? In some areas of *in vitro* toxicology such as cardiotoxicity the existing systems are still based on primary cell cultures which still involve the killing of laboratory animals. The use of differentiating human embryonic stem cells offers the opportunity to isolate the cell type of interest and use it for toxicological purposes. Since the cells are derived from humans no problems of interspecies variation have to be taken into account. Furthermore, another advantage for using human embryonic stem cells can be found

in EU legislation. Directive 98/44 EC on the legal protection of biotechnological inventions stipulates that "processes for cloning human beings" and "uses of human embryos for industrial and commercial purposes" shall be considered unpatentable. The Directive 98/79/EC on *in*

vitro diagnostic medical devices provides that "the removal, collection and use of tissues, cells and substances of human origin shall be governed, in relation to ethics, by the principles laid down in the convention of the Council of Europe for the protection of human rights and dig-

nity of the human being with regard to the application of biology and medicine and by any Member States regulations on this matter". The increased application of patents in biomedical research also inhibits the further development and validation of valuable *in vitro* systems.

Poster

Weiterentwicklung eines *in vitro* Embryotoxizitätstests mit embryonalen Stammzellen: Verwendung molekularer Marker zur Erfassung verschiedener Differenzierungsendpunkte

Roland Buesen, Anke Visan, Andrea Seiler, Ingeborg Pohl, Elke Genschow und Horst Spielmann

Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch (ZEBET), Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV), D-Berlin
E-Mail: r.buesen@bgvv.de

Abstract identisch mit Vortrags-Abstract von Andrea Seiler et al.

Poster

Standardisation in Toxicity Assessment of Dental Materials

Miroslav Cervinka, Jan Peychl and Emil Rudolf

Department of Medical Biology and Genetics, Charles University Faculty of Medicine, CZ-Hradec Kralove
E-mail: cervinka@lfmk.cuni.cz

Modern stomatological care depends on the utilisation of numerous specific materials that are very often in long lasting contact with human tissues. For these reasons it is of the utmost importance to carry out a critical toxicological evaluation of these materials. Central to the biocompatibility assessment is the estimation of cytotoxicity, which should be done according to EN ISO 10993-5:1992 "Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for cytotoxicity". This document gives guidance on the general procedures to evaluate biocompatibility of dental materials. In principle there are three possible approaches:

- 1) direct physical contact of a tested material with cells cultivated *in vitro*
- 2) indirect cell-material contact, in which test material is separated from the cells by

an intermediary (agar, filter, barrier disc of dentine, etc.)

- 3) toxicity testing of an extract prepared from the tested material.

Main advantages of the extract approach are much wider possibilities for selection of endpoint measurements with good possibilities for objective quantification and construction of a dose-response relationship. The main advantage of direct and indirect contact assays is a minimal requirement for the quantity of tested materials; main disadvantages are the impossibilities to construct a dose-response curve and a subjective evaluation. The main advantage of the indirect contact test is that this method can be used both for testing of solid pieces of materials and for testing of extracts. The selection of the test has to be done in accordance with scientific criteria. We have

compared all four approaches (direct contact, indirect contact, solid and extract) in toxicity testing of several model dental materials (metal alloys, ceramic, plastic, etc.) and we have found several discrepancies. Therefore, we believe that better standardisation of selection procedure, for proper planning and conduct of toxicity testing is advisable and should be part of the Quality Assurance Programme.

Another problem connected with standardisation is the preparation of tested materials for testing. Dental materials are extremely heterogeneous in physical properties and chemical composition as well as with regard to clinical application. To find standards for all materials is impossible. What is possible is to develop and validate objective standard schemes for theselection of suitable tests. In all experimental situations we have to try to be as close to clinical situations as possible.

Due to the heterogeneity mentioned above it is very difficult to construct an unified prediction model. For the interpretation of experimental data it is therefore important to include standard positive control samples with known toxicity.

This work was supported by the Ministry of Education of the Czech Republic project No. AM MSM 111500001.

Poster

In vitro Effekt von Steroiden auf differenzierte humane artikuläre Chondrozyten

Markus Dezfulian, Michael Grasslober, Brigitte Tichy, Zahra Naeimi, Vilmos Vécsei und Stefan Marlovits
Universität A-Wien
E-mail: stefan.marlovits@akh-wien.ac.at

Einleitung

Ziel dieser Untersuchungen ist die Beschreibung des Einflusses von Steroiden auf die Synthese- und Proliferationseigenschaften von humanen artikulären Chondrozyten unter Berücksichtigung der Interaktion mit TNF-alpha und IL-6.

Die Divergenz der in der Literatur beschriebenen Effekte von Steroiden auf Chondrozyten ist auf die Verwendung von Knorpelzellen verschiedener Spezies in Zellkultur, die limitierte Verfügbarkeit humanen Knorpelgewebes sowie zellbiologische Einschränkungen bekannter humaner Zellkulturmodelle durch Verlust charakteristischer Differenzierungsmarker zurückzuführen und fordert daher ein standardisiertes, reproduzierbares Zellkultur-

modell von differenzierten humanen artikulären Chondrozyten.

Material und Methode

Humane artikuläre Chondrozyten wurden unter standardisierten Bedingungen aus Hüftgelenkknorpel (im Anschluss an die chirurgische Versorgung von Schenkelhalsfrakturen mittels Hemiprothese) nach enzymatischer Isolierung in zweidimensionaler Monolayerkultur vermehrt und anschließend in Alginate-Suspensionskultur redifferenziert. Der Einfluss von Steroiden (Hydrocortison und Dexamethason in ansteigenden Konzentrationen von 10^{-8} M [0,003625 µg/ml] bis 10^{-4} M [36,25 µg/ml]) auf die DNA-Neusynthese (BrdU-Inkorporation), die metabolische Zellak-

tivität (Formazanreduktion), die Proteoglykan- und Proteinsynthese, sowie die IL-6 und TNF-alpha Produktion wurde mittels standardisiertem ELISA bestimmt.

Ergebnisse

Die Neusynthese von DNA nimmt mit zunehmender Steroidkonzentration signifikant zu, während die Protein- und Proteoglykansynthese eine signifikante Abnahme aufweisen. IL-6 und TNF-alpha zeigen ebenfalls eine konzentrationsabhängige Abnahme. Die Vitalität und metabolische Aktivität bleiben im Konzentrationsverlauf unbeeinflusst.

Diskussion

Ein standardisiertes Zellkulturmodell von in Alginate redifferenzierten humanen artikulären Chondrozyten zeigt unter dem Einfluss von Steroiden reproduzierbare Ergebnisse bezüglich Synthese- und Proliferationseigenschaften der kultivierten Zellen. Durch die Verwendung standardisierter Kultur- und Testbedingungen kann dieses Zellkulturmodell zur Durchführung weiterer Arzneimitteltestungen verwendet werden.

Poster

Entwicklung eines Intubationssimulators zur Reduktion der Belastung von Tieren in der Ausbildung von Veterinärstudenten

Helmut Dier und Wolfgang Künzel
Institut für Anatomie der Veterinärmedizinischen Universität A-Wien
E-mail: helmut.dier@vu-wien.ac.at

Die Dimensionen und Oberflächen des Simulators wurden im Abgußverfahren vom Präparat eines adulten Doberman Pinschers abgenommen. Für die Herstellung der Gießformen und der Oberflächen des Simulators wurde Silikonkautschuk verwendet. Die für die Anfertigung der Umrißmatrize notwendige Fixierung des Präparates wurde durch Tiefgefrieren für 48 Stunden bei minus 25 Grad in Brust-Bauchlage, in gestreckter Kopf-Halshaltung, mit maximal geöffneter Mundhöhle und weit vorgezogener Zunge erreicht. Im ersten Abformungsvorgang wurde der äußere Umriß des Tierkörpers, im zweiten

auch die Mundhöhle jeweils bis zum Lefzenrand bearbeitet. Am Überlappungsbereich an den Lefzenrändern wurde mit Trennmittel ein Verbinden des Silikonkautschuks verhindert. Für die weitere Bearbeitung mußte zur späteren stabilen Einbettung der Matrize ein zweiteiliger Gipsmantel hergestellt werden.

Der formgebende Kern des Simulators wurde aus Polyurethanschaum hergestellt. Auch dazu wurde eine zweiteilige Abgußform aus Gips von Schädel, Wirbelsäule und Muskulatur angefertigt.

Zum endgültigen Aufbau der Oberflächen der Mundhöhle, des Pharynx, des

Larynx, des Oesophagus und der Trachea wurde eine 3mm dicke Auflage von rosa eingefärbtem Silikonkautschuk auf die Matrize aufgetragen, die Kavitäten der Zähne hingegen wurden mit weißem Silikonkautschuk aufgefüllt. Nach Durchhärtung des Kautschuks wurde auch auf die Matrize der Außenhaut eine allseitige Auflage von Silikonkautschuk in der Stärke von ca 6 mm aufgetragen. Die Verbindung mit der Gußform wurde ebenfalls durch Trennmittel unterbunden. Zuletzt konnten beide Positive von ihren Matrizen abgenommen und am Lefzenrand zu einem geschlossenen Schlauch verbunden werden, der über den Rohling aus Polyurethanschaum gezogen wurde. Anschließend wurde der von den Positiven überzogene Polyurethankern in den vorbereiteten Gipsmantel eingebettet und der Zwischenraum zwischen Rohling und Hülle mit Silikonkautschuk aufgefüllt. Nach dessen Durchhärtung wurde das Modell aus seinem Gipsmantel entnommen und auf einem Stativ in Rückenlage montiert.

Diese Abformtechnik gewährleistet eine lebensgetreue Darstellung der Verhältnisse in der Mund- und Rachenhöhle sowie am Kehlkopf ohne jeglichen Detailverlust im Verhältnis 1:1. Die Verwendung eines formstabilen aber flexiblen

Silikonkautschuks ermöglicht die notwendige Beweglichkeit von Lippen, Zunge, Gaumensegel und Kehldeckel und deren zuverlässige Rückkehr in die ursprüngliche Form. Die erforderliche Gleitfähigkeit eines Trainingstubus ist

durch ein beliebiges Gleitmittel herzustellen. Die korrekte intratracheale Lage des Übungstubus ist sowohl über die Mundhöhle als auch über eine Sichtöffnung am hinteren Ende des Simulators zu kontrollieren.

Poster

Novel Serum Replacement Based on Bovine Ocular Fluid: a Useful Tool for Cultivation of Different Animal Cells *in vitro*

Bratko Filipic¹, Srečko Sladoljev², Sandor Toth³, Srečko Koren¹

¹Institute of Microbiology and Immunology, Medical Faculty, SLO-Ljubljana, ²Institute of Immunology, CRO-Zagreb, ³Dept. of Biotechnology, JATE University of Szeged, H-Szeged

E-mail: BFILIPIC@ibmi.mf.uni-lj.si

Different mammalian cells in culture have individual nutritional requirements, which are mainly fulfilled by the addition of foetal calf serum to the basic medium. Due to the batch-to-batch variability and relatively high price, different types of serum replacements were introduced. Among them bovine colostrum as a serum substitute for the cultivation of hybridoma cells should be mentioned. The presented experiments were aimed to introduce the

simple and effective serum replacement (SR) based on the bovine ocular fluid. Throughout the experiments the bovine ocular fluid alone and in the combination with the sheep's defibrinated plasma and human serum albumine was tested for the growth of different cells growing as a monolayer: (a) cell lines: HeLa, WISH, HAC-3/T2, HAC-3/T3 (human amniotic cell lines), WiREF (Wistar rat's embryonic fibroblasts), MDBK (Bovine kidney), PLA

(Adult pig kidney), ST (Swine testis), (b) Primary culture: Chicken embryonic fibroblasts, human bone-marrow fibroblasts. All the growth experiments were performed in the parallel with the Foetal Calf Serum (FCS) of three different sources. All types of cells were cultivated in Eagle's medium + antibiotics (Penicilline, Streptomycine, Gentamycine). The most effective was the SR containing approximately 35% of sheep's defibrinated plasma and 1.5% of serum albumine in the bovine ocular fluid. During the experiments 1,5 and 10% of SR 2.05 or FCS in Eagle's medium were used. After 2,3 and 5 days of cultivation the cells were counted. The results show that the use of SR 2.05 instead of most batches of FCS gives higher number of cells. It is also important, that practically no adaptation is needed, meaning that the cells could be grown in Eagle's medium + FCS and in the next passage in Eagle's medium + SR 2.05 and vice versa.

Poster

Human Interferon α and Porcine Interferon β Affects the Growth Properties and Morphology of Cellular Microtumors *in vitro*

Bratko Filipic¹, Srečko Sladoljev², Sandor Toth³, Gordana Lackovic⁴, Ivica Valpotic⁵, Srečko Koren¹

¹Institute of Microbiology and Immunology, Medical Faculty, SLO-Ljubljana, ²Institute of Immunology, CRO-Zagreb, ³Dept. of Biotechnology, JATE University of Szeged, H-Szeged, ⁴Faculty of Natural Sciences, University of Zagreb, CRO-Zagreb, ⁵Veterinary Faculty, University of Zagreb, CRO-Zagreb

E-mail: BFILIPIC@ibmi.mf.uni-lj.si

Cellular microtumors represent an important tool to study the antiproliferative and antitumor activity of human and animal interferons *in vitro*. During the experiments the direct and indirect influence of human interferon α and porcine interferon β on the growth properties and morphology of cellular microtumors of PLA

(Adult pig kidney cell line) and HeLa cells was studied. Both types of cells were primarily cultivated as monolayer in Eagle's medium +8% of SR 2.05. To get microtumors, cells were seeded into the »bacteriological grade« petridishes. After 3-4 days of cultivation in CO₂ atmosphere, the monolayer cells begin to form

the microtumors containing 30-100 cells. They were sedimented at 500 RPM/10 minutes, and resuspended in the fresh medium + 8% of SR 2.05 in a »concentration« of ca. 100 microtumors/ml. The microtumors were then seeded into the tissue-grade 3 cm petri dishes and treated with different amounts of human interferon α (Institute of Immunology, Zagreb, Croatia) and porcine interferon β (Institute of Microbiology and Immunology, Ljubljana, Slovenia): 1000, 500, 100, 50, 10 and 1 I.U./ml. To verify the effects of human interferon α international standard was used in a concentration of 500 I.U./ml. During the experiments 3-5 days after the attachment and spreading on the surface they were followed. The obtained results of the experiments show: (1) The attachment of microtumors on the surface is not influenced either by human or porcine interferon. (2) Spreading on the surface in form of monolayer is highly

sensitive to the interferon type and concentration. (3) The redistribution of alkaline phosphatase (AP) in the monolayer

outgrowth and decreased level of NO (Nitric oxide) in the medium can be seen. In conclusion it can be said, that the cel-

lular microtumors represent a useful tool for the study of interferon's antitumor activity *in vitro*.

Poster

Welche Zelllinien können in definiertem synthetischen Medium kultiviert werden?

Ein ambitioniertes Projekt - Aufruf zur Zusammenarbeit

René W. Fischer¹, Ferruccio Messi², Pablo Umena¹, Andreas H. Zisch¹ und Franz P. Gruber³

¹ETH, CH-Zürich, ²Messi Cell Culture Technologies, CH-Zürich, ³FFVFF CH-Zürich
E-mail: rene.fischer@bc.biol.ethz.ch

Es gibt viele Gründe, die den modernen Forscher veranlassen, Wege zu suchen, welche es erlauben, ohne den Einsatz von fötalem Kälberserum (FCS) in Zellkulturen auszukommen. Es sind dies unter anderen:

- Ethische Aspekte der Gewinnung und der Vermarktung des Kälberserums.
- Schwierigkeiten bei der amtlichen Registrierung der Produkte, die mit serumabhängigen Medien gewonnen wurden.
- Kosten beim „Down-stream Processing“ das heisst bei der Reinigung der Zellkulturprodukte wie z.B. Antikörper und rekombinierten Proteinen.

In den letzten Jahren sind denn auch einige Fortschritte in der serumfreien Zell-

kultur gemacht worden. So bieten heute verschiedene Medienhersteller „serumfreie“ Nährmedien an, diese in ihrer Zusammensetzung jedoch meist nicht definiert, d.h. sie enthalten teilweise ebenfalls undefinierte Serumersatzstoffe wie pflanzliche Extrakte. Diese Formulierungen lösen die ethischen Konflikte, lassen jedoch die Probleme der Reinigung und Registrierung ungelöst.

Messi und Fischer entwickelten kürzlich ein komplettes System zur Herstellung und Produktion monoklonaler Antikörper in definiertem synthetischem Medium. Zur Zeit stehen als Fusionspartner die beiden Myelom-Zelllinien

P3X63Ag8.653Ag8 und die Sp 2/0 in definiertem synthetischen Medium zur Verfügung. Die Fusionen der Milzzellen der mit dem GERBU MM Adjuvans immunisierten Mäusen zeigen überdurchschnittliche Ausbeuten an immunpositiven Klonen.

In der eben begonnenen Zusammenarbeit verschiedener Forschergruppen - das Projekt wird finanziell vom Fonds für versuchstierfreie Forschung (FFVFF) und der Ligue Suisse contre la Vivisection getragen - wird versucht, Konditionen für die serumfreie Kultivierung verschiedener zusätzlicher Zelllinien zu erarbeiten. Einen Schwerpunkt bilden Zelllinien, welche für die Gewinnung von rekombinierten Proteinen eingesetzt werden, wie CHO, HEK etc. Die Optimierung der Bedingungen für die Antikörperherstellung wird innerhalb dieses Projekts ebenfalls weiter verfolgt.

Die Projektleiter begrüßen Kommentare und Beteiligungen anderer Gruppen, die mit anderen Zelllinien (als Beispiel seien Hepatozyten erwähnt) arbeiten und ebenfalls mit der beschriebenen Problematik konfrontiert sind. Kontaktaufnahmen: rene.fischer@bc.biol.ethz.ch oder fpg@bluemail.ch (Franz P. Gruber).

Poster

Extracellular Matrix Gel as a Three Dimensional Cell Culture Model for Muscle Tissue Engineering

Wolfram Frick, Heidrun Eberl, Barbara Kapeller, Erwin Falkner, Marcel Philipp, Udo Losert and Karin Macfelda

Department of Biomedical Research, University of A-Vienna
E-mail: a8908977@unet.univie.ac.at

Introduction and Objectives

In tissue engineering, three dimensional biodegradable scaffolds are used as a structure for cell anchorage, proliferation and differentiation. The currently used biodegradable scaffolds in tissue engineering may show toxic degradation and inflammatory reactions. The aim of this study is to establish a new three-dimensional cell culture model within cells showing

homogenic distribution and a quick tissue development with no toxic degradation.

Materials and Methods

Rat skeletal muscle cells were isolated from *M. glutaeus* by mechanical treatment. The Extracellular Matrix Gel (ECM-Gel) is a soluble basement membrane extract of Engelbreth-Holm-Swarm tumor that gels at room temperature. Its major components

are laminin, collagen IV, entactin and heparan sulfate proteoglycan. Growth factors, plasminogen activators and other components have also been detected in ECM-Gel. Before seeding the cells into the gel, rat myocytes were characterised by immunohistochemical staining with anti-Skeletal-Muscle-Actin 1A4 and anti-Sarcomeric Actin Alpha-Sr-1. The cells were suspended in cold ECM-Gel. This solution was mixed with Gelatin and seeded into a silicone-cylinder. The Concentration of cells was 1×10^7 /ml. To detect the cells after fixation, they were additionally stained with Lipophilic Tracer Components, a fluorescent colour-labelling system for living cells and tissue.

Results

Immunohistochemical staining of cultured cells showed a minimum of 95%

myocytes. Light microscopy studies for tissue development based on the three dimensional ECM-Gel structures showed a homogenous distribution of cells in the gel after 3 hours. The addition of Gelatin prevented the sinking of the cells. After 18 hours the cells were accumulated to cell-clusters of approximately 300 μm diameter, in some

specimen the cells were accumulated to thin layers (Myotubes). After 18 hours the viability of the myocytes was at least 70%. The investigation of cryo-sections of the specimen showed the presence of the Lipophilic Tracer Components after fixation with formaldehyde.

Conclusion

A three dimensional ECM-Gel can serve as a useful scaffold for tissue engineering. It takes optimal requirements for autologous replacement of muscle tissue. In addition, by staining with Lipophilic Tracer Components, it is also easy to detect the replaced tissue in reexaminations for future *in vivo* experiments.

Poster

ELISA-Assay and Microcosm: A Combined Tool for Assessing the Potential of Botulinum Neurotoxin C1 Production in Aquatic Sediments

Martina Fuchsberger¹, Thomas C. Zechmeister¹, Andreas H. Farnleitner², Alexander Eiler³, Friedrich Pittner⁴, Renate Rosengarten¹, Robert Mach², Branko Velimirov³, Alois Herzig⁵ and Alexander K. T. Kirschner³

¹Inst. of Bacteriology, Mycology and Hygiene, University of Veterinary Medicine, A-Vienna, ²Inst. of Biochemical Technology and Microbiology 172/5, Technical University, A-Vienna, ³Inst. of Medical Biology, University A-Vienna, ⁴Inst. of Biochemistry and Molecular Cell Biology, Vienna Biocenter, University A-Vienna, ⁵Biological Research Inst. of Burgenland, A-Ilmitz

Botulinum neurotoxin (BoNT) is a main cause of botulism outbreaks in wild waterfowl, poultry, cattle and horse leading to great loss of endangered bird populations and domestic animals each year. The toxin serotype C1 is produced by toxigenic clostridia under anaerobic conditions and appropriate substrate

availability, and is always associated with shallow aquatic ecosystems. Detailed knowledge about the particular habitats/microenvironments that favour the toxigenesis of BoNT/C1 for significant toxin production is crucial for all botulism management activities. Habitats like the sediment itself, benthic

invertebrates or vertebrate carcasses have been proposed.

In this study, the potential of toxin production in aquatic sediments was assessed using microcosms as representative model systems. Different natural conditions and ecological processes were simulated to favour a habitat suitable for toxin production.

Our results showed that BoNT C1 was produced in sediments only after high artificial nutrient additions or after incubation with mat-forming algae.

The detection of the toxin was performed with a newly developed ELISA assay. Compared with the parallel used mouse bioassay the ELISA assay was more sensitive, timesaving and cheaper. Our data suggest that microcosms as representative model systems combined with the ELISA assay can be used as a tool for assessing the potential of BoNT C1 production in aquatic sediments without the ethically questionable mouse bioassay.

Poster

Freisetzung von Phospholipiden und Isoprostanen aus der perfundierten, menschlichen Umbilicalvene

Tanja Grobuschek, Martina Butter, Helga Lampert, Klaudia Hummer, Astrid Walch, Wolfgang Sametz, Reinhold Wintersteiger¹ und Heinz Juan

Institut für Biomedizinische Forschung, Universität A-Graz; ¹Institut für Pharmazeutische Chemie, Universität A-Graz

E-mail: heinz.juan@kfunigraz.ac.at

Verschiedene Entzündungsmediatoren, sowohl endogene wie Bradykinin (BK), Histamin (HIS), als auch der Kalzium Ionophor A23187 oder eine mechanische Endothelschädigung führen zu einer vermehrten Prostaglandin (PG)- und Phospholipid (PL)-Freisetzung an isoliert, perfundierten Gefäßen von Kaninchen. Die PL-Freisetzung könnte einen weiteren Pa-

rameter für Entzündungen und Zellschädigungen – auch im Hinblick auf Toxizitätstests – darstellen. Zusätzlich konnte eine gesteigerte Isoprostanfreisetzung beobachtet werden. Die Quantifizierung der durch Autooxidation gebildeten Isoprostane dient zum Nachweis von freien Radikalen und somit auch von oxidativem Streß.

Das Ziel dieser Studie war folgendes:

Ersatz eines perfundierten, tierischen Organs durch ein menschliches Blutgefäß als alternatives *in vitro* Modell zur Untersuchung von Mechanismen betreffend Entzündungen und Zellschädigungen. Zu diesem Zweck wurde die isoliert perfundierte menschliche Nabelschnurvene ausgewählt.

Zur PG- und PL- Bestimmung wurde ¹⁴C markierte Arachidonsäure (AA), die Vorstufe proinflammatorischer PG und anderer Eicosanoide, mit Hilfe eines Recycling Verfahrens in die PL der Gefäßzellmembranen eingebaut. Die freigesetzten ¹⁴C-PG und ¹⁴C-PL wurden mit Hilfe eines Szintillationszählers vermessen.

Die Quantifizierung der Isoprostane erfolgte immunochemisch mittels Enzym-Linked-Immunsorbent-Assay (ELISA).

Am Modell der perfundierten Nabelschnurvene konnte die durch HIS und A23187 induzierte Freisetzung von PL und PG unter Kalziumentzug mittels EGTA signifikant zurückgedrängt werden. Bei zusätzlichem Einsatz von Arachidonyltrifluoromethylketon, ein Inhibitor der Kalzium-unabhängigen Phospholipase

(iPLA₂), wurde die PG-Biosynthese sogar vollkommen gehemmt. Homocystein, ein wahrscheinlich unabhängiger Risikofaktor für KHK, förderte in Kombination mit H₂O₂ die Freisetzung von Phospholipiden.

Zusammenfassend zeigen unsere Ergebnisse, daß die Vene der isolierten Nabelschnur des Menschen ein erfolgverspre-

chendes *in vitro* Modell für Entzündungen und Zellschädigungen darstellt. Um festzustellen, ob dieses *in vitro* Modell möglicherweise auch für Toxizitätstests geeignet ist, wurden bereits Voruntersuchungen mit toxischen Substanzen begonnen, mit dem Ziel, den Einsatz von Tieren im Rahmen dieser Tests zu reduzieren.

Poster

ZEBET-Datenbank und Informationsdienst über Alternativen zum Tierversuch

Barbara Grune, Antje Dörendahl, Susanne Skolik, Horst Spielmann und Rainer Box
Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch (ZEBET), Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV), D-Berlin
E-Mail: grune.zebet@bgvv.de

Im Rahmen des Vollzugs des Tierschutzgesetzes nimmt ZEBET in Deutschland auf Anfragen von Länderbehörden zu Anträgen auf Genehmigung oder Anzeigen von Tierversuchsvorhaben auf dem Wege der Amtshilfe gutachtlich Stellung. Darüber hinaus beantwortet ZEBET Anfragen von Wissenschaftlern, Tierschutzbeauftragten und anderen Interessenten zur Anwendung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zu Tierversuchen. In den vergangenen Jahren stieg vor allem die Anzahl der Anfragen von Laboratorien zur Etablierung von *in vitro* Methoden. Diese Entwicklung beruht auf der zunehmenden Anerkennung sicherheitstoxikologischer *in vitro* Prüfmethode, die von ZEBET international in enger Kooperation mit der EU und mit der chemisch-pharmazeuti-

schen und kosmetischen Industrie validiert wurden. Die Entwicklung und prozentuale Aufteilung der Anfragen werden in Graphiken dargestellt.

Das BgVV stellt seit Februar 2000 die Datenbank der ZEBET über Alternativmethoden zu Tierversuchen in englischer Sprache über das Deutsche Institut für Medizinische Information und Dokumentation (DIMDI) online und lizenzfrei unter der Adresse <http://www.bgvv.de> zur Verfügung. Das entscheidende Kriterium für die Aufnahme von Methoden in die ZEBET-Datenbank ist die Bewertung, ob durch die Anwendung der Methode das Leiden der Tiere vermindert (*Refinement*), die Anzahl der Versuchstiere reduziert (*Reduction*) und/oder Tierversuche ersetzt (*Replacement*) werden. Außerdem werden

der Entwicklungsstand und die wissenschaftliche oder behördliche Akzeptanz der Alternativmethoden bewertet und dokumentiert. Die Dokumente der ZEBET-Datenbank gliedern sich in Datenfeldern wie z.B. Bezeichnung der Methode, Schlagwörter, Bewertung, Zusammenfassung und Literatur auf.

Recherchen in der ZEBET-Datenbank werden mit dem von DIMDI entwickelten *Retrievalsystem* durchgeführt. Die vierteljährlichen Nutzerberichte des DIMDI geben Auskunft über die Anzahl der Zugriffe auf die ZEBET-Datenbank und die Anzahl der Dokumente, die aus der ZEBET-Datenbank kopiert und weiterverwendet wurden. Im Jahr 2000 wurde insgesamt 11.300 mal auf die Datenbank zugegriffen und insgesamt 2.400 mal Dokumente kopiert. Diese Zahlen werden in einer Graphik zusammenfassend dargestellt. Bisher gibt es 12 Links von Webseiten deutscher und internationaler Institutionen auf die ZEBET-Datenbank.

ZEBET arbeitet international mit verschiedenen Informationszentren zusammen. Dazu gehört vor allem das ECVAM-Informationssystem SIS, das in diesem Jahr zur Nutzung unter der Adresse <http://ecvam-sis.jrc.it> geöffnet wurde.

Poster

Effect of Co-culturing Renal Epithelial Cells with Microvascular Endothelial Cells on Transcellular Resistance and Barrier Function

Paul Jennings and Walter Pfaller
Institute of Physiology, University of A-Innsbruck
E-mail: paul.jennings@uibk.ac.at

Introduction

The interactions between human renal epithelial and human renal microvascular cells have not been studied at an *in vitro* level. Since transepithelial resist-

ance measurements and barrier function is being used more frequently in the study of renal epithelial function we investigated the possibility of an effect of co-culturing microvascular endothelial cells

with renal epithelial cells on these parameters.

Methods

The human dermal microvascular cell line (5A32) was co-cultured with the renal proximal convoluted tubule cell line (HK-2) and primary human glomerular microvascular cells (GMEC) were co-cultured with human primary renal tubular cells (HPT). Primary cells were isolated from surgical samples by gradient centrifugation. GMEC were isolated using CD-31 coated magnetic beads from cellular outgrowths of renal glomeruli. Endothelial cells were seeded microporous

(Whatman, AnoporeTM) inserts followed 2-3 hours later by renal epithelial cells on the other side of the insert. Trans-cellular resistance (TCR) was measured using an ENDOHM volt-ohm meter (WPI, FL USA). Barrier function or paracellular permeability of cultures was assessed using FITC labeled inulin applied to the apical side of the epithelia and measured in both compartments 24hrs later.

Results

GMEC had low TCR (12 ± 2 Ohms.cm²) and were freely permeable to FITC-Inulin (61.0 ± 2.3 μ g/cm²/day). HPTs had a modest electrical resistance (28 ± 12 Ohms.cm²) and formed a modest barrier

to FITC-inulin (43.9 ± 0.4 μ g/cm²/day). However, when both cell types were cultured together TCR increased 2,9 fold (81 ± 16 Ohms.cm²) and inulin permeability decreased 2.5 fold (17.7 ± 5.0 μ g/cm²/day). The dermal microvascular cell line 5A32 exhibited a very low resistance throughout culture never surpassing 3,5 Ohms.cm². The human proximal tubule cell line HK-2 formed a slight resistance which increased with culture time, reaching a peak value at day 4 and 5 of 16-18 Ohms.cm². HK-2's have been reported to have a very low electrical resistance due to miss-localization of the tight junction protein occludin. When HK-2's and 5A32's were co cultured an increase in

resistance formed, that was 28,9% greater than their additional resistance measurements. However co-culturing these cells did not significantly improve barrier function to inulin (not shown).

Conclusion

We report for the first time an improved function of the renal epithelial barrier when renal epithelial cells are cultured with microvascular endothelial cells. It is likely that endothelial cells are influencing expression of differentiated function in renal epithelial cells in culture.

This work was part of project BIO4-CT98-2006 of the European Commission.

Poster

Release of Endothelin and IL-6 from Co-cultures of Microvascular Endothelial Cells and Renal Proximal Tubular Cells in Response to TNF alpha, IL-2 and Cyclosporin A

Paul Jennings¹, Gavin Ryan, Michael P. Ryan, Germar-Michael Pinggera and Walter Pfaller¹

¹Institute of Physiology, University of A-Innsbruck, ²Dept. Pharmacology, University College, IRL-Dublin, ³Dept. of Urology, A-Innsbruck
E-mail: paul.jennings@uibk.ac.at

Introduction

We have developed human co-culture models to study the interaction between the renal microvasculature and the renal epithelium. Primary renal tubular cells and primary renal microvascular cells are isolated from the cortex of renal material obtained from the healthy region of nephrectomised tissue. A cell line model has also been developed using 5A32 endothelial and a proximal tubular HK-2 cells. The cell line model should be useful for routine screening of human therapeutic cytokines. Human TNF alpha, recombinant IL-2 and Cyclosporin A have been applied to the cell culture models and changes in endothelin and IL-6 have been assessed.

Methods

Microvascular endothelial cells were seeded onto aluminum oxide supports (Whatman, AnoporeTM) followed 2 -3 hrs later by

renal epithelial cells on the other side of the filter. Human TNF alpha (0-100ng/ml), IL-2 (0-100ng/ml) and CsA (0-4.2 μ M) was applied to both the epithelial and endothelial side of the co-cultures in either 1% FCS MCDB 131 or MCDB-131 without serum. Endothelin 1,2 (EIA) and IL-6 (EIA) was measured in cell supernatants 24hrs after stimulation. TER and inulin flux was also measured on monocultures of HK-2 cells to determine the effects of chronic cytokine exposure to the renal epithelial barrier function.

Results

TNF alpha resulted in a dose dependent increase in IL-6 in HK-2 cells, 5A32 cells and co-cultures of both cell types. However, TNF alpha did not cause a significant increase in the release of endothelin 1,2 from these cultures. TNF

alpha caused a dose and time dependent destruction of the HK-2 monolayer as assessed by TER, inulin permeability and phase contrast microscopy. IL-2 showed a slight increase in endothelin release from the primary glomerular microvascular endothelial cells (GMEC), human primary tubular cells (HPT) and from co-cultures of both cell types. This effect was more prominent for the HPT basolateral side. IL-2 also corrupted the HK-2 barrier significantly at 96hrs of treatment. CsA had no effect on the release of IL-6 but significantly decreased endothelin release from HK-2/5A32 cocultures.

Conclusions

We report the use of two novel models to investigate the interaction of the renal epithelia with microvascular endothelial cells. These models are suitable to gain more information on cytokine effects to barrier function of epithelial and endothelial cells. Furthermore, these models represent a reliable basis for future studies on cytokine cross talk between epithelia and microvascular endothelial cells.

This work is part of project BIO4-CT98-2006 of the Biotechnology Programme of the European Commission.

Poster

Permanent Female and Male Egg-Lines of BALB/CI Mice – an Alternative Concept for reproductive toxicity testing ?

Martina Klemm, Elke Genschow, Manfred Liebsch and Horst Spielmann

Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch (ZEBET), Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV), D-Berlin
E-Mail: zebet@bgvv.de

While several *in vitro* tests are available for replacing animal experiments in base-level screening of new substances, few have been defined adequately for quantitative studies in reproductive toxicology. In order to offer a sensitive and predictive *in vitro* method to assess the genotoxic potential of chemical agents on male and female reproduction, we established primordial germ (PG) cell-derived permanent female and male embryonic germ (EG) and embryonic stem (ES) cell lines

of the mouse (strain Balb/cJ). All EG and ES cell lines were characterised (by PCR and karyotype) and periodically checked for quality criteria like alkaline phosphatase activity and mean generation time (MGT) to ensure clone stability.

The differences in developmental sensitivity of EG cells, ES cells and differentiated fibroblast cells of the mouse cell line 3T3 regarding genotoxicants were comparatively tested under identical test conditions. Cytotoxicity assay was based upon

determination of growth inhibition (MTT-test) and genotoxic effects were determined by sister chromatid exchanges (SCE) induced by standard reference mutagens like Ethylnitrosourea (ENU), Methylnitrosourea (MNU), Methylmethansulfonate (MMS), Hydroxyurea (HU) and Mitomycin C (MMC). After calibrating the *in vitro* EG cell assay by testing positive and negative control substances, we are now starting to clarify if our *in vitro* test system can reliable and reproducibly discriminate between known genotoxic and non toxic agents. Furthermore, a distinction between different degrees of genotoxic effects is mandatory for our assay. To classify the genotoxic potential of all tested chemicals we will develop a biostatistical prediction model on the basis of concentration-response curves and exclusion of a major impact of cytotoxicity. Finally we would like to establish an additional *in vitro* test focusing on EG cell progression through meiotic prophase as predictive endpoint for sex-specific genotoxicity testing.

Poster

CYTOMORPH-b – eine neuartige, meniskusfreie Mikrotestplatte für Phasenkontrastmikroskopie, Mikrophotographie und Image Reading

Renate Klöcking¹, Jörg Wönne² und Peter Wutzler¹

¹Friedrich-Schiller-Universität Jena, Institut für Antivirale Chemotherapie, D-Jena; ²Dr. Fritz Nerbe Entwicklungsgesellschaft, D-Winsen/Luhe
E-mail: rkloeck@zmkh.ef.uni-jena.de

Untersuchungen in Zellkulturen, wie z.B. die Testung antiviraler Substanzen, erfordern eine regelmäßige mikroskopische Kontrolle des Zellbildes, einmal, um die Wirkung des untersuchten Agens einzuschätzen, zum anderen, um Wachstum und Vitalität der unbehandelten Kontrollzellen zu überprüfen. Da ungefärbte Zellen kaum einen Einfluss auf die Amplitude des durchtretenden Lichtes haben, ist die Hellfeldmikroskopie für diesen Zweck ungeeignet. Die Methode der Wahl ist die Phasenkontrastmikroskopie (PKM), mit deren Hilfe Phasenunterschiede in Amplitudenunterschiede umgewandelt werden. Leider lässt sich die PKM in englumigen

(Durchmesser <20 mm), mit Flüssigkeit gefüllten Gefäßen wie den Kavitäten einer Mikrotestplatte (MTP) nicht anwenden, da der hier auftretende Meniskus als Sammellinse wirkt und mit dem Phasenkontrast interferiert. Dieser Nachteil englumiger Gefäße verhindert auch die zur Quantifizierung von *in situ* Reaktionen erforderliche Mehrpunktmessung im Plattenphotometer. Mit der neuen MTP CYTOMORPH-b werden die optischen Nachteile herkömmlicher MTP erstmalig überwunden.

CYTOMORPH-b ist eine mit 3x3 Kavitäten ausgestattete MTP für Zellkulturen und ein Prototyp für ähnlich konstru-

ierte Platten höherer Multiplizität. Die Anordnung der 9 zylindrischen Kavitäten entspricht der einer 96er MTP. Der Deckel der Platte besitzt kongruent zu den Kavitäten 3x3 Vertiefungen und kann in zwei Positionen arretiert werden. Die obere, sog. Belüftungsstellung, ist für Zellwachstum und -erhaltung erforderlich. Sie erlaubt die einfache hellfeldmikroskopische Untersuchung gefärbter Zellen sowie photometrische Einzelmessungen. In der unteren Position des Deckels, der sog. Mikroskopierstellung, kommen die Deckelvorsprünge mit der in den Kavitäten befindlichen Flüssigkeit (Medium, Puffer etc.) in Berührung und planieren so den Meniskus an der Oberfläche. Dadurch werden PKM und alle Arten der photometrischen Messung einschließlich Mehrpunktmessungen (z.B. mit dem Image Reader von Tecan) möglich.

Beispiele für die Anwendung von CYTOMORPH-b in der täglichen Praxis eines Zelllabors, in der Wirkstoffforschung sowie für quantitative Apoptosemessungen mit Hilfe der TUNEL-Reaktion werden im Poster dargestellt.

Poster

Bewertung der zytotoxischen Wirkung zahnärztlicher Werkstoffe mit dem XTT-Tetrazoliumreduktionstest EZ4U

Katja Hoffmann¹, Renate Klöcking² Hans-Peter Klöcking¹

Friedrich-Schiller-Universität Jena, ¹Institut für Pharmakologie und Toxikologie/Be-
reich Erfurt und ²Institut für Antivirale Chemotherapie, D-Erfurt

E-mail: hpkloeck@zmkh.ef.uni-jena.de

Eine Bewertung der Zytotoxizität von zahnärztlichen Werkstoffen (Komposite, Kompomere, Dentalzemente) wurde in humanen U937-Zellen mit Hilfe des XTT-Tetrazoliumreduktionstests EZ4U vorgenommen. Aus den pastenartigen Materialien der Komposite und der Kompomere wurden Prüfkörper in der Größe von Zahnhalsfüllungen in Schablonen modelliert und nach den Angaben der Hersteller ausgehärtet. Die Oberfläche der Prüfkörper betrug 33 mm². Unmittelbar nach Fertigstellung wurden die Prüf-

körper mit den Zellen und dem sie umspülenden Medium in Kontakt gebracht. Nach 1- bzw. 24-stündiger Exposition bei 37°C wurde der XTT-Test durchgeführt. Die berechneten halbmaximalen zytotoxischen Konzentrationen (CC₅₀) dienten als Grundlage für die Bewertung der Zytotoxizität der Materialien. Die CC₅₀-Werte für die Komposite (Glacier, Wave, Spektrum) lagen zwischen 65 und 107 mg/0,2 ml nach 1-stündiger und zwischen 8 und 12 mg/0,2 ml nach 24-stündiger Exposition. Das zusätzlich von Spek-

trum-Prüfkörpern nach 72-stündiger Extraktion erhaltene und separat getestete Eluat war nach 24- (CC₅₀: 55mg/ml) und 48-stündiger (CC₅₀: 19 mg/ml) Exposition der Zellen weniger toxisch als in Gegenwart der Prüfkörper. Die CC₅₀-Werte für Kompomere (F2000, Dyract, Freedom) lagen in der gleichen Größenordnung wie die der Komposite, zwischen 63 und 162 mg/0,2ml nach einstündiger und zwischen 4 und 10 mg/0,2 ml nach 24-stündiger Exposition. Die Dentalzemente erwiesen sich von den untersuchten Materialien als am stärksten zytotoxisch. Nach 24-stündiger Exposition lag die CC₅₀ bei 4 µg/0,2ml für Cupro Dur N und bei 770 µg/0,2 ml für Ionofil Molar. Die für 1-stündige Exposition erhaltenen CC₅₀-Werte (12 mg/0,2 ml für Cupro Dur N und 18 mg/ml für Ionofil Molar) ließen einen derartigen Zytotoxizitätsanstieg nicht vermuten. Die Zytotoxizität war bei allen untersuchten Materialien abhängig vom Gewicht bzw. von der Oberfläche des Prüfkörpers sowie von der Dauer der Exposition.

Poster

Zellkultur unter kontinuierlicher Nährstoff-Perfusion als neuer Weg bei *in vitro* Toxizitätstests

Christian Koppelstätter, Paul Jennings und Walter Pfaller

Institut für Physiologie, Universität A-Innsbruck

E-mail: christian.koppelstaetter@uibk.ac.at

Einleitung

Zur Nephrotoxizitätsprüfung eingesetzte Zellkultur-Modelle beruhen bisher im wesentlichen auf klassisch statischen Zellkulturtechniken. Epitheliale Zelllinien des proximalen Nephrons wachsen in Petri-Schalen als Monolayer und werden als solche den jeweiligen Prüfsubstanzen ausgesetzt. Die Zytotoxizität wird über Veränderungen diverser Stoffwechselleistungen, der Morphologie und der Zell-Viabilität ermittelt. Da Epithelien jedoch normalerweise auf zwei Seiten von extrazellulären Flüssigkeitsräumen, oft unterschiedlicher Komposition, umgeben sind, ist die Form der statischen Zellkultur weder als physiologisch noch als organotypisch anzusehen. Eine Verbesserung kann erreicht werden, indem man mikroporöse Wachstumsunterlagen (Fil-

ter) für die Kultivierung verwendet. Die *in vivo* gegebene Konstanz des extrazellulären Milieus kann aber nur durch kontinuierliche Zu- und Abfuhr von Nährmedium in einer Perfusionskultur erzielt werden.

Material und Methoden

Ein kommerziell erhältliches, auf porösen Wachstumsunterlagen basierendes Perfusionszellkultursystem wurde modifiziert, um stabile organotypische Kulturbedingungen im Hinblick auf Medienaustausch und Temperaturstabilität über lange Zeiträume zu gewährleisten. Damit konnten stabile Kulturen mit einer humanen proximalen Tubulus-Zelllinie (HK-2) über einen Zeitraum von 24 und 72 Stunden erreicht werden. Mit diesem modifizierten Perfusionskultursystem wurden 2 Test-

substanzen – Paracetamol und DMSO (Dimethyl Sulfoxid) – in 5 Konzentrationen (Paracetamol: 0.17mmol/L, 0.66mmol/L, 2.55mmol/L, 16.58mmol/L, 42.33mmol/L; DMSO: 28.8mmol/L, 91.13mmol/L, 287.98mmol/L, 911.3mmol/L, 2887.5mmol/L) auf ihr nephrotoxisches Potential untersucht und die erzielten Ergebnisse mit den in konventionell statischen Kulturen erhaltenen verglichen.

Als Endpunkte zur Beurteilung der Nephrotoxizität wurden die Konversion des Redox-Indikators „Alamar Blue“, die Aktivitäten des zytosolischen Enzyms Laktat-Dehydrogenase sowie des plasmamembranären Enzyms γ-Glutamyl-Transferase und der Proteingehalt gewählt. Aus diesen Daten wurden die IC₅₀ Werte der Testsubstanzen ermittelt.

Ergebnisse

Nephrotoxische Effekte beider Prüfsubstanzen wurden unter Perfusionsbedingungen bereits bei niedrigen Konzentrationen gefunden, was auf eine deutlich höhere Sensitivität dieses Systems hinweist. Die IC₅₀ Werte bewegten sich dabei im Bereich der jeweiligen toxischen Plasmakonzentration beim Menschen.

Diskussion

Mit dieser Perfusionskulturmethode besteht damit die Möglichkeit, zukünftig Nephrotoxizität unter organotypischen Bedingungen über lange Zeiträume zu

untersuchen. Daraus ergibt sich erstmals die Möglichkeit der *in vitro* Prüfung „chronisch toxischer“ Effekte an Zellen humanen Ursprungs und damit eine potente Alternative zu Tierexperimenten.

Unterstützt durch „Standards Measurements and Testing“ (IV Rahmenprogramm) der Europäischen Union, SMT95-3407

Poster

Early and Delayed *in vitro* Cytotoxic Effect of Industrial Chemicals – Comparison with *in vivo* Data

Ewa Kuchowicz, K. Rydzyski and M. Staczyk

The Nofer Institute of Occupational Medicine, PL-Lodz E-mail: ewak@imp.lodz.pl

The basal cytotoxicity test is often used as a first stage of *in vitro* toxicity assessment of chemicals. Fifteen different industrial chemicals were tested on 3T3-L1 mouse fibroblasts using Neutral Red Uptake (NRU) and MTT reduction (MTT) assays. Cells were incubated with xenobiotics for 3 hours in cell culture medium (water soluble) or in mineral oil (insoluble in water). The cytotoxic effect was measured at two times: immediately after incubation

with the chemical and 7 days after. The results expressed as median effective concentrations - EC_{50} were compared with *in vivo* rabbit eye irritation data expressed as Modified Maximum Average Score (MMAS). The results were compared with short term EC_{50} obtained in our earlier study (Neutral Red Release assay) on the same cells. The correlation between *in vitro* and *in vivo* data for short term test was about $r = -0.6$ (Spearman). The compari-

son of EC_{50} of delayed cytotoxicity test and MMAS showed significant correlation $r = -0.777$ for NRU and $r = -0.810$ for MTT. Immediately following exposure the NRU assay revealed less effect on the cells than did the MTT assay for several substances. Our data showed that the short-term test of cytotoxicity assessment seems to indicate cell membrane damage. Delayed assessment of cytotoxic action of xenobiotics covers the full spectrum of toxic response. It may be concluded that assessing cytotoxicity after short exposure to a chemical and making a further assessment of the cellular effects might generate better prediction of potential toxic effects. The next twelve chemicals are under testing.

References: Kuchowicz, E., and Rydzyski, K. (1999). *ATLA* 1999, 367-377.

Poster

In vitro Cortical Cultures for Functional and Toxicological Characterisation of Drugs

Christina Lampert and Johannes Mosbacher

Novartis Pharma AG, Research Nervous Systems, CH-Basel

E-mail: christina.lampert@pharma.novartis.com

In vitro cultures from immature rat brain cortical cells exhibit spontaneous oscillatory activity pattern under specific culture conditions. These low frequency (0.1-0.5 Hz) oscillations can be measured using Ca^{2+} -sensitive dyes and fluorescence image reader in 96- or 384 well plates. The average number of plates achieved from one pregnant rat is 6 (0.5 plate/embryo). This assay can replace classical *in vitro* preparations like cortical wedges or slice cultures, reducing the number of animals that have to be killed by a factor of 5 (96-well plates) or even 20 (384-well plates).

Oscillations may last for more than 1 hr and are dependent on a functional interplay of several neuronal and glial receptors, channels and proteins: Strong and stable oscillations are detected with a healthy glia cell layer, an unblocked NMDA receptor by removal of $Mg(2+ext)$, a blocked GABAA receptor by picrotoxin or a higher $[K](+ext)$. Activation of presynaptic G protein coupled receptors like adenosine A1/3, mGlu2 or GABAB receptors lower oscillations frequency without reducing the oscillation peak amplitudes. Blocking Na^+ or L-type Ca^{2+} channels abolish oscillations, as do inhibitors of non-NMDA glutamate

receptors, positive modulators of GABAA receptors, activators of K^+ channels, and inhibitors of the presynaptic release machinery. The use of known specific inhibitors allows to determine the target of novel compounds. On the other side, "fingerprinting" the effect of a compound can help in identifying novel compound classes with desired effects on neuronal activity without exactly knowing the specific target. Such a functional assay may be combined with gene expression assays to correlate compound effects on modifying genes and function of cortical cultures. Furthermore, acute and chronic toxic effects of novel compounds are readily detectable in these cortical cultures by incubating them shortly or for several days with the compound under investigation. The ability of neurons to oscillate is critically dependent on their integral functionality, thus allowing a sensitive measure of neurotoxic effects. Therefore, for reducing the number of animals that have to be killed these experiments are a really promising tool.

Poster

Elektronische Haut statt Messungen an Versuchspersonen

Norbert Nessler

Institut für Angewandte Physik, Universität A-Innsbruck

E-mail: norbert.nessler@uibk.ac.at

In der Elektrochirurgie dient die Neutralelektrode (*grounding plate, dispersive electrode*) zur Erdung des Patienten und zur Rückleitung des Stromes, notwendig zum Schneiden und Koagulieren, zum HF-Generator. Die Neutralelektrode muß als sicherheitsrelevantes Zubehör nach MPG den Sicherheitsanforderungen nach EN 60601-2-2 und dem AAMI HF-18 Standard genügen. Dabei sind Erwärmungsmessungen an Versuchspersonen vorgesehen. Abgesehen von technischen und ethischen Problemen ist auf diese Weise eine routinemäßige (Qualitäts-) Überprüfung gemäß ISO 9001 nicht möglich.

Die meßtechnische Problematik besteht darin, daß der menschliche Körper als Volumsleiter je nach Hautbeschaffenheit unterschiedliche Stromkonzentrationen am Rand der Neutralelektrode („*edge effect*“) und damit Wärmeentwicklung beim Durchgang des HF-Stromes (ca 500 kHz) bewirkt. Der Nachweis, daß die Sicher-

heitsgrenze von 6°C Temperaturanstieg nicht überschritten wird, wird derzeit an Versuchspersonen mittels Thermokamera erbracht.

Aus Berechnungen am Zylindermodell eines Oberschenkels mit Finiten Elementen sind Strom- und Leistungsdichten in den modellierten Hautschichten (Epidermis, Corium, Unterhaut mit Fettgewebe und Muskel) bekannt und dienen als Vorgabe für ein dreidimensionales Widerstandsnetzwerk, das die elektrischen Eigenschaften der Haut für HF-Strom nachbildet. Dabei wird in Anlehnung an AAMI HF-18 ein Prisma von jeweils 1 cm² Querschnitt durch die Hautschichten mit Widerständen nachgebildet. Jede Schicht wird durch 6 Widerstände (2 „vertikale“ zur Zylindermitte, je 2 „horizontale“ in radialer und tangentialer Richtung) modelliert. Zur praktischen Realisierung auf je 1 cm² einer Leiterplatte ist eine Reduktion der Anzahl der Widerstände erforder-

lich. Die ursprünglichen 24 Widerstände wurden auf eine Gruppe von 7 SMD-Widerständen reduziert, die die menschliche Haut so nachbilden, daß die Stromverteilung und die Erwärmung mit der Modellrechnung und mit Experimenten an Versuchspersonen übereinstimmen.

Die fertige Meßplatine besteht aus einer goldbeschichteten Leiterplatte mit ca 200 je 1 cm² großen, elektrisch getrennten Teilflächen zum Aufkleben der zu testenden Neutralelektrode. Diese Teilflächen sind auf der Rückseite mit dem Widerstandsnetzwerk verbunden. Als Belastung wird die im AAMI HF-18 Standard festgelegte „Standardbelastung“ von 700 mA HF-Strom während 60 s angelegt. Die Temperaturerhöhung wird mit einer Transistormatrix (1 Transistor je cm²) gemessen, wobei die gesamte Wärmeentwicklung von Widerständen und der als Testobjekt aufgeklebten Neutralelektrode erfaßt wird. Die Basis-Emitter-Diode wird dabei als Temperatursensor verwendet.

Die Meßergebnisse stimmen genau mit der Modellrechnung und mit der nach den Versuchspersonen-Experimenten zu erwartenden Temperaturverteilungen überein. Es zeigt sich der bekannte „Randeffekt“, dieser wiederum ist je nach Hautbeschaffenheit (Werte der Widerstände) mehr (dicke Haut) oder weniger (dünne Haut, geringe Fettschicht) ausgeprägt.

Poster

Glukokortikoidausscheidung bei Labormäusen: Möglichkeit einer nicht-invasiven Erfassung von Belastungen

Rupert Palme¹, Chadi Touma², Norbert Sachser² und Erich Möstl¹

¹Institut für Biochemie, Veterinärmedizinische Universität A-Wien; ²Institut für Neuro- und Verhaltensbiologie, Westfälische Wilhelms-Universität D-Münster

E-mail: rupert.palme@vu-wien.ac.at

Als ein wichtiger physiologischer Parameter zur Beurteilung akuter bzw. chronischer Belastungen bei Tieren werden häufig Glukokortikoidkonzentrationen herangezogen. Dabei stößt die Blutprobengewinnung aber besonders bei kleinen Labortieren, wie z.B. der Maus, auf methodische Schwierigkeiten, die ein kontinuierliches individuelles „*Monitoring*“ von Streßhormonkonzentrationen stark erschweren. Ziel unserer Studie war es da-

her, die Ausscheidung von Kortikosteron im Kot bzw. Urin von Labormäusen zu untersuchen, um Techniken einer nicht-invasiven Erfassung von Streßhormonmetaboliten bei dieser Tierart zu etablieren.

Dazu wurden acht männlichen und acht weiblichen Mäusen des Stammes C57BL/6J jeweils 20 µCi tritiummarkiertes Kortikosteron verabreicht und anschließend über fünf Tage kontinuierlich alle Kot-

und Urinproben der Tiere aufgefangen. In den Proben wurde die Radioaktivität bestimmt, und die Metaboliten wurden charakterisiert. Bei allen Tieren trat das Ausscheidungsmaximum im Urin bereits kurze Zeit nach der Injektion auf (Median: 2h), wohingegen im Kot die Maximalausscheidung erst später beobachtet wurde (Median: 10h). Bezüglich des Ausscheidungsweges ergaben sich deutliche Geschlechtsunterschiede. Die Männchen schieden im Mittel rund 72%, die Weibchen hingegen nur rund 56% der ³H-Kortikosteronmetaboliten im Kot aus (U-Test, p<0,001). Der Großteil der Metaboliten erwies sich als polarer als das injizierte Hormon. Mit Hilfe neu entwickelter Enzymimmunoassays ließen sich einige dieser Metaboliten detektieren, wodurch ihre quantitative Messung möglich erscheint.

Die Ergebnisse zeigen damit, daß es nach einer entsprechenden Validierung der Methode möglich sein sollte, die

Nebennierenrindenaktivität von Labormäusen anhand der leicht zu sammelnden Kotproben zu bestimmen. Dadurch könnten sich in der biomedizinischen

Forschung an Mausmodellen neue Perspektiven eröffnen. So wäre es mit diesem nicht-invasiven Verfahren möglich, über längere Zeiträume hinweg z.B. den

Einfluß von Haltungsbedingungen zu untersuchen und eine Reduktion der benötigten Versuchstierzahlen voranzutreiben.

Poster

Quantitative Image Analysis as *in vitro* Embryotoxicity Endpoint Based on a Novel Embryonic Stem Cell Clone with Endoderm Related GFP Expression

Martin Paparella¹, Eugene Kolossov², Bernd Fleischmann², Juergen Hescheler², Susanne Bremer¹

¹ECVAM, JRC, Institute for Health and Consumer Protection, I-Ispra; ²University of Cologne, Depart. of Neurophysiology, D-Cologne
E-mail: martin.paparella@jrc.it

The capability of pluripotent embryonic stem cells (ESC) to differentiate *in vitro* into different tissues provides the opportunity to develop an *in vitro* assay for screening chemicals for their embryotoxic potential. ESC clones carrying tissue specific reporter gene constructs are currently being developed. The clones should allow the quantification of chemical effects on the development of germ layers and main target tissues.

We report the establishment of the μ -fetoprotein GFP/D3 reporter gene clone: The -7.6kb upstream region of the α -fetoprotein (AFP) gene is regulating GFP expression in D3 cells. AFP was applied as a marker for endodermal cells. Differentiation of this clone via embryoid bodies (EBs, spheroids of cells), leads to green fluorescence on the EBs surface. The AFP related GFP expression was confirmed by immunohistochemistry and by

transfecting the reporter gene construct into the AFP positive clone EPI7 that is an endodermal subclone of the embryonic carcinoma cell line P19.

An easy and quick image analysis based on endpoint measurement was developed for quantifying low numbers of GFP expressing cells. As demonstrated with the embryotoxic chemical diphenylhydantoin, image analysis allows distinguishing between a general effect on the EB growth and a specific effect on the development of GFP positive endodermal cells. Endoderm development was inhibited at a different dose than cardiomyocytes development. This hints to the fact that the ESCs are a potent system to give specific information on the effects of embryotoxic substances. However, for the embryotoxic substances Dexamethasone, Caffeine and Fluorouracil the EC50 values were similar for the three endpoints. The practical value of the new system has to be investigated further by testing more substances and other tissue specific endpoints.

Poster

Ein Vergleich von LLC-PK₁ Zellen in konventionell statischer Kultur und in Perfusionskultur mit dem EpiFlow -System

Walter Pfaller¹, Paul Jennings¹, Edward Felder² und Thomas Seppi³

¹Institut für Physiologie der Universität A-Innsbruck; ²Dept. Cell and Developmental Biology, University of USA-Pennsylvania; ³Klinik für Strahlentherapie der Universität A-Innsbruck

E-mail: walter.pfaller@uibk.ac.at

Epithelzellen des proximalen Nephrons dedifferenzieren unter statischen Zellkulturbedingungen innerhalb weniger Stunden von einem Phänotyp mit ausgeprägtem oxidativen Stoffwechsel in einen Phänotyp mit glykolytischer Stoffwechsellaage. Für die Dedifferenzierung von Nierenepithelien gibt es viele Gründe, einer davon ist die inhomogene Versorgung der Kulturen, über die Zeit, mit Nährstoffen;

ein weiterer ist die suboptimale Versorgung mit Sauerstoff. Aus diesem Grund wurde in unserem Labor ein neues Zellkultursystem - *EpiFlow* - entwickelt, das kontinuierliche Zu- und Abfuhr von Nährmedium gewährleistet und mikroporöse Wachstumssubstrate für Zellen verwendet. Letztere führen bereits unter statischen Kulturbedingungen zu einer deutlichen Verbesserung in der Expression dif-

ferenzierter Zellfunktionen. Darüberhinaus sorgt eine in das System integrierte, spezielle Begasungseinrichtung für eine verbesserte Oxygenierung des Kulturmediums und der Zellen.

LLC-PK₁ Zellen, die unter *EpiFlow* Bedingungen kultiviert wurden, zeigen einen gegenüber den statischen Vergleichskulturen deutlich verbesserten oxidativen Stoffwechsel. Dies läßt sich aus der Veränderung folgender Funktionsparameter erkennen:

1) erhöhte Sensitivität der mitochondrialen Funktion gegenüber Antimycin A, 2) verminderte Aktivität glykolytischer Enzyme, 3) erhöhte Aktivität der Phosphat abhängigen Glutaminase, 4) Erhöhung des intrazellulären ATP Gehaltes und 5) Veränderung der Zellarchitektur (Zunahme der Zell-Höhe, Zunahme des intrazellulären Mitochondrien Volumens, Zunahme der Dichte und Länge der Mikrovilli des apikalen Zellpoles).

Die Schlußfolgerung aus diesen Beobachtungen ist:

LLC-PK₁ Zellen, die unter *EpiFlow* Bedingungen kultiviert werden, entwickeln einen Phänotyp, der den *in vivo* Be-

dingungen wesentlich eher entspricht als jener von LLC-PK₁ Zellen, die auf soliden Wachstumsunterlagen (Glas oder Plastik) unter statischen Zellkulturbedingungen kultiviert werden.

Unterstützt durch das Biotechnologie-Programm (IV Rahmenprogramm der Europäischen Kommission), BIO4-CT98-2006.

Poster

In vitro Quality Assessment of Tannin Containing Sri Lankan Shrub Legumes in the Rumen Simulation Technique (RUSITEC)

Thakshala Seresinhe, Christine Iben and Josef Böhm

Institute of Nutrition, University of Veterinary Medicine, A-Vienna, Austria

E-mail: Christine.Iben@vu-wien.ac.at

A rumen simulation technique (RUSITEC) apparatus with four 850 ml fermentation vessels was used to determine the nutritive value of two shrub legumes *Gliricidia sepium* and *Calliandra calothyrsus*. Polyethylene glycol (PEG-4000) was also added to some *in vitro* fermentations (150 mg/10 g of plant substrate) to assess the effects of tannins on digestion of dry matter (DM). Freeze dried ground (2 mm) plant samples (leaves and tender stems) of two species

were incubated for 48 hours in RUSITEC (n=3). *Gliricidia sepium* had higher DM disappearance (3.06 and 3.04 g d⁻¹ respectively) with (+) and without (0) PEG. However, the PEG addition caused an increase in rate and extent of DM disappearance in *Calliandra calothyrsus* (2.25 (+) PEG and 2.40 g d⁻¹ (0) PEG respectively). Total gas production appeared to be poorly related to the DM disappearance of both species. PEG addition also affected the microbial mass. When comparing the two

species, *G. sepium* with higher DM disappearance had higher microbial mass in the fermenter liquid (955.3 (+) PEG and 1236 mg d⁻¹ (0) PEG respectively) than *C. calothyrsus* (905.7 (+) PEG and 1073 mg d⁻¹ (0) PEG respectively).

It is concluded that RUSITEC evaluation provide realistic values for estimation of different feeding values eg. DM degradation of two shrub legumes. However, further investigations on fermentation end products and quantification of tannins should also be undertaken to evaluate the nutritive value. Based on the results of this study it can be suggested that RUSITEC method can be used as an appropriate alternative for ruminant feedings trials.

Keywords: RUSITEC; *Gliricidia sepium*, *Calliandra calothyrsus*, Polyethylene glycol, DM disappearance, microbial mass

Poster

EURCA: A New Approach in the Search for Alternatives to Animal Use in Higher Education

Jan van der Valk¹, Jasmijn de Boo¹, Jake Broadhurst² and David Dewhurst²

¹NCA, Dept. Animals & Society, Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University, NL-Utrecht

²Faculty Group of Medicine & Veterinary Medicine, The University of Edinburgh, UK-Edinburgh

E-mail: nca@pobox.uu.nl

Experimental animals are used in education and training at a low but still significant level. Information on the availability of alternatives to animal use in education is accessible in databases (e.g. NORINA and AVAR) and several information centres can be consulted (e.g. FRAME, NCA, InterNICHE, CAAT and ECVAM). However, by viewing and getting hands-on experience with the alternatives users may

be better able to find out what the applicability for specific purposes may be. Teachers of science are interested in the efficacy of an alternative in a 'real' teaching situation. Teachers might wish to discuss with developers or end-users how a particular alternative may be tailored to suit specific "local" needs. To improve the information dissemination on available alternatives, the University of Edinburgh and the Utrecht

University have established the *European Resource Centre for Alternatives in higher education* (EURCA).

EURCA's main aims are:

- Establishing a collection of alternatives and demonstrating them to teachers and students for hands-on experience.
- Taking the Resource Centre to relevant scientific meetings in Europe as a drop-in advice centre for teachers.
- Carrying out site visits to demonstrate good practice in the use of alternatives.
- Setting up an Internet website with an expanded database on alternatives, demonstration versions of alternatives, evaluations, links to users or developers.
- Establishing collections of alternatives throughout Europe for demonstration to teachers and students.

Currently, the EURCA Internet website (<http://www.eurca.org>) is being developed technically in Edinburgh. Alternatives are being collected and described in Utrecht.

Poster

Die isoliert perfundierte Schweineextremität als standardisiertes Testsystem für nicht-invasive Applikationssysteme

Susanne Wagner¹, Ana Cristina Nogueira², Stefan Klug², Bruno Christ¹

¹Mediport Biotechnik GmbH, D-Berlin

²Institut für klinische Pharmakologie und Toxikologie, Abteilung Toxikologie der Freien Universität D-Berlin

E-mail: wagner@mediport.net

Die Perfusion der isolierten Schweineextremität wurde so optimiert, dass mit dem Modell unter standardisierten Bedingungen reproduzierbare Daten für die Wirkstoffentwicklung in der kosmetischen und pharmazeutischen Industrie sowie in der Entwicklung medizintechnischer Geräte gewonnen werden können. Weibliche Schlachttiere (deutsche Landrasse-Hybride) aus kontrollierter Haltung und Fütterung werden gemäß der Fleischhygiene-Verordnung einer Lebenduntersuchung unterzogen und geschlachtet. Die Gewinnung von Blut wie auch die Präparation der Extremität und die Versuchsdurchführung erfolgen gemäß *Standard Operating Procedures*. Parameter wie Glukosekonzentration, Druck und Fluss werden so eingestellt, dass die Perfusion

über einen Zeitraum von 6 Stunden standardisiert verläuft. Mit Hilfe der Perfusionsapparatur wird die Extremität mit verdünntem Blut durchströmt. Über ein Dialysem modul erfolgt neben der Erwärmung des Perfusats auch die Anreicherung mit Sauerstoff und Glucose. Fluss, Druck, Temperatur und pH-Wert werden *online* erfasst und aufgezeichnet. Darüber hinaus werden weitere Parameter wie Blutgase, Elektrolyte, Sauerstoffsättigung, Hämoglobin und Hämatokrit zur Beurteilung der Perfusions- und Organqualität in festgelegten Zeitintervallen gemessen und gegebenenfalls nachgeregelt.

In einer Anwendung des Modells für Resorptionsuntersuchungen wurde Glyzerolnitrat in Form eines transdermalen therapeutischen Systems appliziert (Pflasterkonzentration 25 und 50 mg, n=6,5). Die Bestimmung der Glyzerolnitratkonzentration im Perfusat ergab einen zeitlich korrelierten Anstieg der Substanz innerhalb des Versuchszeitraumes von 6 Stunden. Die im Modell erzielten Konzentrationen waren mit für den Menschen in der Literatur beschriebenen Werten vergleichbar.

Bei der Entwicklung nadelfreier Injektionssysteme erwies sich das Modell der isolierten Schweineextremität auf Grund der hohen Übereinstimmungen hinsichtlich der Hautbeschaffenheit zwischen Mensch und Schwein als gut geeignet für die Beurteilung der Handhabbarkeit der Systeme. Gleiches gilt für die histologische Bestimmung der Eindringtiefe und die Verteilung der applizierten Substanz.

Die Extremität des Schweins als komplexes osteo-myokutanen Präparat ist gut geeignet für transdermale Resorptions- und Penetrationsuntersuchungen. Sie ist leicht zugänglich, so dass messtechnische, bildgebende, diagnostische und andere medizintechnische Geräte gut platziert werden können. Durch die Festlegung von Qualitätsstandards liefert das Modell reproduzierbare Daten und stellt somit eine Alternativemethode zum Tierversuch in der Wirkstoffentwicklung und in der Entwicklung medizintechnischer Geräte dar.

MEGAT-Nachrichten

Einladung zur Jahreshauptversammlung 2001 der MEGAT im Rahmen des 10 Kongresses über Alternativen zu Tierversuchen & der 7. Jahrestagung der MEGAT

Datum: 29. September 2001 / Zeit: 18:00-19:00 / Ort: Universität A-Linz

Tagesordnung:

1. Begrüßung
2. Feststellung der Beschlussfähigkeit
3. Genehmigung der Tagesordnung
4. Genehmigung des Protokolls der MEGAT-Hauptversammlung vom 25. September 2000

5. Bericht des Präsidenten
6. Bericht des Vorstandes für Finanzen und Verwaltung
7. Entlastung des Vorstandes
8. Neuwahl des Vorstandes und der Kontrolle
9. Bericht über ALTEX

10. Aufnahme neuer Mitglieder
11. Jahreshauptversammlung 2002
12. Vorausplanung Kongress 2003
13. Verschiedenes

Anträge an die Hauptversammlung müssen bis längstens 8 Tage vor der Hauptversammlung schriftlich dem Vorstand bekanntgegeben werden, um zur Beschlussfassung zugelassen werden zu können. Zusätzlich zum Antragsteller muss

der Antrag von mindestens 10 weiteren Mitgliedern der MEGAT durch Unterschrift unterstützt werden, um zur Beschlussfassung zu gelangen oder die Hauptversammlung beschließt mit einfacher Mehrheit die Zulassung zur Be-

schlussfassung (§9 Abs 1 Statuten der MEGAT).

Auf Ihr zahlreiches Erscheinen in Linz freut sich der Vorstand.

gez. Helmut Appl (Mitglied des Vorstands)