

2 Literaturübersicht

2.1 Einsatz von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch in der chemisch-pharmazeutischen Industrie

Für die Entwicklung neuer Chemikalien und auch Arzneiwirkstoffe werden sowohl *In-vitro*- [8] als auch *In-vivo*-Methoden (OECD Richtlinien) eingesetzt. Die Wirksamkeit und insbesondere die Sicherheit einer neuen Substanz werden durch Resultate aus diesen experimentellen Arbeiten für die Zulassungsbehörden für Arzneimittel bzw. Chemikalien dokumentiert. Dabei sind Art und Umfang der vorzulegenden Daten weitestgehend durch nationale bzw. internationale Gesetze und Richtlinien geregelt (Committee for Proprietary Medicinal Products – CPMP/ICH/286/95 – Mod. release Nov. 2000 bzw. Bekanntmachung der Neufassung der Allgemeinen Verwaltungsvorschriften zur Anwendung der Arzneimittelprüfrichtlinien, Bundesanzeiger, Nr. 96a, 1995). Wo immer es möglich ist, wird der Einsatz von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch entsprechend dem 3-R-Prinzip (Reduce, Refine, Replace) nach Russel und Burch [1] gefördert, um die Zahl der benötigten Versuchstiere sowie die Belastung der Tiere so gering wie möglich zu halten (Committee for Proprietary Medicinal Products – CPMP/ICH/728/95 bzw. Tierschutzbericht 2005). In einzelnen Bereichen der Arzneimittelentwicklung sind die Alternativ- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch vom Gesetzgeber bereits vorgeschrieben (Deutsches Tierschutzgesetz in der Fassung und Bekanntmachung vom 25. Mai 1998) und in Art und Umfang spezifiziert (Bekanntmachung der Neufassung der Allgemeinen Verwaltungsvorschriften zur Anwendung der Arzneimittelprüfrichtlinien, Bundesanzeiger, Nr. 96a, 1995 bzw. US FDA, Guidance for Industry, ICH M3 Document Non-Clinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials for Pharmaceuticals 1997, amendiert in 2000). Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Nachweis der Arzneimittelsicherheit werden von den Zulassungsbehörden erst dann akzeptiert, wenn diese ein umfangreiches, oft über mehrere Jahre dauerndes Validierungsverfahren durchlaufen haben [9] (Committee for Proprietary Medicinal Products – CPMP/ICH/728/95). Bisher ist die Anzahl der entsprechend validierten und von den Behörden anerkannter Alternativmethoden gering [10-12].

Treibende Kräfte der Weiterentwicklung und Validierung zusätzlicher Alternativmethoden sind auf nationaler bzw. europäischer Ebene die Zentralstelle für die Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch (ZEBET) in Berlin sowie das European Center for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) in Italien. Unabhängige Kommissionen, wie z.B. das ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC), beurteilen wissenschaftlich validierte Protokolle und sprechen Empfehlungen für die Zulassungsbehörden von Arzneimitteln und Chemikalien aus [11]. Den Zulassungsbehörden steht es frei, den

Empfehlungen zu folgen. Ihrerseits können die Behörden auch Empfehlungen zur Weiterentwicklung solcher Methoden und auch zu den Anforderungen an Alternativmethoden formulieren.

Dieser interaktive Prozess schließt mit ein, dass auch nach abgeschlossener Validierung Protokolle weiter optimiert und standardisiert werden.

2.2 *In-vitro*-Systeme in der Reproduktionstoxikologie

Die Reproduktionstoxikologie ist ein Teilgebiet der Toxikologie, in dem Einflüsse exogener chemischer und physikalischer Noxen auf die vorgeburtliche Entwicklung von Mensch und Tier erforscht werden. Die embryonale Entwicklung und die maternal-fetal-plazentaren Interaktionen sind sehr komplex und es ist wenig bekannt über die sehr unterschiedlichen Wirkmechanismen der Teratogene. Daher ist allgemein akzeptiert, dass die Tierversuche an trächtigen Ratten oder Kaninchen in der Reproduktionstoxikologie (OECD Richtlinien Nr. 414, 415, 416, 421 und 422) nicht durch *In-vitro*-Methoden ersetzt werden können, zumindest nicht in der näheren Zukunft [13]. Dennoch besteht Einigkeit darüber, dass die Anzahl der benötigten Versuchstiere deutlich reduziert werden kann, wenn als Screening-Verfahren Alternativmethoden verwendet werden [2]. Hierbei sollen die Testchemikalien nach ihrem embryotoxischen Potential klassifiziert bzw. eingestuft werden, damit diese für weitere Untersuchungen im Tierversuch priorisiert werden können. Gegenüber *In-vivo*-Modellen haben *In-vitro*-Verfahren den Vorteil, dass *in vitro* eine genau definierbare Exposition realisierbar ist [14].

In den letzten Jahrzehnten wurden in der Reproduktionstoxikologie eine Reihe von Alternativmethoden unterschiedlicher Komplexität etabliert [13]. Diese reichen von einfachen Zellkulturen, bis zu hoch komplexen Modellen, wie sie die Kulturen ganzer Embryonen darstellen. Drei dieser *In-vitro*-Modelle wurden zur Bestimmung der Embryotoxizität von Chemikalien und Arzneimitteln in einer ECVAM Studie im Jahr 2000 erfolgreich validiert [5]. Dazu gehören der Micromass (MM) Test, Kulturen dissoziierter Zellen von Extremitätenknospen und des Mittelhirns von Rattenembryonen (MicromassTest [MM]; [15]), der embryonale Stammzelltest [EST] [16] und der Rat Whole Embryo Culture [WEC] Test [17]). Diese Methoden wurden entwickelt, um Substanzen zeit- und kostensparend sowie unter Vermeidung von Tierversuchen auf ihr embryotoxisches Potential zu prüfen. Für alle drei *In-vitro*-Testsysteme wurden biometrische Prädiktionsmodelle entwickelt, welche die Klassifizierung der Testsubstanzen in drei Embryotoxizitätsklassen (stark, schwach und nicht embryotoxisch) ermöglichen. Dabei stufte der WEC Test, unter Berücksichtigung der Zyotoxizitätsdaten von den untersuchten Substanzen, das embryotoxische Potential von 20 ausgewählten Testsubstanzen zu 80 % korrekt (MM 70 % und EST 78 %) ein [5]. Die stark embryotoxischen Stoffe wurden von allen drei Testmodellen zu 100 % richtig klassifiziert [5]. Die Prädiktivität des WEC Tests war mit der des EST vergleichbar und größer als die des MM.

Die WEC hebt sich von den anderen beiden Testsystemen durch ihre geordneten embryonalen Gewebe- bzw. Organanlagen als Zielstruktur ab und kommt den *In-vivo*-Verhältnissen am nächsten. Dadurch ist in der WEC das Spektrum möglicher toxikologisch relevanter Zielorgane bzw. –gewebe sehr breit. Störungen der Embryogenese können so mit größerer Wahrscheinlichkeit detektiert werden als in weniger komplexen Alternativmethoden. Nur in diesem Testsystem können sich embryotoxische Effekte aufgrund von Störungen der physiologisch geordneten Zell-Matrix-, Zell-Zell-, Zell-Gewebe- oder Zell-Organanlagen-Interaktionen manifestieren. Die WEC ist der einzige, validierte *In-vitro*-Embryotoxizitätstest, bei dem einzelne Organanlagen oder entwicklungsbiologische Prozesse der Embryonen identifiziert werden können, an denen sich spezifische, entwicklungstoxikologische Effekte manifestieren (Abb. 1).

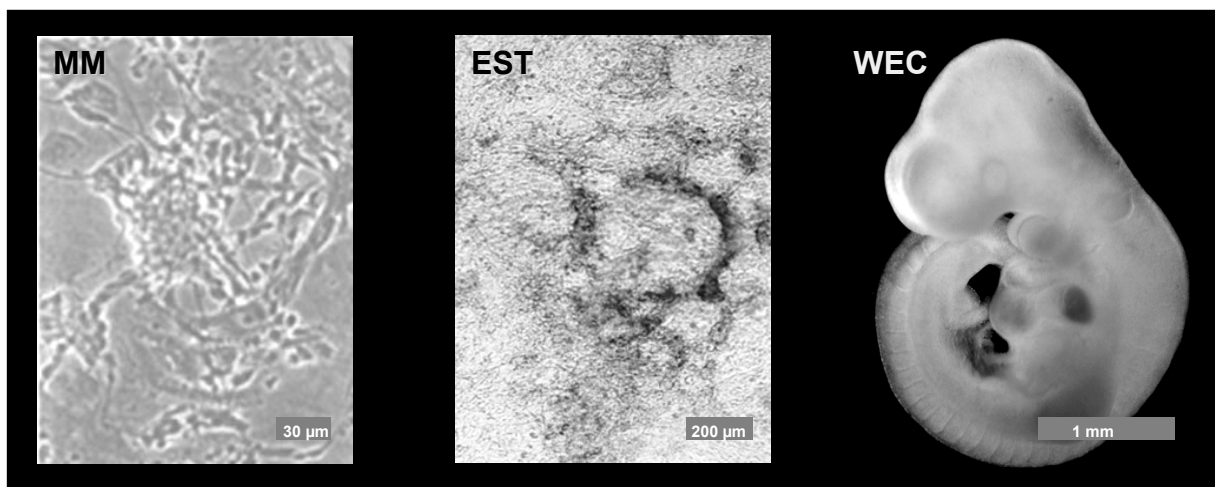


Abb. 1: Darstellung der Untersuchungsobjekte des Micromass Tests (MM), des Embryonalen Stammzelltests (EST) und des Whole Embryo Culture Tests (WEC) am Ende der jeweiligen Kulturzeit

2.3 Standardisierung der Whole Embryo Culture (WEC)

2.3.1 Allgemeine Erläuterungen

Die Kultivierung ganzer Embryonen kann sowohl mit Fisch-, Amphibien- und Vogel- als auch mit Säugetierembryonen von der Maus, der Ratte oder dem Kaninchen durchgeführt werden. Die Kulturbedingungen der verschiedenen Spezies sind nicht vergleichbar. Zudem sind die Ergebnisse einzelner Kulturen nicht auf andere übertragbar. Die Kulturen der Maus- und Rattenembryonen sind grundsätzlich ähnlich, dennoch muss auch hierbei stets der Speziesunterschied bei der Befundinterpretation berücksichtigt werden. Da die vorliegende Studie Rattenembryonen verwendete, beziehen sich die Aussagen der folgenden Darstellungen, wenn nicht anders benannt, nur auf diese Spezies.

Weiterhin unterscheidet man bei der Kultur ganzer Embryonen zwischen Kulturen mit Prä-Implantations-Embryonen und solchen mit Post-Implantations-Embryonen. Bei der ersten Form entwickeln sich Embryonen des 2- bis 8-Zell-Stadiums bis zum Blastozysten-Stadium [18;19]. Verwendet man dagegen Post-Implantations-Embryonen werden Embryonen der frühen Somiten-Stadien über einen Großteil des Entwicklungszeitraums der Organogenese inkubiert [20;21]. Beide Kulturtechniken repräsentieren sehr unterschiedliche entwicklungsbiologische und reproduktionstoxikologische Phasen. Im Folgenden wird, wenn nicht anders benannt, ausschließlich von Post-Implantations-Embryonen gesprochen.

2.3.2 Historische Entwicklung der Kultur ganzer Embryonen

Die Kultur von ganzen Embryonen geht auf die Pionierarbeiten des Entwicklungsbiologen Nicholas aus dem Jahr 1934 zurück [22]. Er etablierte eine statische Kultur von Rattenembryonen, bei der die Embryonen in einem Uhrglas auf geronnenem Plasma inkubiert wurden. Diese Kulturform unterstützte nur eine geringe und schlecht reproduzierbare Entwicklung der Embryonen. Es war aber die erste Arbeit, die den Beweis erbrachte, dass ein Embryo die Fähigkeit besitzt, wenn auch nur für eine kurze Zeit, sich außerhalb des Muttertieres zu entwickeln. New et al. [23] untersuchten diverse Parameter der statischen Kultur ganzer Embryonen und konkretisierte 1964 die limitierenden Faktoren dieser Kulturtechnik, insbesondere in der unmittelbaren Umgebung des Embryos:

1. Abnahme der Nährstoffe,
2. Anreicherung der Stoffwechselendprodukte und
3. Schwierigkeiten der Sauerstoffversorgung.

Die Problematik der optimalen Nährstoffversorgung und Stoffwechselproduktentsorgung wurde schon früh erkannt. Die Lösung war die Etablierung der dynamischen Kultur, bei der das Kulturmedium um die Embryonen zirkuliert. Die ersten Versuche hierzu wurden von Nicholas et al. 1938 beschrieben. Ihre Kulturapparatur, bestand aus einem sehr komplizierten Glasrohrsystem, ermöglichte Ergebnisse, die bereits eine deutliche Verbesserung gegenüber der statischen Kultur darstellten [24]. New et al. entwickelten die dynamische Kulturapparatur für Embryonen daraufhin weiter und konnten erstmals eine annähernd mit der *In-vivo*-Entwicklung vergleichbare Entwicklung der Embryonen über 24 Stunden experimentell darstellen [25]. Mittels dieser Kulturapparatur charakterisierten Entwicklungsbiologen eine Vielzahl von wichtigen Kulturbedingungen für Embryonen während der Organogenese und leiteten damit den Prozess der Standardisierung von Kulturen ganzer Embryonen ein [26]. Die Einführung der Roller-Kultur-Technik vereinfachte erheblich den Kulturaufbau [20] und so wurde die Kultur ganzer Embryonen auch für die Reproduktionstoxikologie interessant. Mit dieser Rollerkulturtechnik war es erstmals möglich, Untersuchungen in relativ großem Stichprobenumfang durchzuführen. Diese Kulturtechnik entwickelte sich inzwischen weltweit zum Standardprotokoll der Kultur von Post-Implantations-Embryonen [27].

2.3.3 Einflussgrößen auf die Standardisierung der Kultur ganzer Embryonen (WEC)

Neben der in Kapitel 2.3.2 beschriebenen Roller-Kultur-Technik sind folgende Kulturparameter für die Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse aus der WEC von Bedeutung:

1. Kulturdauer,
2. Inkubationstemperatur,
3. Begasungsschema der Kultur,
4. Entwicklungsstadien der Embryonen zu Beginn der Kultur,
5. Tierspezies und Tierstamm sowie
6. Kulturmedium.

In den grundlegenden Arbeiten der Entwicklungsbiologie konnten die ersten drei Einflussgrößen genau charakterisiert und die Optima für die Kultur der ganzen Embryonen bestimmt werden [21;27-29].

2.3.3.1 Kulturdauer

Verschiedene Kulturperioden lassen *In-vitro*-Untersuchungen verschiedener Phasen der Organogenese zu. Eine Kulturdauer bis zu 72 Stunden – d.h. vom Vor-Somiten- bis zum 40-Somiten-Stadium – ist heutzutage möglich. Kulturzeiten von bis zu 48 Stunden ab dem Gestationstag 9,5 haben sich als günstig erwiesen, da dieser Zeitraum die entscheidenden Phasen der Organogenese erfasst (Abb. 2 und 3) und mögliche artifizielle Einflüsse (beginnende Retardierungen) durchaus vermeidbar bleiben [30-32].

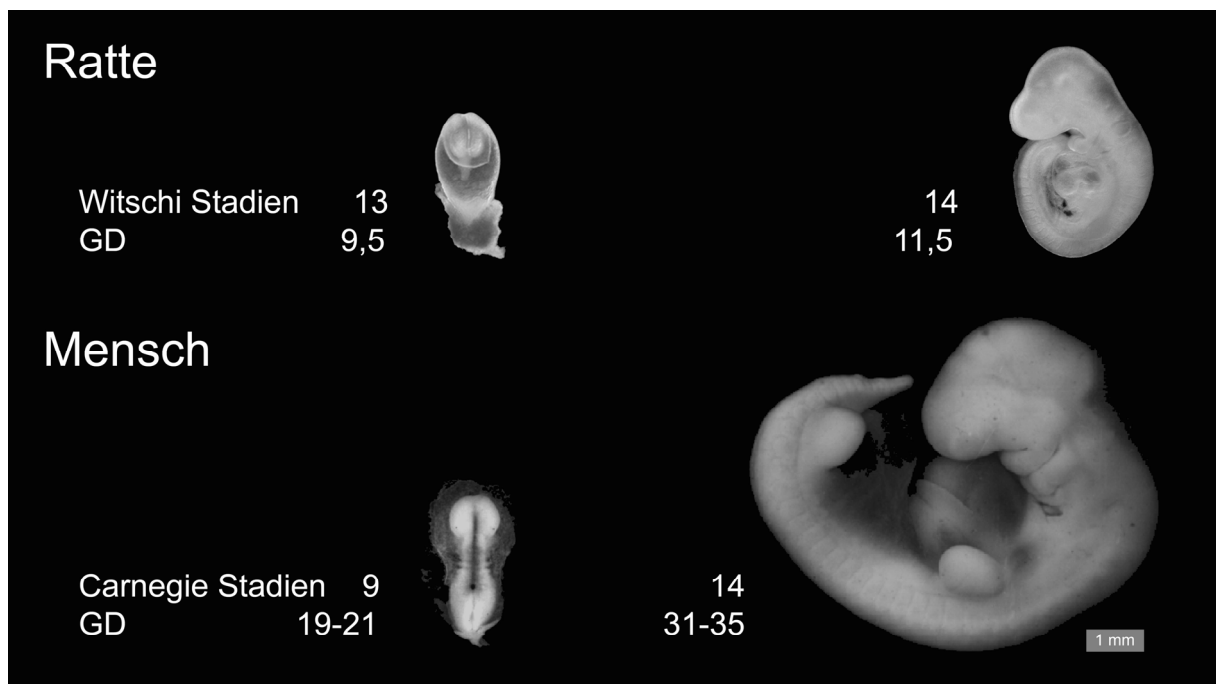


Abb. 2: Gegenüberstellung des Entwicklungsstandes der Rattenembryonen am Anfang und am Ende der Kultur mit entsprechenden Entwicklungsstadien des Menschen (Großteil der Organogenese)
GD – Gestationstag, Ziffern geben die Stadiumsnummer der Embryonen von den verschiedenen Einteilungsschemata wieder.
Witschi E et al. [33] und O’Rahilly R et al. [34].

Da es Abhängigkeiten der Sensitivität und Sensibilität der Embryonen gegenüber Testsubstanzen sowohl in Bezug auf das Entwicklungsstadium der exponierten Embryonen [35] als auch in Bezug auf die Expositionszeit der Embryonen [36] gibt, ist eine entsprechende Festlegung in einer Standard-Arbeitsanweisung (SOP) für die WEC als *In-vitro*-Embryotoxizitätstest notwendig. Diese wurden in den INVITTOX Protokollen Nr. 72 bzw. 123 vom European Center for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) definiert. Embryonen des Gestationstages 9,5 sollen demnach in embryotoxikologischen Studien für 48 Stunden gegenüber den Testsubstanzen exponiert werden.

2.3.3.2 Inkubationstemperatur

Das Optimum der Inkubationstemperatur liegt im Bereich von 37,0 bis 38,5 °C. Bei Abweichungen über 2 °C nach oben [37-39] bzw. unten [40] können Retardierungen in der Entwicklung bzw. Anomalien der Embryonen auftreten.

2.3.3.3 Begasungsschema

Die Embryonen zeigen während der Organogenese ein exponentielles Wachstum, wobei sich der Proteingehalt bezogen auf den gesamten Organismus ver Hundertfacht [41;42]. Diese Entwicklungsphase zeichnet sich durch eine hohe Stoffwechselaktivität aus, in der Sauerstoff eine zentrale Rolle in metabolischen Prozessen spielt. Um oxidativen Stress (Hyperoxie) zu vermeiden, müssen die zellulären Sauerstoffkonzentrationen in den Embryonen in eng definierten Grenzen gehalten werden. Die optimale Sauerstoffkonzentration ändert sich im Verlauf der Embryonenkultur und reicht am Anfang von 5 % bis zu 95 % gegen Ende der Kulturzeit [43]. Die WEC wird in der Regel unter hypoxischen Bedingungen gestartet, da die Embryonen am Anfang der Organogenese einen anaeroben Stoffwechsel haben. Im weiteren Verlauf der Organentwicklung erfolgt dann ein Übergang in den aeroben Stoffwechsel, so dass zeitgleich das Sauerstoffangebot in der Kultur erhöht werden muss [44]. Gegen Ende der Kulturen werden sogar unphysiologisch hohe Sauerstoffkonzentrationen (bis 95 %) als Optimum für die WEC eingesetzt. Diese Maßnahme kompensiert den fehlenden Plazentarkreislauf [45;46].

Trotz dieser regulierenden Maßnahmen muss der oxidative Stress als Einflussgröße auf die Ergebnisse des *In-vitro*-Embryotoxizitätstests berücksichtigt werden. Dieser könnte, zumindest in einzelnen Gewebeabschnitten des Embryos, zu adversen Befunden führen, die *in vivo* nicht aufgetreten wären [47]. Auch müssen sowohl die metabolischen Abbaewege als auch die reinen Degradationsprozesse, wie z.B. Autooxidation der Testsubstanzen, Berücksichtigung finden. So traten *in vitro* bei unphysiologisch hohen Sauerstoffkonzentrationen (40 %) höhere Metabolitenkonzentrationen als *in vivo* auf und induzierten embryotoxische Effekte [48]. Andererseits wurde bei suboptimalen Sauerstoffkonzentrationen (5 % anstatt 20 %) die Empfindlichkeit der Embryonen gegenüber toxischen Testsubstanzen erhöht [49].

2.3.3.4 Entwicklungsstadien der Embryonen eingesetzt zu Anfang der Kultur

Es geht hier um dezidierte Entwicklungsabschnitte, da Stadienunterschiede von Embryonen innerhalb weniger Stunden auftreten.

Im Rahmen einer *Inter*-Laborstudie wurde gezeigt, dass die Vergleichbarkeit der Ergebnisse der WEC eindeutig von dem Entwicklungsstadium der Embryonen beim Start der Kultur abhängt [36]. Diese Studie zeigte auf, dass die Sensitivität der Embryonen gegenüber Testsubstanzen mit zunehmendem Entwicklungsalter der Embryonen abnahm. Verschiedene Strategien wurden bisher verfolgt, um den Einfluss der variierenden Ausgangsstadien der Embryonen zu minimieren.

Als Erstes wird das Gestationsalter der Embryonen, angegeben in halbtags Schritten, herangezogen. Da dieses vom Zeitpunkt der Kopulation abhängig ist, ergibt sich alleine aus den verschiedenen Verpaarungsverfahren eine breite Streuung des Gestationsalters [50]. Die terminierte Verpaarung der Tiere für die WEC wurde anfangs als Übernachtverpaarung (ca. 16 Stunden), wie in der teratologischen Forschung weit verbreitet, durchgeführt. Ein Fortschritt stellt die Einführung der Verpaarung in wenigen Stunden (i.d.R. 2 Stunden) dar, welche die mögliche Variation der Embryonen am Versuchstag deutlich reduzierte [50]. Trotzdem bleibt bei Nagern eine relativ große biologische Variabilität der Embryonen innerhalb und zwischen den verschiedenen Würfen.

Zum Zeitpunkt der frühen Somiten-Stadien der Embryonen, dem üblichen Zeitpunkt des Starts der WEC, werden Entwicklungsstadien beobachtet, die bis zu 12 Stunden auseinander liegen [51]. Um die Streuung der Entwicklungsstadien am Anfang der Kultur zu reduzieren, wurden morphologische bzw. histologische Kriterien der Embryonen als Grundlage der Stadieneinteilungen herangezogen. Auch wenn es schon umfangreiche morphologische und histologische Beschreibungen für die pränatale Entwicklung der Nager gab [33;52], konnten diese nicht verwendet werden. Sie waren nicht detailliert genug, die Entwicklungsstadien der Embryonen am Anfang der Organogenese für die WEC differenzieren zu können. Vorhandene detaillierte morphologische Beschreibungen der Entwicklungsstadien der Embryonen [51] endeten mit der Nachweisbarkeit von Somiten. Die Einteilung der sich anschließenden Entwicklungsstadien beruhte nur noch auf der Anzahl der Somiten. Zwar korreliert die Somitenzahl der Embryonen sehr gut mit ihrem Entwicklungsalter [53], doch lassen sich die Somiten in den frühen Somiten-Stadien (1-6 Somiten) nicht unter den Präparationsbedingungen der WEC (Stereolupe) nachvollziehen. Diese sind anfangs nur histologisch und erst später morphologisch nachweisbar. Um dieses Problem für die WEC zu lösen, wurde ein unter der Stereolupe nachvollziehbares, morphologisches Einteilungsschema für den Entwicklungsabschnitt 1– bis 6–Somiten-Stadium der Rattenembryonen etabliert [54]. Es liefert die benötigte morphologische Stadieneinteilung zur Differenzierung der Entwicklung der Embryonen in einem Präparationszeitraum von 2 Stunden. Mit diesem Einteilungsschema können die Embryonen, die nach einer terminierten Verpaarung von 2 Stunden auftreten können, beurteilt

werden. Es unterteilt das Entwicklungsstadium 14 aus Witschi's morphologischer Stadieneinteilung [33] nochmals in 6 verschiedene Teilstadien 14 a bis f. Diese werden anhand von charakteristischen Formen der Neuralrinne in Kombination mit den Kopffalten definiert. Durch die gezielte Selektion der Embryonen anhand dieser Stadiendefinitionen am Anfang der WEC konnte die Streuung der Resultate signifikant reduziert werden. Dadurch ist es bei gleich bleibender Aussagekraft der Versuche möglich geworden, eine signifikante Reduktion der Anzahl der Embryonen pro Stichprobe zu erreichen.



Abb. 3: Exemplarische Fotografien von Entwicklungsstadien der Rattenembryonen während der WEC
A – Front- und Seitenansicht der Ausgangsstadien (Eizylinder am Gestationstag 9,5), B – Dottersack, der den Embryo am Ende der Kultur einschließt (Gestationstag 11,5), C - Seitenansichten der freipräparierten Embryonen am Ende der Kultur und D – Front- und Rückansicht der Embryonen am Ende der Kultur.

2.3.3.5 Tierspezies und -stamm

Im Anwendungsbereich der Reproduktionstoxikologie wird die WEC primär mit der Spezies Ratte oder Maus durchgeführt [27]. Der Speziesunterschied in der Embryologie ist so groß, dass spezifische Protokolle sowohl für die Kulturmethoden als auch deren Auswertung für toxikologische Studien entwickelt wurden [41;42;55;56]. Gegenüber Testsubstanzen zeigte die WEC der Maus im Vergleich zur WEC der Ratte speziesunterschiedliche Sensitivitäten und Sensibilitäten [57-61].

Selbst innerhalb einer Spezies können durch die Verwendung verschiedener Zuchtlinien Unterschiede bei der Durchführung der WEC auftreten [62]. Die Entwicklung der Embryonen verschiedener Zuchtlinien, kultiviert durch ein WEC Laboratorium, war nicht vergleichbar. Die beobachteten Unterschiede waren so groß, dass eine Anwendbarkeit des Protokolls für 2 von 5 Zuchtlinien nicht möglich erschien. Ebenso wurden Sensitivitäts- und Sensibilitätsunterschiede der Embryonen gegenüber Testsubstanzen innerhalb einer Spezies beschrieben [63].

2.3.3.6 Kulturmedium

Der letzte der aufzuführenden Kulturparameter, der einen wesentlichen Einfluss auf die Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse mit der WEC nehmen kann, ist das Kulturmedium. Dieses wird im folgendem Kapitel ausführlich dargestellt.

2.4 Kulturmedien für die WEC

Die Post-Implantations-Embryonen weisen sehr hohe Wachstumsraten auf. Um den Proteingehalt der Embryonen unter *In-vitro*-Bedingungen um mehr als das Hundertfache steigern zu können, werden hohe Ansprüche an das Kulturmedium der WEC gestellt [32]. Im Gegensatz zur Zellkultur muss in der Kultur der ganzen Embryonen der Bedarf einer Vielzahl von verschiedenen Zelltypen mit ihren sehr unterschiedlichen Nährstoffbedürfnissen berücksichtigt werden [4]. Das Kulturmedium muss optimale Bedingungen für die Embryonen schaffen, indem es:

1. alle essentiellen Nährstoffe in ausreichender Menge beinhaltet,
2. einen ausreichenden Gasaustausch ermöglicht,
3. Stoffwechselendprodukte aufnehmen kann,
4. eine Stabilisierung des pH-Wertes im physiologischen Bereich gewährleistet.

Nur Kulturmedien, die eine mit den *In-vivo*-Verhältnissen vergleichbare Entwicklung der Embryonen ermöglichen, sind für die Anwendung der WEC als *In-vitro*-Embryotoxizitätstest geeignet.

Bis heute werden diese Ansprüche nur durch Kulturmedien mit einem hohen Serumanteil erfüllt. Seit den siebziger Jahren werden für die Kultur von Rattenembryonen sowohl homologes Serum (Rattenserum bei Rattenembryonen) als auch heterologe Seren (alle Seren außer

Rattenserum bei Rattenembryonen) auf ihre Eignung als Kulturmedium untersucht [64]. Das homologe Serum galt geschlechtsunabhängig als das am besten geeignete Kulturmedium der WEC [64]. Erst durch die Einführung des Herstellungsprotokolls mit der sofortigen Zentrifugation des Blutes vor seiner Gerinnung [65] sowie der Hitzeinaktivierung des Serums (56 °C 30 min) [46] wurde eine der *in vivo* vergleichbare Entwicklung der Embryonen erreicht [4]. Nach diesem Protokoll prozessiertes Rattenserum wurde weltweit zum Standardkulturmedium der WEC [27]. Im Gegensatz zur WEC ist in vielen anderen Kulturen das Kulturmedium primär auf einem chemisch definiertem Basismedium (DMEM oder ISCOVE) aufgebaut und i.d.R. mit einem Serumanteil von 5-20 % supplementiert. Das Standardkulturmedium der WEC mit Nagerembryonen besteht zu 100 % aus Rattenserum [27].

Rattenserum als Grundlage birgt in sich einige Nachteile für das Kulturmedium der WEC:

1. Die blutgewinnungsbedingte Tötung der Ratten stellt einen erheblichen Bedarf an Tiermaterial dar,
2. Es stellt einen hohen Kostenfaktor durch den Tierverbrauch dar,
3. Es kann nur in kleinen Chargen produziert werden mit dem Nachteil der Chargenvariabilität.

Für eine optimale Vergleichbarkeit der Ergebnisse, sowohl der von Langzeitstudien als auch der von *Inter-Labor*studien, ist ein alternatives Kulturmedium notwendig. Es muss in großen Chargen verfügbar sein und im gleichen Umfang, wie Rattenserum, die Entwicklung der Embryonen unterstützen.

Auf der Suche nach Alternativen wurden verschiedene heterologe Seren untersucht, die in größeren Chargen bzw. ohne Tötung der Spendertiere gewonnen werden können [4]. Für diesen Zweck wurde das Serum von Kaninchen [66], Hunden [67], Rindern [3;68], Affen [69] und Menschen [70] untersucht. Um eine mit dem Rattenserum vergleichbare Entwicklung der Embryonen zu erreichen, müssen heterologe Seren für die Kultur von Rattenembryonen mit Glukose [3], Vitaminen (z.B. Folsäure) und/oder essentiellen Aminosäuren (z.B. Methionin) [68;71] und Spurenelementen (z.B. Eisen) [67] supplementiert werden. Wegen der einfacheren Verfügbarkeit wurden insbesondere Humanserum und bovines Serum intensiver untersucht. Auch hier trat das Problem der Chargenvariabilität auf. Die Ergebnisse der Entwicklung der Rattenembryonen waren nicht konstant reproduzierbar und somit nicht mit denen des Rattenserums vergleichbar [70].

Bei der Verwendung von Humanserum wurden zum Teil hohe Abnormitätenraten der Embryonen (bis zu 58 %) induziert [71]. Auch ist die Anwendbarkeit von Humanserum als Basis für das Kulturmedium der WEC als standardisierten *In-vitro*-Embryotoxizitätstest limitiert. Zu groß ist der unterschiedliche Lebensstil der Spender, der eine sehr variable Qualität der entsprechenden Humanseren mit sich bringt. Bei Rinderserum ist es möglich die variable Qualität der Chargen durch kontrollierte und vergleichbare Tierhaltungsbedingungen zu eli-

minieren. So wäre die Durchführung von Langzeit- und *Inter*-Laborstudien unter konstanten Bedingungen des Kulturmediums gewährleistet.

Bei der Verwendung von Rattenserum als Kulturmedium wird nur 1/3 des Tiermaterials für die Gewinnung der Embryonen verwendet und der Hauptanteil (2/3) wird für die Herstellung des Rattenserums benötigt. Dieser Tierverbrauch könnte durch den Einsatz von heterologen Serum, wie dem Rinderserum, vermieden werden [3]. Das erste Herstellungsprotokoll für ein Rinderserum, als Alternative, wurde 1985 von Klug et al. etabliert [72]. Unter Berücksichtigung der Erfahrungen mit dem Rattenserum wurden Modifikationen des Herstellungsprotokolls für die Besonderheiten des Rinderserums vorgenommen. Dieses speziell hergestellte Rinderserum, supplementiert mit Methionin und Glukose, stellt eine geeignete Alternative für die WEC dar [3]. Dieses Rinderserum war das einzige, welches für Jahrzehnte kontinuierlich in einem Laboratorium (Klug et al.) genutzt wurde. Über zwei Jahrzehnte embryotoxikologischer Untersuchungen mit Rinderserum in der WEC belegen, dass die Konzentrations-Effekt-Beziehungen vergleichbar mit denen von Rattenserum waren [72-78]. Trotz der Reproduzierbarkeit der Eignung des nach Klug et al. hergestellten Rinderserums für die WEC [79], blieb eine breite Anwendung dieser Alternative zum Rattenserum aus.

An experimentell arbeitenden Institutionen ist die Verfügbarkeit von Ratten weitaus größer als die von Rindern und die Notwendigkeit der schnellen Verarbeitung des Vollblutes (innerhalb von 30 min) begünstigt die Verwendung von Ratten als Spendertiere. Nur solche Rinder kommen als Spendertiere in Frage, die in der Nähe (20 min Transportweg) der weiterverarbeitenden Laboratorien gehalten werden.

Kommerziell erhältliche Rinderseren wurden wiederholt in den Jahren 1966 bis 1995 als alternatives Kulturmedium in der WEC geprüft, sind jedoch immer wieder als ungeeignet bewertet worden [64;68;72;80]. Die Ursache dürfte in den deutlichen Unterschieden der Herstellungsprotokolle der Serumproduzenten im Vergleich zu dem von Klug et al. [72] und in den unterschiedlichen Produktionsmengen und Ausgangsmaterialien begründet sein.

Man unterscheidet beim Rinderserum drei Haupttypen:

1. Fötale Bovines Serum (FBS),
2. Adultes Bovines Serum (ABS) und
3. Donor Bovines Serum (DBS).

Ein weiterer Serumtyp ist das Kälberserum. Es spielt mengenmäßig am Serummarkt eine untergeordnete Rolle und wird oft als Donor Kälber Serum (DCS) mit unter dem Begriff des DBS gezählt.

FBS und ABS werden während des Schlachtprozesses gewonnen. Für die Herstellung des ABS wird das beim Ausbluten anfallende Vollblut von ausgewachsenen Rindern verwendet. FBS kann nur in Regionen mit extensiver Herdenhaltung gewonnen werden, wie z.B. in Nord- und Südamerika, Neuseeland und Australien. Bei den dort üblichen Herdenschlachtun-

gen werden auch regelmäßig trächtige Rinder geschlachtet. Die anfallenden Feten unterschiedlichen Alters können zur FBS Gewinnung verwendet werden [81].

Aus technischen Gründen werden Feten erst ab dem 3. Monat verwendet. Die gewinnbaren Serummengen pro Fetus variieren von 150 ml im Alter von 3 Monaten bis 550 ml kurz vor der Geburt [82]. Die produktionsbedingten sehr unterschiedlichen Zusammensetzungen der Serumpools resultieren in einer besonders hohen Chargenvariabilität des fötalen bovinen Serums [83;84].

DBS und DCS wird von speziell gehaltenen Spendertieren ohne deren Tötung gewonnen. Diese Tiere werden in geografisch weitestgehend isolierten Regionen Australiens oder Neuseelands unter definierten Fütterungsbedingungen in geschlossenen Herden gehalten. Das DBS mit konstanter Qualität ist daher nur in geringeren Mengen verfügbar.

Bei den meisten Untersuchungen über Rinderseren als Kulturmedium in der WEC wurden keine genauen Angaben zum Serumtyp gemacht und bisher lag keine systematische Untersuchung der Eignung der unterschiedlichen bovinen Seren als Kulturmedium der WEC vor.

2.5 Identifizierung der embryotropen Inhaltsstoffe des Rattenserums

Heterologe Seren können durch Supplementierung mit Rattenserum zu einem geeigneten Kulturmedium für die WEC aufgewertet werden [4]. Der notwendige prozentuale Anteil variiert in Abhängigkeit der Spezies zwischen 10 % und 50 %. Beim Serum des Menschen war ein prozentualer Anteil von 10 % ausreichend [29;85;86], beim Serum von Hund und Affe 25 % [87] und beim Kaninchenserum 25 bis 50 % [66;88]. Daraus folgerte man, dass Rattenserum Stoffe beinhaltet, die in heterologen Seren ganz fehlen oder nicht ausreichend vorhanden sind [89]. Zur Identifikation dieser essentiellen Bestandteile wurden vier verschiedene Strategien verfolgt:

1. Charakterisierung der wichtigsten Serumfraktionen,
2. Identifikation der sich verbrauchenden Serumbestandteile mittels vergleichender Proteinanalysen und gezielte Supplementierung von wiederholt verwendetem Kulturmedium,
3. Identifikation niedermolekularer Bestandteile durch gezielte Supplementierung von dialysierten Serum und
4. gezielte Supplementierung von heterologen Seren.

2.5.1 Charakterisierung der wichtigsten Serumfraktionen

Rattenserum wurde durch Ultrazentrifugation in unterschiedliche Fraktionen zerlegt und einzeln bzw. in Kombination in ein Mangelmedium in Form von heterologen Kaninchenserum supplementiert [88]. Man vermutete spezifische Wachstumsfaktoren in der Fraktion von 65 bis 300 kDa, da diese die größte entwicklungsfördernde Wirkung zeigte. Eine weiterführende Untersuchung ergab zwar eine genauere chemische Charakterisierung eines Fraktions-

bestandteils, nur konnte keine Identifikation dieser Substanz erreicht werden [90]. In einer anderen Studie wurde der Fraktion <30 kDa die größte Bedeutung beigemessen [91]. Auch hier blieb eine Identifikation aus. Andere Strategien waren erfolgreicher und konnten die folgenden Serum Embryotrophic Factors (SEF) identifizieren: Citrat [92], Transferrin [93;94], das Apo-A1 der High-Density Lipoproteine und Alpha-1-Inhibitor-3 [94].

2.5.2 Identifikation von sich verbrauchenden Serumbestandteilen

Bei der zweiten Strategie zur Identifizierung der essentiellen Bestandteile des Rattenserums wurden seine Proteinfractionen nach einfacher oder wiederholter Nutzung analysiert. Es wurden vier Serumproteine selektiv in der Kultur von Post-Implantations-Embryonen verbraucht [95;96]. Zwei Fraktionen mit einem Molekulargewicht von 132 000 und 214 000 wurden identifiziert, aber noch nicht weiter charakterisiert. Die anderen beiden Proteine konnten als alpha-2-Makroglobulin und Transferrin charakterisiert werden. In einer weiterführenden Untersuchung eines wiederholt verwendeten Kulturmediums verfolgte man die Hypothese, dass eine Supplementierung von definierten Nährstoffen wieder zu einer besseren Entwicklung der Embryonen führen könnte. Die Supplementierung sollte einen stoffwechselbedingten spezifischen Mangel im Kulturmedium ausgleichen. Dieser Argumentation folgend wurde Transferrin als essentieller Bestandteil bestätigt. Als weitere limitierende Inhaltsstoffe wurden der epidermale Wachstumsfaktor (EGF) und das Insulin identifiziert [97].

2.5.3 Identifikation von niedermolekularen Serumbestandteilen durch gezielte Supplementierung von dialysiertem Serum

Ein weiteres Mangelmedium, in dem man die Bedeutung einzelner Faktoren durch gezielte Supplementierung untersuchen kann, ist dialysiertes Serum. Durch die Dialyse werden niedermolekulare Bestandteile des Serums entfernt und anschließend definiert wieder supplementiert. Mit dieser Strategie wurden Glukose [89], verschiedene Aminosäuren, verschiedene Vitamine, insbesondere Panthothensäure, Folsäure, Riboflavin, Inositol und Niacin [98;99], verschiedene Wachstumsfaktoren, wie Fibroblasten Wachstumsfaktor (fibroblast growth factor - FGF), Plättchen-abgeleiteter Wachstumsfaktor (platelet-derived growth factor - PDGF), Insulin-artiger Wachstumsfaktor-1 (insulin-like growth factor-1 - IGF-1), Epidermaler Wachstumsfaktor (epidermal growth factor - EGF) oder Vaskulär-Endothelialer Wachstumsfaktor (vascular endothelial growth factor - VEGF) [97;100-102] als essentielle Bestandteile des Rattenserums identifiziert.

2.5.4 Gezielte Supplementierung von heterologen Seren

Heterologe Seren wurden ebenfalls als Mangelmedien für die Identifizierung der essentiellen Serumbestandteile verwendet. Mit dieser Untersuchungsstrategie konnten folgenden Substanzen identifiziert werden: Glukose [3;103], Transferrin [93;104] und Hämoglobin [3]. Auch wenn durch die verschiedenen Strategien bereits eine ganze Reihe von SEF identifiziert worden sind, bleibt noch eine unüberschaubare Menge an Bestandteilen des Serums unbekannt. Es erscheint in absehbarer Zeit unwahrscheinlich ein Serum-freies Kulturmedium für die WEC zu etablieren [27]. Die 2003 zu diesem Thema publizierte Arbeit von Moore-Scott et al. muss kritisch betrachtet werden [105]. Die dort beschriebene Kultur ermöglichte keine wesentliche Entwicklung, sondern mehr ein Überleben der kultivierten Embryonen. Das beschriebene Kulturmedium entspricht im Wesentlichen einem mit verschiedenen Basismedien stark verdünntem Rattenserum (75-80 %), das schon mehr als 30 Jahren zuvor beschrieben wurde [30;106]. Diese Protokolle wurden bisher in keinen entwicklungsbiologischen oder entwicklungstoxikologischen Studien angewendet. Die Ergebnisse von Moore-Scott et al. sind unter Verwendung aller publizierten Angaben des Protokolls nicht reproduzierbar (Flick, unpublizierte Daten).

2.6 Validierung der WEC

Mitte der achtziger Jahre war die Kulturtechnik von ganzen Rattenembryonen so weit entwickelt, dass man begann, die WEC als *In-vitro*-Embryotoxizitätstest in *Intra*-Laborstudien auf ihr Potential und ihre Limitierungen zu untersuchen. Es wurden die Effekte von Testsubstanzen unterschiedlicher chemischer Klassen und bei einzelnen Testsubstanzen die Effekte ihrer Derivate in der WEC bestimmt und mit den Beobachtungen entsprechender *In-vivo*-Studien verglichen. Die verschiedenen chemischen Substanzen zeigten spezifische embryotoxische Effekte in der WEC, die gut mit den Effekten *in vivo* zu vergleichen waren [107-109]. Auch ihre Derivate konnte man anhand der induzierten Effekte in der WEC - entsprechend ihrer embryotoxischen Potentiale - *in vivo* unterscheiden [76;110;111].

In den neunziger Jahren wurden anhand von *Inter*-Laborstudien die Robustheit und Reproduzierbarkeit der WEC demonstriert. Der Einfluss von variierenden Kulturbedingungen wurde sowohl prospektiv [29] als auch retrospektiv [36;112] untersucht. Es bestätigte sich der Einfluss des Entwicklungsstadiums am Anfang der Kultur und der der Kulturzeit auf die Variabilität der Ergebnisse. Im Gegensatz dazu wurde in den prospektiven Untersuchungen des Kulturmediums der WEC diesem Parameter nur ein geringer Einfluss auf das Ergebnis der WEC zugesprochen. Leider wurde bei dieser Studie nur der Einfluss bei einer Kulturzeit von 24 Stunden untersucht, in den meisten Folgestudien aber eine Kulturdauer von 48 Stunden verwendet. Auch erwähnten die Autoren in ihrer Diskussion die nicht gesicherte Übertragbarkeit des Ergebnisses auf eine Kulturzeit von 48 Stunden [29].

Mitte der neunziger Jahre schlussfolgerte man, dass die WEC eine geeignete Screening-Methode für die Embryotoxizität sei [36;112].

Keine dieser Studien erfüllte die international anerkannten Kriterien der Validierung eines *In-vitro*-Testsystems. Das allgemeine Konzept dazu wurde in Rahmen von zwei ECVAM-Workshops erarbeitet [113].

Im ersten Workshop wurden 1990 in Amden (Schweiz) die Prinzipien der experimentellen Validierung eines Testsystems in der Toxikologie definiert [114]. Es sollten die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, die Relevanz für den eingesetzten Zweck, die Stärken aber auch die Limitierungen eines Testsystems festgestellt werden. Um dies zu erreichen, wurden folgende Teilschritte festgelegt:

1. Entwicklung und Standardisierung eines Testsystems,
2. Durchführung einer Ringstudie zwecks Reproduzierbarkeit,
3. Aufbau einer Datenbasis,
4. Evaluierung aller Rohdaten durch eine unabhängige Institution und
5. Die Akzeptierung durch die Zulassungsbehörden [113;114].

Im zweiten Workshop 1994 wurden weitere Details der Validierungsprozedur definiert [115]. Die Validierungsstudien sind als Blind-Studien durchzuführen und eine Prävalidierungsstudie soll zur Überprüfung der SOP des Testsystems erfolgen [116]. Darüber hinaus wurde festgelegt, dass jedes *In-vitro*-Testsystem mit einem Prädiktionsmodell kombiniert werden muss. Damit soll eine mögliche Reaktion von Mensch und Tier nach einer Exposition mit Chemikalien oder Arzneimitteln anhand der *In-vitro*-Daten vorhersagbar sein [113]. Diese Validierungsprozedur ist auf europäischer Ebene seit 1995 vom European Center for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) [115] und weltweit seit 1996 von der Organization for Economic, Cooperation and Development (OECD) [117] und vom US National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS) [118] angenommen. Entsprechend dieser Richtlinien wurde der Whole Embryo Culture Test im Jahr 1997 prävalidiert und in den Jahren 1998 bis 2000 anhand von 20 Testsubstanzen validiert [5]. Bemerkenswerterweise wurde die WEC als sehr robust eingestuft. Sie tolerierte verschiedene Kulturapparaturen, unterschiedliche Chargen an Rattenserum und die Verwendung von Rattenembryonen unterschiedlicher Zuchtlinien, ohne die Prädiktivität zu verfälschen [7]. Das validierte Prädiktionsmodell beinhaltet nur Endpunkte der Differenzierung und keine Wachstumsparameter der Embryonen [6]. Nach persönlicher Auskunft waren die Ergebnisse aller Wachstumsparameter in den *Inter-Labor*studien nicht reproduzierbar und fielen somit bei der Entwicklung des Prädiktionsmodells aus.

Die Parameter des Wachstums sind die Scheitel-Steiß-Länge und der Proteingehalt der Embryonen [55], wobei der Proteingehalt als einfacher und präziser Auswertungsparameter gilt [32;41;72]. Eine Wachstumshemmung von Feten gilt *in vivo* als spezifischer Befund, dem große Beachtung beigemessen wird [119]. Die Wachstumsparameter der

WEC galten bisher, für die Einschätzung eines embryotoxischen Potentials, als integraler Bestandteil der Auswertung [21]. Das Prädiktionsmodell des validierten WEC Tests konnte auf einen Wachstumsparameter verzichten und trotzdem eine gute Prädiktion der Embryotoxizitätsklassen erreichen. Es wurden zu 100 % die stark embryotoxischen, zu 76 % die schwach embryotoxischen und zu 70 % die nicht embryotoxischen Testsubstanzen korrekt klassifiziert [7]. Das wirft die Frage auf, ob eine Integration der Endpunkte des Embryonenwachstums in das Prädiktionsmodell eine noch höhere Vorhersehbarkeit insbesondere für die schwach embryotoxischen Testsubstanzen ermöglichen könnte.

2.7 Referenzsubstanzen in der Embryotoxikologie

Unter Referenzsubstanzen in der Toxikologie versteht man Substanzen mit einem bekannten toxischen Potential, deren Manifestationen nach Exposition von Mensch und Tier *in vivo* oder von Zielstrukturen *in vitro* genau bekannt sind. Da sich Untersuchungen beim Menschen verbieten, wenn der Verdacht eines teratogenen Potentials aus Tierversuchen vorliegt, gibt es in der Teratologie nur eine limitierte Anzahl von Substanzen, für welche die vollständigen Daten aller drei Expositionsarten vorliegen. Referenzsubstanzen werden für die Etablierung von neuen *In-vitro*-Testsystemen bzw. nach Modifikationen derselben herangezogen, um die Relevanz und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu prüfen.

Ein Überblick aller teratogenen Substanzen wird in dem „Catalog of Teratogenic Agents“ von Shepard [120] gegeben. Für die Auswahl von Referenzsubstanzen in Bezug auf *In-vitro*-Embryotoxizitätstests wurden bereits spezielle Zusammenstellungen von Substanzen erarbeitet: 1. Smith et al. [121], 2. Schmid et al. [107], 3. Brown et al. [122] und Flick et al. [123]. Anhand dieser Listen wurden folgende Substanzen als Referenzsubstanzen für die Überprüfung der in dieser Studie neu etablierten Kulturmedien für die WEC ausgewählt:

Tabelle 1: Referenzsubstanzen für die *Intra*-Laborstudie

Substanz	Embryotoxisches Potential	Literatur
Penicillin G	nicht	[7;124]
Valproinsäure	schwach	[76;125;126]
Ethanol	schwach	[127-129]
<i>All-trans</i> Retinsäure	stark	[130-132]
5-Fluorouracil	stark	[133;134]

2.8 Bedarf für einen *In-vitro*-Embryotoxizitätstest

2.8.1 Grundsätzlicher Bedarf für einen In-vitro-Embryotoxizitätstest

Es wurden in Deutschland laut Tierschutzbericht von 2005 im Jahr 2003 insgesamt 2.112.341 Wirbeltiere als Versuchstiere eingesetzt [135]. Davon wurden 1.008.963 Versuchstiere für Forschung und Entwicklung bzw. Herstellung und Qualitätskontrollen von medizinischen Produkten oder Geräten verwendet. In der Toxikologie wurden 178.221 Tiere eingesetzt. Davon entfielen 15.716 Versuchstiere auf Reproduktions- und Entwicklungstoxizitätsstudien. Der Großteil der dabei eingesetzten Tiere waren Ratten mit 69,2 %, gefolgt von Kaninchen (14,6 %), Fischen (8,5 %), Altweltaffen (2,3 %), Wachteln (2,2 %) und Mäusen (2,1 %). Diese Art von Versuchen ist leicht bis mittelschwer belastend, in einigen Fällen sogar als stark belastend für die eingesetzten Versuchstiere einzustufen [136;137].

Die Verwendung von Alternativmethoden hätte nach gegenwärtiger Schätzung ein durchaus beträchtliches Einsparpotential. Ein *In-vitro*-Modell allein wird die Tierversuche nicht ersetzen können. Dazu ist eine ganze Batterie dieser Modelle nötig, die in gestuften Prüfplänen zur Abschätzung des toxischen Potentials einer Substanz herangezogen werden können. Hierbei werden einfache Testsysteme mit einer hohen Durchsatzmöglichkeit, wie der EST, als erstes eine Anwendung finden. Komplexe Testsysteme mit höherem Aufwand, wie die WEC, werden später nachgeschaltet [2;138].

Bei der Entwicklung von neuen Wirkstoffen ist man bestrebt, neue Substanzen nicht nur nach ihrer gewünschten Wirkung, sondern auch frühzeitig nach zum Teil schwach ausgeprägten unerwünschten Nebenwirkungen zu selektionieren. Der Einsatz von *In-vitro*-Methoden im frühen Stadium der Wirkstoffentwicklung würde dazu führen können, die Entwicklung einer so als potentiell stark embryotoxisch eingestuften Substanz rechtzeitig stoppen zu können. Diese Substanz gelänge somit gar nicht erst in den belastenden Tierversuch. Nur viel versprechende Substanzen, die *in vitro* als nicht oder nur schwach embryotoxisch klassifiziert werden, müssten die vorgeschriebenen Tierversuche durchlaufen. Eine Reduktion der Tierversuche und eine Linderung des Leidens der Tiere durch einen *In-vitro*-Embryotoxizitätstest wäre ganz im Sinne des "3R"-Konzeptes (Reduce/Refine/Replace) nach Russel und Burch [1].

2.8.2 Aktueller Bedarf für einen In-vitro-Embryotoxizitätstest

Seit 1930 stieg die weltweite Produktion an Chemikalien von 1 Million Tonnen auf über 400 Millionen Tonnen pro Jahr [139]. In der bisher einzigen Erfassung aller Chemikalien auf dem europäischen Markt aus dem Jahr 1981 wurden 100 106 Substanzen gelistet. Diese werden als „Alt-Stoffe“ bezeichnet. Die seit 1981 dazugekommenen, ungefähr 4 000 Substanzen werden entsprechend „Neu-Stoffe“ genannt. Für die Alt-Stoffe, die anteilmäßig 99 % aller Chemikalien am Markt darstellen, sind die verfügbaren Informationen bezüglich Eigenschaf-

ten, Anwendungen und Risiken lückenhaft [139]. Um ein Risiko für Mensch und Umwelt durch Neu-Stoffe zu verhindern, müssen diese auf verschiedene mögliche Nebenwirkungen untersucht werden, bevor sie mit behördlicher Genehmigung in der EU vermarktet werden dürfen [140].

1998 einigten sich die Umweltminister der EU, die Chemikalienpolitik der EU zu überprüfen (Chester, UK, 1998). Die mit dieser Aufgabe betraute Europäische Kommission reformierte die Chemikalienpolitik und legte im EU-Weißbuch "Strategie für eine zukünftige Chemikalienpolitik" [141] die Absichten und Richtungen der Reformen fest. Im Jahr 2003 stellte die Europäische Kommission dann einen Entwurf der Verordnung für die Einführung eines EU-einheitlichen Registrierungs-, Bewertungs- und Zulassungssystems für Chemikalien vor: REACH - Registration, Evaluation and Authorization of Chemicals. Die Kernpunkte dieser Verordnung sind:

- Stoffe, die ein Hersteller bzw. Importeur in einem Jahr in einer Menge von mehr als 1 Tonne produziert bzw. in die EU einführt, müssen registriert werden und mit Informationen über den jeweiligen Stoff versehen sein (dabei handelt es sich um ca. 30 000 Stoffe),
- Datenanforderungen orientieren sich am Neustoffverfahren,
- besonders gefährliche Stoffe (Mutagene, Kanzerogene oder Stoffe, welche die Fruchtbarkeit mindern) sollen vom Markt genommen werden,
- die Industrie wird stärker in die Verantwortung genommen, die Behörden konzentrieren sich auf hochtonnagige Stoffe und Besorgnisstoffe,
- es wird eine neue EU Behörde in Helsinki für die Registrierung der Chemikalien geschaffen.

Über zwei Jahre wurde dieser Entwurf kontrovers diskutiert und durch eine Reihe von Ausnahmen und Erleichterungen für die Industrie modifiziert. Im Dezember 2005 hat das Europäische Parlament das Chemikalien-Programm REACH in der ersten Lesung gebilligt. Die zweite Lesung wird in der zweiten Jahreshälfte 2006 erwartet, so dass ein Inkrafttreten von REACH im Jahr 2007 realistisch erscheint.

Die künftigen EU rechtlichen Vorschriften werden damit eine umfassende Prüfung von Altstoffen bedingen, um eine verbesserte Datenlage für die Risikoabschätzung zu erreichen. Die allgemeinen Prüfanforderungen des Verordnungsentwurfs sehen einen erheblichen Umfang an Wirbeltierversuchen für die Untersuchung der 30 000 Altstoffe vor, weil nur wenige Alternativmethoden bisher akzeptiert sind. Um einen unverantwortlichen Anstieg der Tierversuche in den nächsten Jahren zu vermeiden, empfiehlt das EU Weißbuch gleichzeitig, wo immer es möglich ist *In-vitro*-Methoden zur Durchführung sicherheitstoxikologischer Prüfungen einzusetzen. Entsprechend regt auch das Council "Environment" der EU an, Altstoffe zukünftig mittels *In-vitro*-Methoden zu testen [142].

Die gesetzlich vorgeschriebenen reproduktionstoxikologischen *In-vivo*-Untersuchungen sind zum einen belastend für die Tiere, zum anderen sehr kostenintensiv und zeitaufwendig. In Abhängigkeit von der Spezies dauern solche Versuche üblicherweise mehrere Wochen bis zu mehreren Monaten (*OECD Test Guideline [TG] 421; OECD TG 422; OECD TG 414; OECD TG 415; OECD TG 416*).

In der Reproduktionstoxikologie ist bisher kein *In-vitro*-Testsystem akzeptiert und zugelassen worden. Um die Aufnahme in den Methodenanhang der Verordnung zu erreichen, müssen *In-vitro*-Systeme optimiert, standardisiert und validiert werden. Im Rahmen einer erfolgreich abgeschlossenen Validierungsstudie bewies der WEC *In-vitro*-Test bereits seine Relevanz, Robustheit und Reproduzierbarkeit [7]. Trotzdem entspricht er noch nicht den Anforderungen der Zulassungsbehörden und das entsprechende Prüfprotokoll bedarf noch einer Weiterentwicklung. Die vorliegende Studie zur Entwicklung und Etablierung eines Kulturmediums für die WEC, welches in großen Chargen verfügbar sein sollte, kann einen wertvollen Beitrag dazu leisten, die WEC zu einem Routineverfahren zu etablieren.