

Zytotoxizitätstests statt Tierversuche!

Oder wie Zellkulturen Tierleid verhindern

Von Friedrich Rosian

Im Jahr 2022 wurden allein in Österreich 211.000 Tierversuche durchgeführt (vgl. Statista, 2024). Schon lange zählen Tierversuche zur gängigen Praxis, um Medikamente und Wirkstoffe zu testen und sind teilweise sogar vorgeschrieben. So lag 2022 bei den getöteten Versuchstieren in Deutschland der Anteil an durch vorgeschriebene Medikamententests getöteten Tieren bei rund 16%. Insgesamt wurden hierbei 272.452 Tiere getötet (vgl. Ärzte gegen Tierversuche e.V., 2023) In den letzten Jahrzehnten fanden Wissenschaftler jedoch ethisch leichter vertretbare Methoden. Im Folgenden soll der Begriff **Zytotoxizität** geklärt werden und eine Möglichkeit der Medikamententestung ohne Tierleid beschrieben werden.. Weiters soll dargestellt werden, inwieweit derartige Tests mit Tierversuchen vergleichbar sind und ob diese *in-vitro*-Versuche (Laborversuche) gar eine ebenbürtige Alternative für *in vivo* (am lebenden Objekt) darstellen.

Warum (keine) Tierversuche?

Heute sind Tierversuche eine Standardmethode, um neue Behandlungsmittel zu testen, bevor sie bei Menschen angewendet werden. Der Vorteil ist, dass bereits viele verschiedene Tierstämme für unterschiedliche Anwendungszwecke gezüchtet wurden und die meisten Versuchstiere wesentlich unempfindlicher gegenüber ihrer Umgebung sind als nackte Zellen. Weiters werden keine speziellen Brutschränke und extra abgedunkelte Behälter benötigt. Zudem kann man an Zellen keine Verhaltensstudien durchführen.

Leider wird bei Tierversuchen oft vergessen, dass auch tierische Lebewesen Schmerzen empfinden können. Einst beschrieb Descartes Tiere als von sich aus lautgebende Maschinen mit Seelen. Heute, in unserer modernen Welt, sehen viele „den Menschen als neuronal etwas weiter entwickeltes Tier“ (Rambeck, 1990, S. 16).

Auch wenn viele glauben, dass Tierversuche elementare Bestandteile unserer Forschung darstellen und nur mit ihnen medizinisches Wissen gesammelt werden kann, so gibt es genügend Belege, welche von Forschung ohne Tierexperimente zeugen (Hippokrates' Medizin auf Basis von Hygiene und Ernährung, Entdeckung des Blutkreislauf von William Harvey, Erfindung des Mikroskops durch Antony van Leeuwenhoek, Behandlungsmöglichkeit mit Digitalis gegen Herzerkrankungen und Jod gegen Kropf von William Withering, Kuhpockeninjektion als Impfung von Edward Jenner,...). Rambeck notiert: "Unser neuzeitliches medizinisches Wissen beruht zu einem erheblichen Teil gar nicht auf Tierversuchen oder wurde erst nachträglich an Tieren bestätigt" (ebda., S.26). Überdies können Tierversuche sogar den Fortschritt an der Forschung verzögern (z.B. die Entwicklung von antiseptischen/ aseptischen Bedingungen durch die unterschiedliche Widerstandsfähigkeit von Tieren) (Rambeck, 1990, S.16,21,23).

Aus ethischer Sicht kommt hinzu, dass Narkose- und Schmerzmittel zusätzliche Kosten für ohnehin teure Forschungsprojekte bedeuten würden und früher nicht daran gedacht wurde, oder es für unwichtig

Was war nochmal...?

Ein **Antigen** ist ein „artfremder Eiweißstoff, der im Körper die Bildung von Antikörpern gegen sich selbst bewirkt“. (Duden, 2023)

Ein **Antikörper** ist ein „im Blutserum als Reaktion auf das Eindringen von Antigenen gebildeter Schutzstoff“ (Duden, 2023)

Die **Apoptose** ist eine Form des programmierten Zelltodes, bei welchem „[...]der Zellkern aufgelöst, die Zellmorphologie verändert und die DNA durch Nucleasen an den Nucleosomen zerkleinert [...]“ (Murphy, Travers, & Walport, 2009, S. 459 f.) wird.

Bei der **Autophagie** werden "gealterte" oder anormale Proteine und Organellen abgebaut“ (Murphy, Travers, & Walport, 2009, S. 459 f.).

Als **Granula** werden mikroskopische Körnchen in Zellen bezeichnet (vgl. Pschyrembel, 1986, S. 616).

In-vitro: im Labor (vs. *in-vivo*: im Organismus)

Der **LD-50-Wert** beschreibt die letale, also tödliche, Dosis bei der 50% der Individuen sterben.

Natürliche Killerzellen zählen zu den weißen Blutkörperchen.

Eine **Proliferation** ist eine „Wucherung von Gewebe durch Vermehrung von Zellen“. (Duden, 2023)

Solubilisierung beschreibt die Schritte, um einen Stoff „solubilis (lat): löslich“ (Pschyrembel, 1986, S. 1561) zu machen. Bei Zellen muss man beispielsweise die Zellklümpchen voneinander trennen, bevor man sie verwenden kann.

T-Zellen/ T-Lymphozyten sind wie nat. Killerzellen eine Untergruppe der weißen Blutkörperchen und werden aus den im Knochenmark vorhandenen lymphatischen Vorläuferzellen gebildet (Vollmar, Zündorf, & Dingermann, 2013, S. 4).

Eine **Zellbank** ist eine Institution, welche sich auf das Züchten von Zellen für Forschungszwecke spezialisiert hat.

Zelldifferentiation beschreibt den Prozess der Zellspezialisierung.

Ein **Zwitterion** enthält sowohl positiv- als auch negativ-geladene Gruppen. (Duden, 2023)

Zytotoxizität beschreibt die „Eigenschaft, als Zellgift zu wirken“ (Duden, 2023). Entweder wird hierbei die Genese, also Zellteilung, die Form oder die Funktion der Zelle schädlich beeinflusst (vgl. Pschyrembel, 1986, S. 576 u. 1864). Durch die Bestimmung der Zellviabilität, also der Anzahl lebendiger Zellen, kann gemessen werden, wie toxisch eine Substanz ist.

empfunden wurde, dass Tiere auch ein Schmerzempfinden haben. So wurde und wird bei Tierversuchen oft darauf verzichtet (vgl. ebda., S. 28).

Etwa seit dem Jahr 1990 gibt es Studien, welche die Ergebnisse von Injektionen in Ratten mit den gleichen Substanzen in Zellkulturen vergleichen. Da diese sehr ähnlich bis annähernd ident sind und sich der *LD50*-Wert weitestgehend deckt, kann man sagen, dass es eine recht gute Übereinstimmung zwischen dem Tierversuch und dem Zellversuch gibt (vgl. Selmitsch, 2004, S.4). Mehrzellige Lebewesen sind komplexer und es ist nicht hinreichend bekannt, inwieweit unterschiedliche Zellarten miteinander reagieren. Darum sind bei diesen Lebewesen Zelldifferenzierungsstudien schwierig durchzuführen (vgl. ebda.).

Unterschiedliche Arten von Zytotoxizität

Zytotoxizität ist nicht gleich Zytotoxizität. Grundsätzlich können drei verschiedene Formen unterschieden werden.

Bei der *antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität* können sich *natürliche Killerzellen* an beispielsweise durch Viren infizierte Zellen mit Oberflächenantigenen binden. Hierdurch werden die als Zytotoxin wirkenden Inhaltsstoffe der *Killerzellen-Granula* freigesetzt und die infizierte Zelle wird abgebaut (vgl. Vollmar, Zündorf, & Dingermann, 2013, S. 68 f.).

Können Viren nicht vor dem Eindringen in die Zelle durch *Antikörper* vernichtet werden, so muss die infizierte Zelle zerstört, oder zumindest verändert werden. Hierfür wird die zytotoxische Wirkung der *CD8-T-Zellen* benötigt. Diese starten den programmierten Zelltod, wodurch infizierte Zellen zerstört werden können, ohne gesunde Zellen zu beschädigen (Murphy, Travers, & Walport, 2009, S. 459 f.).

Sogenannte Zytotoxine können ebenfalls einen zytotoxischen Effekt auslösen. Zu diesen zählen unter anderem Bakterien, Viren, ionisierende Strahlung und Medikamente (Pschyrembel, 1986, S. 1864), welche aus diesem Grund mittels Zytotoxizitätstests analysiert werden können

Zellkulturen – Woher nehmen?

Prinzipiell gibt es 3 Möglichkeiten, Zellen für diese Tests zu erwerben:

1. Menschliches und tierisches Material aus Operationen, wie beispielsweise Krebszellen, können zwar verwendet werden, jedoch passiert es häufig, dass diese Zellen mutieren. Da mutierte Zellen anders reagieren könnten als die ursprünglichen Zellen, ist es hierbei schwer nachzuweisen, welcher Effekt durch das Zytotoxin und welcher durch die Mutation zustande gekommen ist.
2. Das gleiche Problem tritt auf, wenn aus Zellen, welche direkt aus Gewebeproben entnommen und in einer Zellkultur weitergezüchtet werden, Zellen isoliert werden.
3. Offizielle *Zellbanken* züchten und verändern Zellen, damit sie sich länger teilen können und nicht mutieren. Diese Zelllinien sind dann immortalisiert, was bedeutet, dass sie sich beliebig oft teilen können. Dies wird durch Ausschalten der *Apoptose* erreicht. Dadurch gewinnen die Zellen an Robustheit und Langlebigkeit. Sie sind leichter verfügbar und zeigen ein gleichmäßiges Wachstum. Viele Zelllinien sind zertifiziert und somit auf Qualität überprüft und sind deswegen auch bestens für Zellversuche geeignet.

MTS-Test

Im Folgenden sollen das Funktionsprinzip und die Vorteile eines etablierten *Zytotoxizitätstest* beschrieben werden. MTS ist die Kurzbezeichnung für 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl) - 2H-tetrazolium. Im Test wird es den Zellen mit *Zwitterionen* sowie dem elektronenbindenden Farbstoff Phenazinmethosulfat beigelegt. Dabei wandeln lebende Zellen das MTS in violettrotes Formazan um (Abbildung 1). Ein großer Vorteil dieser Methode ist, dass die Detektion direkt ohne umständliche weitere Schritte am Photometer bei 490nm gemessen werden kann. Dieser Test ist einfach zu benutzen. Anders als bei anderen Tests fällt das Waschen und Ernten von Zellen weg und das *Solubilisieren* entfällt. Bei der Sicherheit hat dieser Test den Vorteil, dass er nicht radioaktiv ist und keine leichtflüchtigen organischen Lösungsmittel verwendet werden. Auch ist die stabile, gefrorene und sterile Lösung lange haltbar (vgl. Promega Corporation, 2012, S. 1-2).

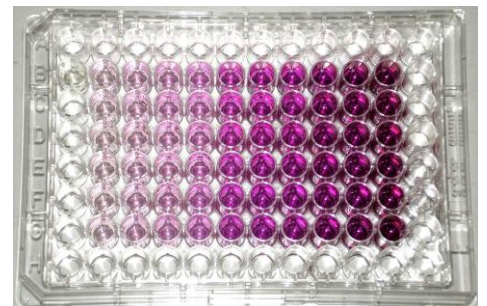


Abbildung 1 Microtiter-Platte By Shinryuu, Public Domain, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=12096427> [02.12.2023]

Zellversuche, ja bitte?!

Zellkulturen sind universell einsetzbar. Im Forschungsbereich Genetik können sie für karyologische (den Zellkern betreffende) Untersuchungen, unter anderem zur Erkennung der Trisomie 21 (=Down-Syndrom), der somatischen Zell-Genetik oder auch zum Erforschen von Zellstoffwechselkrankheiten verwendet werden.

Da die Veränderungen eines Zelltyps wesentlich einfacher zu überprüfen sind als eine Häufung verschiedener Typen in einem Organismus, wie beispielsweise in einer Maus, sind Zellkulturen weiters praktisch für **Zelldifferenzierungsuntersuchungen**. Andere Anwendungsgebiete sind die Immunologie, die **Zellproliferation** und Wachstumsfaktoren, die Virologie und die Zelltransformation.

Auch wenn von Zelltests nicht unmittelbar auf die Vorgänge in komplexen Organismen geschlossen werden kann, so lassen sich dennoch Grundaussagen beim Testen und Vergleichen verschiedener Zelltypen treffen (vgl. Selmitsch, 2004, S. 4-6).

Die Übertragbarkeit von Tierversuchen auf den Menschen ist nicht immer gegeben. Bei Mäusen beispielsweise haben Forscher entdeckt, dass ein signifikanter Unterschied der Reaktion auf Entzündungen zum Menschen besteht. So lieferte die jahrzehntelange Grundlagenforschung mit Mäusen bei Menschenstudien andere Ergebnisse (vgl. Spiegel Online, 2013). Beispielsweise analysierten Forscher vom Bostoner Massachusetts General Hospital Blutproben von Menschen und Mäusen mit ähnlichen Verletzungen auf die Genaktivität im Erbgut. (ebda.).

Das Ergebnis war, dass sich die Veränderungen im Vergleich zu gesunden Individuen kaum ähnelten und auch bei unterschiedlichen Mausstämmen unterschiedliche Aktivität festgestellt wurde. Das Forscherteam weist darauf hin: *„Man muss neue Ansätze erforschen, um die Möglichkeiten zum Erforschen menschlicher Erkrankungen zu verbessern.“* (ebda.)

Tiere sind dem Menschen zwar in vielen Eigenschaften ähnlich, jedoch kann vom Tier nicht direkt auf den Menschen geschlossen werden. Ein entscheidender Nachteil der Zellkulturen ist, dass diese wesentlich empfindlicher gegenüber verschiedensten Parametern sind als Tiere. Für Zellen darf es nicht zu kalt sein, sie benötigen einen optimalen pH-Wert. Auch fehlen Zellkulturen Schutzbarrieren wie beispielsweise der Säureschutzmantel, oder ein Immunsystem. Selbst Licht und Nanopartikel wie Staub können Einfluss auf das Wachstum und somit das Ergebnis von derartigen Tests nehmen.

Zellen sind viel empfindlicher als ein Mensch mit einem vollständigen Immunsystem, bieten jedoch den Vorteil, dass einzelne Parameter sehr gut kontrolliert werden können und sie leichter zu beobachten sind. **Zytotoxizitätstests** können einen Rahmen bieten, in welcher Konzentration eine Substanz eine Wirkung zeigt. So müssen keine großen Tierversuchsreihen gestartet werden. Durch sie können Grundaussagen getroffen werden. Da die Ergebnisse jedoch nur eingeschränkt übertragbar sind, werden jedoch immer noch einige wenige nachführende Tests benötigt, um sicher zu stellen, dass ein Medikament in der richtigen Dosis verwendet wird und für den Menschen nicht schädlich ist. Es ist davon auszugehen, dass derartige Tests auch in der Zukunft einen hohen Stellenwert haben werden und dieser Bereich einen noch größeren Stellenwert in der Forschung erlangen wird.

Literaturangabe

- Ärzte gegen Tierversuche e.V. (2023). Tierversuchsstatistik. <https://www.aerzte-gegen-tierversuche.de/de/wissen/tierversuche/statistiken/tierversuchsstatistik> [05.03.2023]
- Duden (2023). Wörterbuch. <http://www.duden.de> [31.10.2023]
- Murphy, Kenneth, Travers, Paul, & Walport, Mark (2009). Janeway Immunologie (7. Ausg.) Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg.
- Promega Corporation (2012). CellTiter 96 Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay Technical Bulletin #TB169. https://at.promega.com/products/cell-health-assays/cell-viability-and-cytotoxicity-assays/celltiter-96-aqueous-non-radioactive-cell-proliferation-assay-mts_/?catNum=G5421#protocols [31.10.2023]
- Pschyrembel, Willibald (Hrsg.). (1986). Pschyrembel Klinisches Wörterbuch (255. Ausg.). Berlin: Walter de Gruyter & Co.
- Rambeck, Bernhard (1990). Mythos Tierversuch. Frankfurt: Zweitausendeins.
- Selmitsch, Thomas (2004). Der MTT- und BrdU-Test in der Zellkultur. Graz.
- Statista (2024). Anzahl der Tierversuche in Österreich von 2012 bis 2022 . <https://de.statista.com/statistik/daten/studie/880957/umfrage/tierversuche-in-oesterreich/#:~:text=Im%20Jahr%202022%20wurden%20in,ihre%20Zahl%20gegen%C3%BCber%20dem%20Vorjahr.> [05.03.2024]
- Spiegel Online (2013). <http://www.spiegel.de/wissenschaft/medizin/medizinische-forschung-experten-zweifeln-an-maus-studien-a-882875.html> [31.10.2023]
- Vollmar, Angelika, Zündorf, Ilse, & Dingermann, Theodor (2013). Immunologie. Grundlagen und Wirkstoffe. (2. Ausg.). Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Microtiter-Platte By Shinryuu, Public Domain, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=12096427> [02.12.2023]

Weiterführende Literatur:

- Springfeld, Uwe (2023). SWR2 Wissen: Spezial – Das Tier und Wir (3/10). <https://www.swr.de/swr2/wissen/laboraffen-und-versuchskaninchen-102.html> [11.03.2024]
- Doke SK, Dhawale SC (2015). Alternatives to animal testing: A review. Saudi Pharm J. 2015 Jul;23(3):223-9. doi: 10.1016/j.jsps.2013.11.002. Epub 2013 Nov 18. PMID: 26106269; PMCID: PMC4475840.
- Balls M, Bailey J, Combes RD (2019). How viable are alternatives to animal testing in determining the toxicities of therapeutic drugs? Expert Opin Drug Metab Toxicol. 2019 Dec;15(12):985-987. doi: 10.1080/17425255.2019.1694662. Epub 2019 Nov 21. PMID: 31735089.
- Busquet F, Hartung T, Pallocca G, Rovida C, Leist M (2020). Harnessing the power of novel animal-free test methods for the development of COVID-19 drugs and vaccines. Arch Toxicol. 2020 Jun;94(6):2263-2272. doi: 10.1007/s00204-020-02787-2. Epub 2020 May 23. PMID: 32447523; PMCID: PMC7245508.