

# Replacement des Jahres 2018



Foto: iStock/anyaivanova

## Herzgiftigkeitstests auf dem Chip

# Inhalt

<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>3</b>
Einführung .....	4
Warum das Herz? .....	4
<b>1. Rechtliche Grundlagen</b> .....	<b>5</b>
Arzneimittelentwicklung und -prüfung .....	5
Sicherheitspharmakologische Tests auf Herzgiftigkeit .....	6
Was schreibt die ICH Richtlinie S7B vor? .....	7
Chemikalien .....	7
<b>2. Aufbau und Physiologie des Herzens</b> .....	<b>7</b>
Herzrhythmusstörungen .....	10
<b>3. Welche Tiere werden allgemein eingesetzt und wie viele?</b> .....	<b>11</b>
Arzneimittel .....	11
Chemikalien .....	12
Stand der Dinge in Europa im Bereich der Kosmetiktestung .....	12
<b>4. Wie wird in der Sicherheitspharmakologie auf Herzgiftigkeit untersucht?</b> .....	<b>13</b>
In-vivo-Versuche .....	13
Ex-vivo-Versuche .....	14
In-vivo-Alternative Zebrafisch hat sich nicht durchgesetzt .....	15
Messung der Repolarisation der Herzkammern in-vitro .....	15
Einzelzellsysteme.....	16
a) Heterologe Expressionssysteme .....	16
b) Patch clamp .....	16
<b>5. Der hERG Assay</b> .....	<b>17</b>
Kritik: falsche Ergebnisse, wenn nur hERG gemessen wird .....	18
Multizelluläre Systeme.....	18
Herzzellen vom Tier haben Nachteile .....	19
<b>6. Aktivitäten der Regulationsbehörden der letzten Jahre</b> .....	<b>19</b>
Trotz neuer Konzepte: in-vitro wird mit Tierverbrauch und Tierversuchen kombiniert .....	20
<b>7. Innovative Zellkultursysteme zur genauen Messung von Funktionen in Herzzellen oder -geweben</b> .....	<b>20</b>
Messplattformen für heterologe Systeme, Herzmuskelzellen und Zellsysteme .....	21
Microelectrode-Arrays (MEAs) .....	21
xCELLigence-System .....	22
Mikrokavitäts-Chips .....	23
Cantilever-Chips .....	23
CellOPTIQ® .....	24
Zusätzliche Biomarkermessungen .....	24
In-silico-Methoden .....	24
QSAR-Modelle .....	25
Ausblick .....	25
<b>Literatur</b> .....	<b>26</b>
<b>Anhang</b> .....	<b>29</b>



Abb. 1: Zeitgemäße Forschung mit Organchips.

Foto: TissUse GmbH, Berlin.

# Replacement des Jahres 2018

## Zusammenfassung

Mit dieser Broschüre präsentieren wir die erste Ausgabe unserer Reihe „Replacement des Jahres“. Es beleuchtet die Anwendungspraxis eines tierversuchsfreien Verfahrens, welches in der Regel nicht einen gesamten Tierversuch ersetzt, sondern zur Untersuchung von Teilfragen verwendet wird.

Behördlich vorgeschriebene Tests, aber auch Fragen aus der Grundlagenforschung oder der translationalen/angewandten Forschung werden heutzutage meist durch eine Kombination von tierversuchsfreien Methoden und Tierexperimenten durchgeführt. Die Verwendung von Tieren im Versuch erfolgt mit der Begründung, dass das Leistungsspektrum der vorhandenen tierversuchsfreien Verfahren eingeschränkt ist. Mit dem „Replacement des Jahres“ zeigen wir anhand von Fallbeispielen, dass das Leistungsspektrum der tierversuchsfreien Methode(n) kontinuierlich und so schnell wie möglich weiterentwickelt und die Methoden verpflichtend angewendet werden, so wie im Fall der tierversuchsfreien Methoden zur Feststellung herzscheidender Wirkungen von Arzneimitteln.

Die erste Ausgabe befasst sich mit dem Thema Herzgiftigkeit in der Arzneimittelforschung und -Entwicklung, in der Fachsprache Kardiotoxizität genannt. Die aktuell angewendeten Tests auf Herzgiftigkeit bestehen aus einer Kombination von Tierversuchen und tierversuchsfreien Verfahren. Die Tests gibt die Richtlinie S7B der International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH) vor. Jedoch gibt es inzwischen um Klassen bessere tierversuchsfreie Methoden, von denen die besten in eine neue, in den USA entwickelte Teststrategie, der *Initiative Comprehensive In Vitro Proarrhythmia Assay (CiPA)* der Food and Drug Administration, eingeflossen sind. Die Aufnahme dieser Teststrategie in die zuständige Prüfrichtlinie ist allerdings noch nicht erfolgt, obwohl das Verfahren schon Ende 2017 abgeschlossen sein sollte. Der Prozess stagniert aus unbekanntem Gründen.

Derweil leiden und sterben Tiere in wissenschaftlich veralteten Tests weiter, die die Herzgiftigkeit der Arzneimittel gar nicht zuverlässig entdecken können. Unzuverlässige Herzgiftigkeitstests können dazu führen, dass gute Arzneimittel nicht auf den Markt kommen oder im anderen Falle wegen herzscheidender Wirkungen wieder vom Markt genommen werden müssen, weil eine herzscheidende Wirkung zuvor nicht erkannt werden konnte.

Mit unserem „Replacement des Jahres“ berichten wir über eine solche Entwicklung vor und stellen die entwickelten tierleidfreien Alternativen vor.

## Einführung

Das „Replacement des Jahres“ beleuchtet die Anwendungspraxis eines tierversuchsfreien Verfahrens, das in der Regel nicht einen gesamten Tierversuch ersetzt, sondern zur Untersuchung von Teilfragen verwendet wird. Heute ist es an der Tagesordnung, dass behördlich vorgeschriebene Tests, aber auch Fragen aus der Grundlagenforschung durch die Kombination von tierversuchsfreien Methoden und Tierexperimenten durchgeführt werden. Die Tierversuche erfolgen mit der Begründung, dass das Leistungsspektrum der vorhandenen tierversuchsfreien Verfahren eingeschränkt ist. Daraus ergibt sich ein spezifisches Problem, das wir mit dem „Replacement des Jahres“ aufzeigen: Das Leistungsspektrum der tierversuchsfreien Methode(n) muss kontinuierlich und so schnell wie möglich weiterentwickelt und die Methoden verpflichtend angewendet werden. Konkret heißt das: Für den Abbau der Tierversuche ist ein perfektes System zur Aktualisierung der Prüfvorschriften und des Leistungsspektrums der tierversuchsfreien Methoden notwendig. Nur so kann verhindert werden, dass weitere Tierversuche und veraltete tierversuchsfreie Verfahren genutzt werden, obwohl es bereits bessere gibt. Mit dem „Replacement des Jahres“ zeigen wir herausragende und förderungswürdige Entwicklungen für den Bereich Ersatzverfahren zum Tierversuch auf. Doch dies ist nicht alles. Bei unseren Recherchen stellten wir fest, dass die derzeit gültige internationale Richtlinie S7B, die vorgibt, wie die Herzgiftigkeit von Arzneimitteln getestet werden muss, gefährliche Mängel aufweist.

## Warum das Herz?

Kardiotoxizität, also die schädliche Wirkung von Arzneimitteln auf das Herz, ist der Grund für etwa ein Drittel aller wieder vom Markt genommenen neuen Arzneimittel und für das Ende vieler Wirkstoffe in der späten klinischen Entwicklungsphase<sup>(1)</sup>. Die Entwicklung von Arzneimitteln ist mit einem Produktionszeitraum von 10 bis 15 Jahren sehr zeitintensiv und die Kosten belaufen sich mittlerweile auf ca. 2,6 Milliarden Dollar<sup>(2, 3)</sup>.

Von allen abgebrochenen Entwicklungen sind 35 Prozent auf nicht-klinische toxikologische Ereignisse zurückzuführen. Hinzu kommt, dass auch verschiedene bereits auf dem Markt befindliche Arzneimittel wieder zurückgezogen werden mussten, weil sie sich in der Anwendungspraxis als herzscheidend herausstellten (z. B. *Rosiglitazone* in den USA oder *Sibutramine* in Europa, den USA und Canada)<sup>(4, 5)</sup>. In anderen Fällen werden über Arzneimittel im Nachhinein Rote Hand-Briefe verfasst, wie z. B. 2013 über das Leukämiemittel *Ponatinib*<sup>(6)</sup>. Mit Rote-Hand-Briefen werden Fachkreise über neu erkannte, relevante Arzneimittelrisiken informiert.

Daher müssen Medikamente vor den klinischen Prüfungen auf Herztoxizität getestet werden und das passiert aktuell *in-vitro*, aber auch *in-vivo*.

Im Vergleich dazu werden chemische Substanzen allgemein auf Organtoxizität getestet, um eine Sicherheitsbewertung vornehmen zu können. Bei der Chemikalienprüfung bedeutet dies akute, subakute (28 Tage), subchronische (90 Tage)



Abb. 2: Arzneimittel müssen auf Herzgiftigkeit getestet werden.

Foto: Pexels, Pixabay.com

sowie chronische Tests an Nagetieren und gegebenenfalls Nicht-Nagetieren. Nach Tötung der Tiere werden die meisten Organe – so auch das Herz – für weitergehende Untersuchungen entnommen (große Nekropsie, mikroskopische Gewebeuntersuchungen).

### **Begriffsbestimmungen**

- **In-vitro:** Untersuchungen, die außerhalb eines lebenden Organismus stattfinden, die Testung mit Zellkulturen.
- **In-vivo:** Untersuchungen, die im lebenden Organismus ablaufen, also im Tierversuch.
- **Ex-vivo:** Test oder Manipulationen nach vorheriger Entnahme von Geweben oder Organen aus dem Körper.
- **In-silico:** Reaktionen bzw. Abläufe, die in der Computersimulation unter Verwendung von speziellen Programmen bzw. Algorithmen stattfinden.

## **1. Rechtliche Grundlagen**

Solange es keine anerkannten und in die Testvorschriften aufgenommenen tierversuchsfreien Verfahren gibt, sind Tierversuche gesetzlich vorgeschrieben und durchzuführen.

### **Arzneimittelentwicklung und -prüfung**

Für die Arzneimittelentwicklung gelten in Europa, den USA und Japan die ICH Guidelines für die Industrie (ICH=International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use). Sie werden vom ICH-Beratungsgremium herausgegeben. Aufgabe des Beratungsgremiums ist die Harmonisierung der Beurteilungskriterien von Human-Arzneimitteln als Basis der Arzneimittelzulassung in Europa, den USA, Japan und vielen weiteren Ländern.

Zur Arzneimittelforschung und -entwicklung werden sowohl pharmakologische als auch toxikologische Studien durchgeführt. Die meisten erfolgen am Tier. Zielsetzung der Tierversuche bei der Arzneimittelentwicklung ist es, die Wirksamkeit und die Unbedenklichkeit nachzuweisen.

### **Begriffsbestimmungen**

- **Pharmakologie:** untersucht die Wechselwirkungen zwischen Stoffen und Lebewesen. Zur Pharmakologie gehören die
  - **Pharmakodynamik:** untersucht den Effekt eines Arzneimittels auf ein Lebewesen.
  - **Pharmakokinetik:** untersucht den Umgang des Körpers mit dem Arzneimittel mit der Zeit
- **Sicherheitspharmakologie:** untersucht unerwünschte Effekte von Arzneimitteln auf die Vitalorgane Herz, Lunge und das Zentralnervensystem
- **Toxikologie:** untersucht die Schädigungen von Stoffen auf Zellen, Gewebe oder den Organismus.

In der *Pharmakologie* wird z. B. die Kinetik bestimmt, also z. B. der Zeitpunkt der höchsten Konzentration im Blutplasma, die Halbwertszeit (wann ist 50 % der Substanz ausgeschieden) und die Bioverfügbarkeit (Konzentration im Plasma mit der Zeit).

In der *allgemeinen Toxizität* wird nach Verabreichung einer Einzeldosis an zwei Säugetierarten (ein Nagetier und ein Nichtnagetier – typischerweise Ratte und Hund) die Akuttoxizität bestimmt. In Langzeitstudien mit wiederholter Gabe (repeated dose) werden weitere Grenzwerte ermittelt. Hierzu gehören z. B. die maximal tolerierbare Dosis (MTD) und die sogenannte Dosis-begrenzende Toxizität (DLT). Es erfolgen ferner Tests auf lokale Toleranz, (Schäden aufgrund von Kontaktallergie), auf Reproduktionsschädigung, DNA-Schädigung, Beeinträchtigung des Immunsystems, Krebsauslösung und ggfs. Phototoxizität.

Die Standardanforderungen für die Toxizitätstests von Arzneimitteln richten sich nach den Eigenschaften der einzelnen Substanz und sind daher Fall-zu-Fall-Entscheidungen<sup>(7)</sup>.

Für die Toxizitätsbestimmung gelten verschiedene Guidelines, so z. B. die Guideline on repeated dose Toxicity<sup>(8)</sup>. Je nachdem, welche Art Arzneimittel entwickelt werden soll (Biopharmazeutika, Impfstoffe), wie lange die Tests durchgeführt werden sollen (einmalig, subchronisch, chronisch), welche Zielsetzung vorliegt (z. B. Bestimmung der Toxikokinetik, Reprotoxizität) bilden weitere Guidelines die Grundlage.

## Sicherheitspharmakologische Tests auf Herzgiftigkeit

Wissenschaftler haben schon vor Jahren festgestellt, dass das kardiovaskuläre System häufiger als andere Systeme von toxischen Reaktionen betroffen ist<sup>(9)</sup>. Die Beurteilung pharmakologischer Effekte (z. B. von Krebsmitteln) auf die Vitalfunktionen der Organe (kardiovaskular, respiratorisch oder hinsichtlich des Zentralnervensystems) müssen vorliegen, bevor die klinischen Studien begonnen werden. Diese Untersuchungen können aber auch in allgemeine Toxizitätsstudien integriert werden. In Fällen, wo spezifische Bedenken vorliegen, werden geeignete pharmakologische Studien (Begriffserklärung siehe Kasten oben) nach ICH S7A und/oder S7B durchgeführt<sup>(10, Tabelle 1)</sup>.

ICH Testguideline	Beschreibung	Studientyp
S7A	Safety pharmacology studies for human pharmaceuticals <i>in-vivo</i> and <i>in-vitro</i> studies	<i>In-vivo, in-vitro</i>
S7B	The nonclinical Evaluation of the Potential for delayed Ventricular Repolarization (QT Interval Prolongation) by Human Pharmaceuticals	<i>In-vivo, ex-vivo, in-vitro</i>
ICH E14	The Clinical Evaluation of QT/QTc Interval Prolongation and Proarrhythmic Potential for Non-Antiarrhythmic Drugs	Studie mit gesunden Probanden

Tab. 1: Richtlinien für sicherheitspharmakologische Tests auf Herzgiftigkeit nach ICH

Die Guideline S7B beschreibt eine präklinische Teststrategie zur Beurteilung, ob eine Substanz und deren Metabolite das Potenzial haben, die Repolarisierung in den Herzkammern zu verzögern. (Repolarisierung: Eine Herzzelle hat in Ruhe eine Ladungsdifferenz zwischen dem Zellinneren und -äußeren. Im Zellinneren ist die elektrische Ladung negativer und beträgt ungefähr -90 Millivolt. Durch eine Stimulation erfolgt durch Einstrom von positiv geladenen Teilchen in das Innere der Zelle eine kurzzeitige Abweichung von dieser negativen Ladung, die nach kurzer Zeit wiederhergestellt wird (siehe Kapitel 2, Aufbau und Physiologie des Herzens).

Dazu soll das Ausmaß dieser Verzögerung bestimmbar sein und der Aktionsmechanismus ermittelt werden. Für diese Fragestellungen sind sowohl Tierversuche als auch andere Tests empfohlen. Zur Beurteilung der Auswirkungen der Prüfsubstanz auf das Herz-Kreislauf-System werden Blutdruck, Herzfrequenz, Herzzeitvolumen, ventrikuläre Kontraktilität, Gefäßwiderstand und weitere Parameter untersucht. Die Gabe der Testsubstanz und ggfs. Ihrer Metabolite erfolgt in der Regel einmalig.

Der Inhalt der Richtlinie ist nicht unumstritten, weil damit nicht alle notwendigen Informationen über eine Herzgiftigkeit erzielt werden können.

### Was schreibt die ICH Richtlinie S7B vor?

The S7B Richtlinie empfiehlt den *in-vitro* hERG patch clamp assay (Beschreibung siehe Abschnitt 5, Seite 14) in Kombination mit *in-vivo* QT-Untersuchungen an Nicht-Nagetieren. In S7B werden auch EKGs mit Tieren empfohlen, weil auch Informationen über nicht-kardiale Einflüsse (z. B. Tonus des autonomen Nervensystems, Hormonsystem) erhalten werden können. In bestimmten Fällen können so auch Informationen über die Aktivität mehrerer Ionenkanäle im Herzen erhalten werden<sup>(11)</sup>. Da diese Studienkombination als nicht ausreichend angesehen wurde, um das Risiko einer sogenannten Spitzenumkehrtachykardie (TdP), einer lebensbedrohlichen Herzrhythmusstörung, zu beurteilen, sollten elektrokardiographische Untersuchungen an gesunden Probanden nach ICH E14 durchgeführt werden. Dies ist aufgrund der umstrittenen Testkombinationen der Richtlinie S7B brisant. Die Probandenrichtlinie wurde bereits am 15.12.2015 aktualisiert. Die Veröffentlichung einer überarbeiteten ICH Richtlinie S7B dagegen lässt im Moment noch auf sich warten.

## Chemikalien

Mögliche herzscheidende Wirkungen von Chemikalien werden durch die Organtoxizitätsuntersuchungen nach den OECD-Testrichtlinien auf der Grundlage der REACH-Verordnung 1907/2006 abgedeckt. Zu den Chemikalien gehören auch Inhaltsstoffe, die nicht ausschließlich in der Kosmetik genutzt werden.

## 2. Aufbau und Physiologie des Herzens

Das Herz ist ein 4-kammeriges Hohlorgan, dessen Pumpenfunktion auf der rhythmischen Erschlaffung und Kontraktion der Herzmuskulatur beruht.

In der sogenannten *Diastole* füllen sich die Herzkammern (Ventrikel) mit Blut. In der *Systole* werfen sie es in die großen Arterien aus. Ein Rückstrom wird durch die Herzklappen verhindert. Jedem Ventrikel ist ein Vorhof vorgeschaltet. Der gesamte Pumpmechanismus wird durch die Erregungsausbreitung des Myokards (Herzmuskulatur) gesteuert.

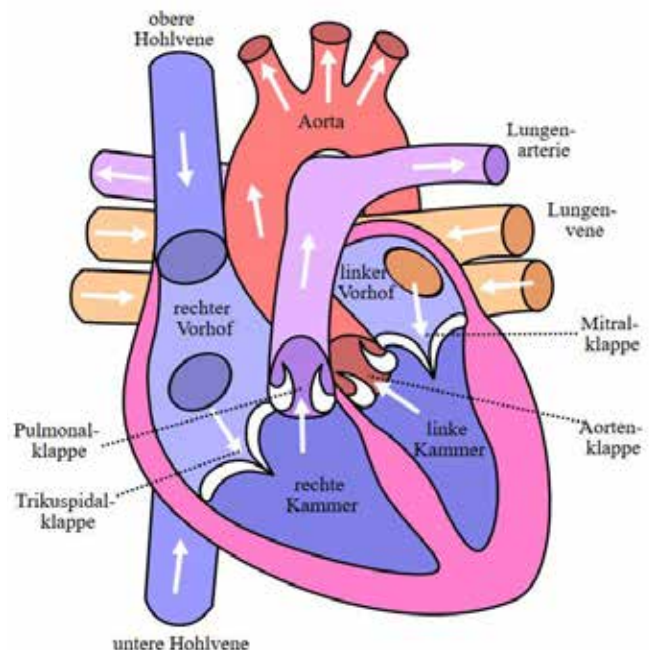


Abb. 1: Schema eines menschlichen Herzens. Die weißen Pfeile zeigen den Blutfluss an.  
Grafik: Jakov, Wikipedia.

Es gibt das Erregungs-/Reizweiterleitungsmyokard und das Arbeitsmyokard. Das Erregungsmyokard besteht aus den vier Strukturen Sinusknoten, AV-Knoten, His-Bündeln und Purkinjefasern. Die Muskelfasern werden ähnlich erregt wie Nervenzellen: sie haben ein Ruhepotenzial und können nach Erregung ein Aktionspotenzial weiterleiten.

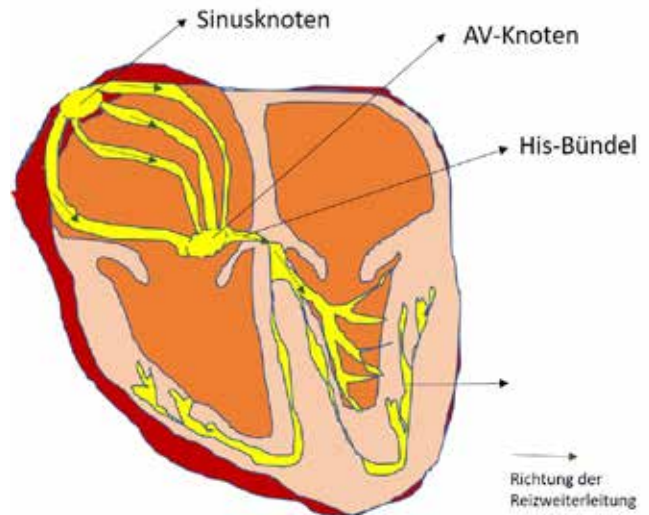


Abb. 2: Wesentliche Strukturen des Erregungs- und Reizweiterleitungsmyokards.  
Grafik: C. Hohensee

Spontane Erregungen entstehen normalerweise im Sinusknoten sozusagen als Herzschrittmacher, eine Stelle am rechten Vorhof an der Einmündung der oberen Hohlvene. Von hier breitet sich die Erregung zunächst über das Arbeitsmyokard der Vorhöfe aus und gelangt dann zum Atrioventrikularknoten (AV-Knoten). Hier ist die Reizleitungsgeschwindigkeit wegen des geringeren Faserdurchmessers geringer, wodurch die Systole der Ventrikel erst nach der Vorhofsystole erfolgt.

Danach erreicht die Erregung die sogenannten His-Bündel, die erregungsleitende Verbindung zwischen Vorhöfen und Herzkammern. Das Bündel teilt sich in zwei Kammerschenkel, an deren Ende die Purkinje-Fasern liegen<sup>(12)</sup>. Auch die anderen Erregungsleitstrukturen können als Schrittmacher fungieren: wenn der Sinusknoten ausfällt, kann der AV-Knoten die Funktion übernehmen. Auch das His-Bündel kann zudem im Notfall noch als Teil der Erregungserzeugung funktionieren, wenn Sinus- und AV-Knoten aufgrund z. B. einer Nervenvergiftung ausgefallen sind<sup>(13)</sup>.

Eine Störung der Erregungsleitung führt zu Herzrhythmusstörungen (Arrhythmien).

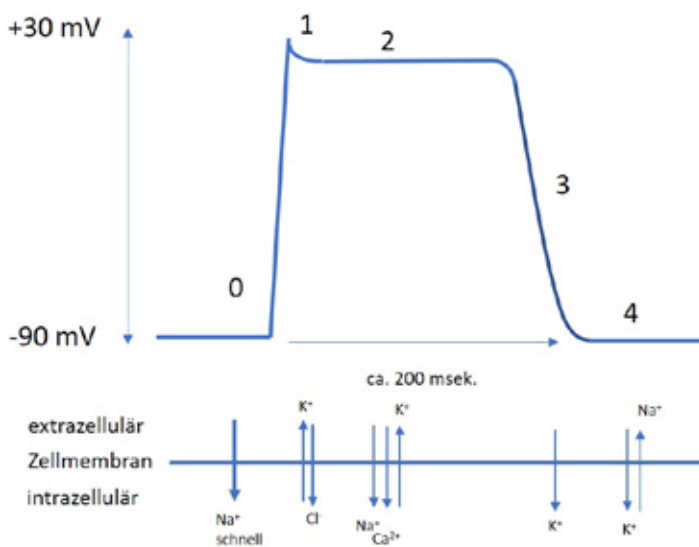


Abb. 3: Aktionspotenzial einer Herzzelle und Strömungsbeziehungen von Ionen in den jeweiligen Phasen 1 bis 4. Schema nach Parsi und Parsi, 2000.

Das menschliche ventrikuläre Aktionspotenzial besteht aus fünf aufeinander folgenden Phasen:

Phase 0: Der Aufschlag des Aktionspotentials ist in erster Linie eine Folge eines schnellen, vorübergehenden Zuflusses von  $\text{Na}^+$  über  $\text{Na}^+$ -Kanäle.

Phase 1: Die Beendigung der Aufwärtsbewegung des Aktionspotentials und der frühen Repolarisationsphase resultiert aus der Inaktivierung der  $\text{Na}^+$ -Kanäle und einem transienten Ausfluss von  $\text{K}^+$  durch  $\text{K}^+$ -Kanäle.

Phase 2: Das Plateau des Aktionspotentials ist ein Spiegelbild eines Gleichgewichts zwischen dem Zufluss von  $\text{Ca}^{2+}$  durch L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle und den Ausfluss repolarisierender  $\text{K}^+$  Ströme.

Phase 3: Der anhaltende Abwärtshub des Aktionspotentials und die späte Repolarisationsphase resultieren aus dem Ausfluss von  $\text{K}^+$  über verzögerte Gleichrichter- $\text{K}^+$ -Kanäle.

Phase 4: Das Ruhepotential wird durch den einwärts gerichteten  $\text{K}^+$  Strom aufrechterhalten.



Das Aktionspotenzial ist eine vorübergehende Abweichung vom Membranpotenzial einer Zelle. Die Potenzialdifferenz besteht durch ein bestimmtes Verhältnis von Ionen zwischen dem Zellinneren und dem Zelläußeren. Das Ruhepotenzial beträgt -90 mV. Durch eine Depolarisation um nur 15-20 mV aufgrund eines Natriumioneneinstroms kommt es zu einem schnellen Potenzialanstieg in der Zelle, die positiv geladen wird (30 mV) und erst nach einer Plateauphase wieder auf den Ausgangswert zurücksinkt. Hier spielt sich ein kompliziertes Verhältnis zwischen Durchlässigkeit von positiven und negativ geladenen Salzen zwischen innen und außen ab, die durch Kanäle ein- bzw. ausströmen (siehe Abb. 3).

Beim normalen elektrophysiologischen Verhalten des Herzens folgt einer schnellen Depolarisation eine langsame Repolarisation<sup>(14)</sup>.

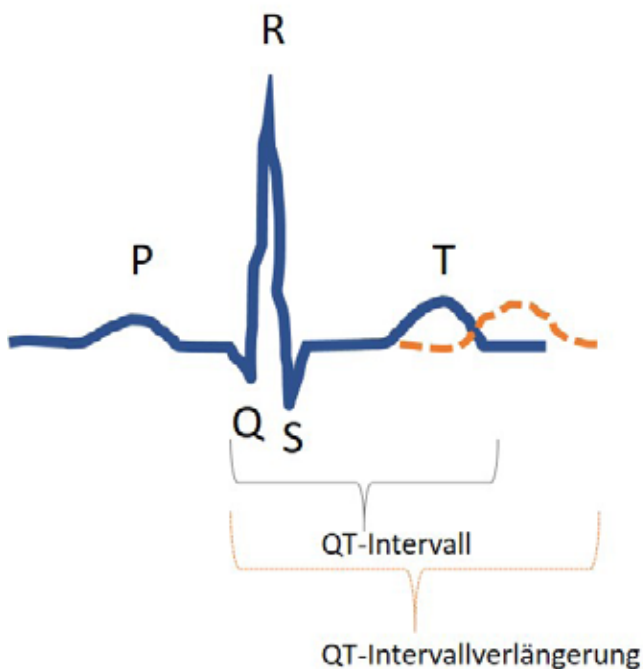


Abb. 4: Darstellung eines Elektrokardiogramms (EKG) eines gesunden Herzens. Die Dauer der Ausbildung der Strecke zwischen Q und T spielt bei der Beurteilung von durch Arzneimittel bedingte Herzrhythmusstörungen eine Rolle.

Grafik: C. Hohensee

Das QT-Intervall (Zeitspanne vom Beginn des QRS-Komplexes bis zum Ende der T-Welle) des Elektrokardiogramms (EKG) ist ein Maß für die Dauer der ventrikulären Depolarisation und Repolarisierung (siehe Abbildung 4). Die QT-Intervallverlängerung kann angeboren oder erworben (z. B. pharmazeutisch induziert) sein. Wenn die ventrikuläre Repolarisation verzögert und das QT-Intervall verlängert wird, besteht ein erhöhtes Risiko für ventrikuläre Tachyarrhythmie, einschließlich einer Spitzenumkehrtachykardie (Torsade de pointes), insbesondere in Kombination mit anderen Risikofaktoren (z. B. Hypokaliämie, strukturelle Herzkrankheit), Bradykardie).

Die Repolarisation in der Herzkammer, die durch die Dauer des kardialen Aktionspotenzials bestimmt wird, ist ein komplexer physiologischer Prozess. Es ist das Nettoergebnis der Aktivitäten vieler Membranionen, Kanäle und Transporter. Unter physiologischen Bedingungen sind die Funktionen dieser Ionenkanäle und Transporter stark voneinander abhängig. Die Aktivität jedes Ionenkanals oder Transporters wird von mehreren Faktoren beeinflusst, einschließlich, aber nicht beschränkt auf intrazelluläre und extrazelluläre Ionenkonzentrationen, Membranpotential, elektrische Kopplung von Zelle zu Zelle, Herzfrequenz und Aktivität des

autonomen Nervensystems. Wichtig sind auch der Stoffwechselzustand (z. B. Säure-Basen-Haushalt) sowie Lage und Typ der Herzzellen<sup>(15)</sup>.

Die Aktionspotential-Morphologie variiert zwischen Vorhöfen und Ventrikeln und auch in der Wand des Herzgewebes. Die Ionenkanäle in den verschiedenen Herzregionen sind unterschiedlich ausgeprägt und das zeigt sich auch in den Aktionspotenzialen. Zellen des Herzmuskels z. B. zeigen in Phase 1 des Aktionspotenzials eine Kerbe („notch“) auf, welche im Endokard viel weniger ausgeprägt ist. Purkinje- und sogenannte midmyokardiale Zellen (M-Zellen) weisen ein erheblich längeres Aktionspotential auf<sup>(14)</sup>.

## Herzrhythmusstörungen

Hintergrund ist eine Störung der normalen Herzfrequenz aufgrund einer Störung der Erregungs-bildung und -leitung im Herzmuskel. Dabei kann die Herzfrequenz erhöht (Tachykardie, ab 100 Herzschläge pro Minute) oder erniedrigt sein (Brachykardie, mit weniger als 60 Herzschlägen pro Minute).

Torsade-de-Pointes (TdP) bezeichnet eine Spitzenumkehrtachykardie. Im Elektrokardiogramm ändert sich dabei die Welle alle 5 bis 10 Schläge in Ihrer Amplitude, was zu einem spindelförmigen Aussehen auf dem EKG führt. Sie kann in tödliches Kammerflimmern übergehen<sup>(16)</sup> (siehe Abbildung 5).

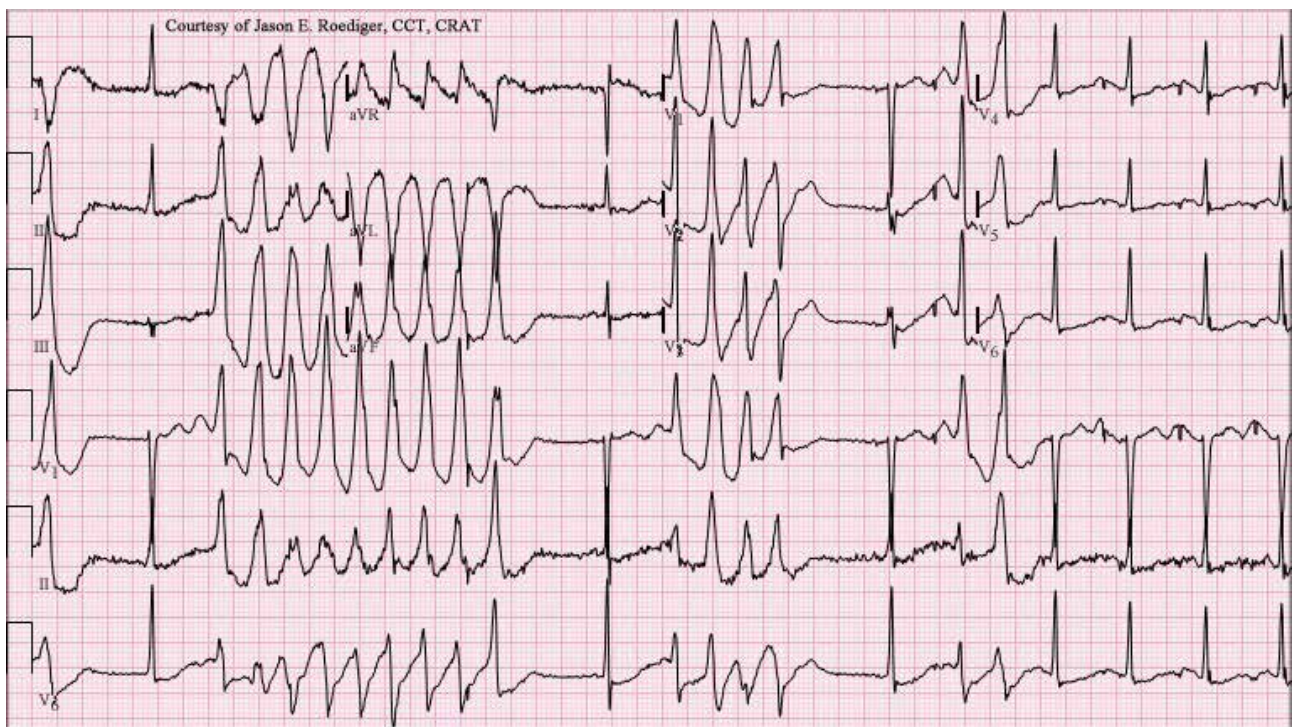


Abb. 5: Kardiogramm bei Torsade-de-Pointes-Tachykardie.  
Foto: Jer5150, Wikipedia.

Zur Untersuchung auf Herzgiftigkeit machen sich die Wissenschaftler bislang hauptsächlich den Kaliumkanal hERG zunutze. Sie hatten herausgefunden, dass durch die Hemmung von hERG Mechanismen ausgelöst werden, die zu Herzrhythmusstörungen (Torsade-Tachykardie, verbunden mit einer QT-Verlängerung) führen, so wie sie auch durch Arzneimittel verursacht werden können<sup>(17)</sup>. Dabei blieb allerdings unentdeckt, dass Kalium nicht nur über hERG, sondern auch andere Ionenkanäle transportiert wird, siehe Kapitel 5, hERG.

### 3. Welche Tiere werden allgemein eingesetzt und wie viele?

#### Arzneimittel

Über die zu verwendende Tierart und Konzentrationen bei *allgemeinen Langzeitstudien* werden keine festen Vorgaben gemacht. Die Tierart sollte nach ihrer Ähnlichkeit zum Menschen gewählt werden unter Berücksichtigung der Dauer, bis das Arzneimittel verstoffwechselt und ausgeschieden worden ist und gegebenenfalls der Art der Verstoffwechslung des Arzneimittels, wodurch es unter Umständen erst wirksam oder schädlich werden kann. Sollte das Tier ein Arzneimittel nicht in gleicher Art und Weise verstoffwechseln wie der Mensch, so werden zusätzliche Giftigkeitsstudien mit dem Stoffwechselprodukt selbst gemacht.

Grundsätzlich kommen ein Nagetier und ein Nicht-Nagetier zum Einsatz. Wenn nur eine Spezies verwendet wird, muss das gerechtfertigt werden. Typischerweise sind es Ratten und Hunde (vor allem Beagle). Alternativ können auch Maus, Meerschweinchen oder Hamster als Nager, bei den Nicht-Nagern Minischwein, eingeschränkt Kaninchen oder nicht-humane Primaten (Marmoset, Cynomolgus) eingesetzt werden.

Nicht-humane Primaten werden nur verwendet, wenn es eindeutige Hinweise darauf gibt, dass das Nagetiermodell ungeeignet ist, um die gewünschten Informationen zu liefern und es ohne die vorherigen Sicherheitstests mit derartigen Primaten dadurch zu einem Missbrauch von Menschen in klinischen Studien käme<sup>(18)</sup>, z. B. bei der monoklonalen Antikörperentwicklung. Ratten sind aufgrund des unterschiedlichen Stoffwechsels nur in eingeschränktem Maße verwendbar, mit ihnen werden z. B. keine Elektrokardiogramme aufgezeichnet.

Die Gruppengröße soll „groß genug sein, um aussagekräftige, wissenschaftlich interpretierbare Ergebnisse zu erhalten“<sup>(8)</sup>. Die Anzahl der verwendeten Tiere unterscheidet sich je nach Studiendauer. Beide Geschlechter sollen eingesetzt werden.

Allgemein beschreibt die Guideline für Langzeituntersuchungen eine niedrige, eine mittlere und eine hohe Dosis zzgl. Zwei Kontrollgruppen. Die Verabreichung erfolgt in der Regel einmal täglich über den gesamten Behandlungszeitraum. Bei EINER Substanzkonzentration werden

- bei einmaliger Gabe zehn Tiere pro Geschlecht Nager und drei pro Geschlecht Nicht-Nager eingesetzt, wobei in beiden Spezies noch sogenannte Recovery-Tiere dazukommen. Das sind Erholungstiere, die länger als die anderen Versuchstiere am Leben bleiben, um zu studieren, ob sie sich von den schädlichen toxikologischen Wirkungen erholen können<sup>(19)</sup>. Das sind bei den Nagern fünf pro Geschlecht und bei den Nicht-Nagern zwei pro Geschlecht. Bei dieser Studiendauer wären das rund 30 Nager und 14 Nicht-Nager.
- bei subakuten 4-Wochen-Tests zehn Tiere pro Geschlecht (rund 40) Nager (inklusive Recovery) verwendet. Die Anzahl der Nicht-Nager liegt bei zehn.
- bei subchronischen Studien ebenfalls zehn Nager pro Geschlecht und ebenso so viele für Recovery-Beobachtungen genutzt<sup>(30)</sup>. Bei den Nicht-Nagern sind es drei pro Geschlecht sowie ebenso viele für Recovery (=16).
- bei 6-Monats-Tests Tests 20 Nager pro Geschlecht und noch mal zehn pro Geschlecht für Recovery-Beobachtungen verbraucht (annähernd 60). Der Anteil der Nicht-Nager erhöht sich auch etwas auf fünf je Geschlecht und drei für die Recovery-Tiere (=16).
- bei 9-Monats-Studien nur Nicht-Nager eingesetzt (ca. 16).

Kinetische Studien werden nur mit Nagern durchgeführt. Es fallen bis zu zehn Tiere pro Geschlecht und Konzentration zusätzlich an.

## Chemikalien

In Chemikaliientests werden hauptsächlich Langzeittests durchgeführt, um einen Einfluss der Chemikalien auf Organe wie das Herz zu untersuchen. Dabei werden die Tiere 28 Tage, 90 Tage oder länger in verschiedenen Konzentrationen immer wieder mit der Testsubstanz behandelt (repeated dose toxicity). Mit den Versuchen wird die allgemeine Toxizität, nicht nur speziell die Herzgiftigkeit, untersucht. Tabelle Nr. 4 im Anhang gibt einen Überblick über die Testrichtlinien, Versuche, die verwendeten Tiere und ihre Anzahl.

Die meisten 28- und 90-Untersuchungen erfolgen an Nagetieren (Ratte oder Maus) und sollen einen Hinweis auf Zielorgane geben, die von der Substanz betroffen sein können. Von den Ergebnissen wird oft der NOAEL (No observed adverse effect level) abgeleitet. Die Zielsetzung der chronischen Tests ist die Beobachtung über die gesamte Lebenszeit, um festzustellen, ob es eine Latenzperiode aufgrund von Anhäufungseffekten gibt, infolgedessen Schäden erst im Nachhinein auftreten<sup>(20)</sup>.

Während der Versuchszeit werden ggfs. klinische Parameter erhoben, ein Elektrokardiogramm aufgezeichnet und Blutuntersuchungen, Blutdruck-, Gewichts- und Größenmessungen etc. durchgeführt. Am Ende der Versuche werden alle Tiere getötet und die Organe für weitergehende Laboruntersuchungen (makroskopisch und mikroskopisch) entnommen.

## Stand der Dinge in Europa im Bereich der Kosmetiktestung

In geringerem Maße können auch Kosmetika zu kardiotoxischen Effekten führen<sup>(9)</sup>. Da aber Tierversuche zur Zwecken der Herstellung und Vermarktung von Kosmetika seit 2013 verboten sind, sind aussagekräftige *in-vitro*-Verfahren dringend notwendig<sup>(21)</sup>.

2008-2009 war der embryonale Stammzelltest für Embryotoxizitätstests im Gespräch, der aber kein expliziter Test auf Wirkung von z. B. Herzrhythmusstörungen war, sondern im Bereich der Entwicklungstoxizität eingesetzt werden sollte<sup>(22)</sup>. Dagegen wurde 2009 für einen automatisierten Screeningtest der Firma Biobide mit Zebrafischlarven eine Zulassung erwartet. Mit dem Test können die frühe Entwicklung von Brachykardien oder Rhythmusstörungen der Herzzellen untersucht werden<sup>(23)</sup>. Ob der Test inzwischen großflächig eingesetzt wird, ist allerdings unbekannt.

Nach dem „Dilemma“, dass zur akuten systemischen Toxizitätsprüfung nur *in-vivo*-Versuche zugelassen sind, dies in der Kosmetik jedoch verboten ist, sollten 2014 in einem ECVAM-Workshop- geeignete Zelltypen und Endpunkte gefunden werden, die zelltypenspezifische Toxizität anzeigen können. Diese Endpunkte sollten dann in eine abgestufte Teststrategie integriert werden<sup>(24)</sup>. Wir haben bei ECVAM nachgefragt, was aus diesem Forschungsauftrag geworden ist, jedoch noch keine Antwort erhalten.

Für Überlegungen über Ersatzverfahren zum Tierversuch im Bereich der Langzeittoxizität lief das zwischen 2011 und 2016 mit insgesamt 50 Millionen Euro finanzierte EU-Projekt EURAT-1. Hier befassten sich insbesondere die Teilprojekte DETECTIVE und Scr&Tox mit der Entwicklung von neuen Methoden zum Langzeittesten auf Herzgiftigkeit (siehe unter neue Methoden).

## 4. Wie wird in der Sicherheitspharmakologie auf Herzgiftigkeit untersucht?

### *In-vivo-Versuche*

Hunden werden telemetrische Geräte eingesetzt, um die Auswirkungen verabreichter Arzneimittel auf das QT-Intervall (siehe Kapitel 2, Aufbau und Physiologie des Herzens) in Echtzeit messen zu können. Das Telemetrie-System besteht aus einem Transmitter, einen Receiver und einem Aufzeichnungssystem. Der Transmitter wird auf der linken Seite des Körpers unter die Hautschichten implantiert. Zur Messung des Blutdrucks wird ein Katheter an die Schienbeinarterie einoperiert und bis zur Aorta vorgeschoben. Die EKG-Elektroden werden ebenfalls unter die Haut implantiert.

Während der Messungen (in nicht betäubtem Zustand) werden die Tiere einzeln gehalten und neben den telemetrischen Daten auch Videoaufzeichnungen angefertigt.

Beispiel: Jeder Hund (Beagle) erhielt z. B. entweder mehrere Dosen der Testsubstanz in wöchentlichen Abständen oder das Lösemittel. Am Ende der Versuche erhielten alle Hunde noch ein Antiarrhythmikum als Positivkontroll-Substanz<sup>(25)</sup>, um die Kaliumkanäle zu verschließen. Dadurch verlängern sich Aktionspotenzial und Refraktärzeit (Zeitraum nach Auslösung eines Aktionspotentials, in dem die auslösende Nervenzelle oder das Aggregat temporär nicht erneut auf einen Reiz reagieren kann)<sup>(26)</sup>. Von den Hunden, die die Positivkontrolle erhalten hatten, wurde zwischenzeitlich Blut von der Kopfvene genommen. Aufgezeichnet wurde ein Elektrokardiogramm an wachen oder narkotisierten Tieren und die Zeit, die die Erregung von den Herzvorhöfen zu den Ventrikeln benötigt, die Zeit der Depolarisation beider Kammern oder das QT-Intervall (Kammersystole) (siehe Kasten, Abb. 5)<sup>(27)</sup>. Ferner wurde Blutdruck und Herzfrequenz gemessen.



**Abb. 6: Hund zur Operation vorbereitet.**  
Foto: Aspen.rock, Fotolia.com

Verwendet werden häufig fünf Hunde pro Konzentration zzgl. Kontrolle (bei fünf Konzentrationen sind es ca. 25-30 Hunde). Die Versuche werden je nach Testsubstanz und Sensitivität auch mit nicht-humanen Primaten durchgeführt<sup>(28)</sup>.

Es gibt vielfältige Beschränkungen für den Ansatz der Telemetrie und Bedenken hinsichtlich falsch-positiver Messergebnisse und Kosten.

Gemäß der derzeit gültigen Guideline S7B werden *in-vitro*- und *in-vivo*-Assays als sich ergänzende Ansätze betrachtet, weshalb beide durchgeführt werden müssen, solange nicht andere Verfahren zugelassen und die Richtlinien geändert worden sind.

## **Ex-vivo-Versuche**

Das Aktionspotenzial wird häufig noch immer mit Kaninchenherzgewebe (Purkinje-Fasern oder Papillarmuskel, eine warzenförmige Vorstülpung des Herzmuskels, der mit der Segelklappe verbunden ist) gemessen.

Auch das Langendorff-Herz wird häufig noch präpariert: Tieren (z. B. Kaninchen oder Meerschweinchen) wird das Herz herauspräpariert, das Herz von Fettgewebe befreit und über die aufsteigende Aorta mit einer sauerstoffangereicherten Salzlösung bzw. spezieller Nährlösung (Perfusat) versorgt. Da sich die Herzkammern (Ventrikel) nicht selbst mit der Flüssigkeit füllen und daher keine Druckvolumenarbeit mehr geleistet werden kann, wird ein kleiner Ballon eingeführt und so der Ventrikel künstlich kontrahiert. Zur genauen Beschreibung der Präparation wird auf<sup>(29)</sup> verwiesen.

Gemessen werden damit Kontraktionskräfte des Herzens, Herzvolumen und der Ventrikel-Durchmesser. Zusätzlich kann ein Aktionspotenzial gemessen werden oder der Herzrhythmus<sup>(30, 29)</sup>. Die Werte von substanzbehandelten und unbehandelten Herzen werden verglichen.

Wissenschaftler sehen aber die Langendorff-Vorbereitung zunehmend kritisch, da sie keine pathologischen und pharmakologischen Zustände in ein autonom funktionierendes Nervensystem integrieren können. Die durchfließende Lösung lässt die Herzen außerdem im Laufe der Zeit ödematös werden, d.h. es kommt zu einer Flüssigkeits-Ansammlung im Gewebe, wodurch das Herz pro Stunde um ca. 5 % an Gewicht zunimmt. Außerdem lassen sich keine Stoffwechselprodukte (Metabolite) messen<sup>(31)</sup>. Trotzdem nutzen immer noch 38 % der befragten Pharmaunternehmen das Langendorff-Herz<sup>(32)</sup>.

Von Seiten der Industrie und Wissenschaft gibt es an den derzeitigen Richtlinien zahlreiche Kritik am Tierversuch in der Sicherheitspharmakologie für Arzneimittelentwicklung:

### **a) Nichtklinische Sicherheitsstudien modellieren nicht den erkrankten Patienten**

Die meisten präklinischen Sicherheitsstudien werden an jungen, gesunden Tieren durchgeführt, während viele Medikamente an Patienten mit Bluthochdruck, Dyslipidämie, Atherosklerose, fortgeschrittenem Alter, Diabetes und anderen Krankheiten verabreicht werden. Dementsprechend werden unvorhergesehene negative Auswirkungen von Medikamenten erst in späteren Stadien auftreten.

### **b) Multifaktorielle Erkrankungen sind nicht modellierbar**

Ebenso werden unerwünschte kardiovaskuläre Effekte, die in klinischen Studien oder nach dem Inverkehrbringen auftreten, wie Durchblutungsstörungen des Herzens oder eine Verschlechterung einer bereits bestehenden Erkrankung, nicht modelliert, da die verwendeten Tiere im Allgemeinen nicht anfällig für ischämische Verletzungen (mangelhafte bzw. keine Durchblutung bestimmter Herzregionen) sind und keine Vorerkrankungen aufweisen, welche dagegen aber in Zielpatienten-populationen vorkommen<sup>(33)</sup>.

### c) Speziesunterschiede

Abgesehen von Unterschieden im Krankheitshintergrund können in der Präklinik eingesetzte Tierarten physiologische Unterschiede zu menschlichen Patienten aufweisen. Neben der Tatsache, dass Ratten und Mäuse für die Charakterisierung der QT-Verlängerung ungeeignet sind, haben viele Tierarten z. B. Apolipoprotein-Profile (Apolipoproteine sind Lipoproteine, die im Blut zirkulieren), die sich stark von denen des Menschen unterscheiden und dadurch die Modellierung Arzneimittel-assoziiertes Veränderungen in Serum-Lipid-Profilen erschweren. Darüber hinaus kann der Kalziumaustausch der Herzmuskelzellen sehr unterschiedlich sein<sup>(33)</sup>.

### d) Sicherheitsstudien (meist mit einmaliger Verabreichung) und die Langzeitstudien (wiederholte Verabreichung) stehen nebeneinander

Kurzfristige präklinische Sicherheitsstudien modellieren keine chronischen Ergebnisse. Dadurch seien sie nicht sensitiv genug, um subtilere oder subklinische Effekte anzuzeigen, kritisieren Forscher. Chronische Ergebnisse werden durch *in-vivo*-Studien mit in der Regel bis zu 39 Wochen-Studien mit Nicht-Nagetierarten (Hund, nicht-humane Primaten, siehe Anlage, Tabellen 1 und 2) und 26 Wochen-Studien mit Nagetieren erzielt. Zwar würden zu erwartende akute Veränderungen der kardiovaskulären Funktionen (QT-Verlängerung, Blutdruck, Herzfrequenz) durch Medikamente untersucht. Weniger bekannt seien aber Untersuchungen zu medikamentös induzierten Verletzungen der Herzmuskulatur, da viele der Medikamente, die nach Langzeitstudien in Tiermodellen Läsionen verursachen, erst gar nicht in klinische Studien kommen<sup>(33)</sup>. Spontane progressive Kardiomyopathie, die in der Sprague Dawley-Ratte auftritt, können zu Verwechslungen bei der Identifizierung oder Interpretation potenzieller Einflüsse der Testsubstanzen führen<sup>(34)</sup>.

So wird unter anderem der Ruf nach *In-vitro*-Assays immer lauter, die die zu erwartende Herzgiftigkeit zuverlässig vorhersagen können<sup>(35)</sup>.

### ***In-vivo*-Alternative Zebrafisch hat sich nicht durchgesetzt**

Mit der Begründung, dass *in-vitro*-Tests allgemein kompliziert anzufertigen und zeitaufwändig seien, und nicht im Hochdurchsatz eingesetzt werden könnten, haben einige Wissenschaftler 2009 vorgeschlagen, die *in-vitro*-Methoden (hERG-Assay) durch den Zebrafisch zu ersetzen<sup>(36)</sup>. Allerdings sind die Ionen-Kanäle denen des Menschen nur ähnlich. Das Verfahren hat sich nicht durchgesetzt. Nur 12 % der Unternehmen nutzen derartige Assays<sup>(32)</sup>.

## **Messung der Repolarisation der Herzkammern *in-vitro***

*In-vitro*-Untersuchungen können wertvolle Hinweise auf die Wirkung einer Prüfsubstanz auf Aktionspotenzialdauer und Ionenströme geben. Da sich die Ionenstrom-Mechanismen bei der Repolarisation adulter Ratten und Mäuse von denen größerer Spezies und denen des Menschen unterscheiden, wird die Verwendung von Geweben dieser Tiere als nicht geeignet erachtet. *In-vitro*-Methoden ermöglichen es Forschern, zelluläre Mechanismen und die Beteiligung einzelner Kanäle zu finden, die *in-vivo*- oder *ex-vivo* nicht entdeckt werden können<sup>(11)</sup>. Sie spielen daher auch schon seit geraumer Zeit eine Rolle.

Für *in-vitro*-Untersuchungen werden zelluläre oder multizelluläre Systeme verwendet.

- Zelluläre Systeme sind z. B. einzelne Herzmuskelzellen oder heterologe Expressionssysteme (siehe unten),
- multizelluläre sind z. B. Purkinje-Fasern, in Monolayer spezialisierte Herzmuskelzellen, des Ventrikels, die bei spontaner Erregungsbildung entstandenen Aktionspotenziale weiterleiten.

## Einzelzellsysteme

### a) Heterologe Expressionssysteme

Heterologe Expressionssysteme sind Zellen von Tier oder einem anderen Organ des Menschen, in denen mit Hilfe einer gentechnischen Veränderung Kanäle der Herzmuskelzellen des Menschen ausgebildet werden. Diese Verfahren werden im Vorfeld der Arzneimittelentwicklung genutzt, um Substanzen zu screenen (Vorsortierung). Derartige Tests, bei denen humane hERG-Kanäle in HEK293- (human embryonic kidney) oder CHO-Zelllinien ausgebildet werden, zeigen häufig falsch positive oder falsch negative Ergebnisse an<sup>(37)</sup>.

Einzelzellsysteme werden im Hochdurchsatz verwendet. Häufig werden dabei die Spannungsänderungen z. B. durch einen Farbumschlag oder radioaktiven Liganden angezeigt. Es wird nur detektiert, ob die Testsubstanz bindet bzw. hemmt, aber nicht, in welcher Form sie mit dem Kanal interagiert.

### b) Patch clamp

Genauer ist daher die direkte Messung der Wirkung von Medikamenten auf den Ionenkanal über die externe Kontrolle der Transmembranspannung und der Ionenströme mit Patch-Clamp-Techniken (Abb. 7). Sie ermöglichen einen nicht so hohen Durchsatz wie heterologe Expressionssysteme, wurden aber von der Industrie automatisiert<sup>(37)</sup>.

Bei der Messung von Strömen im Ionenkanal mittels eines Voltage clamp-Assays werden zwei Elektroden in einer Petrischale verwendet. Die eine injiziert Strom in eine Zelle, mit der anderen werden die Spannungsänderungen der Zelle aufgenommen<sup>(38)</sup>.

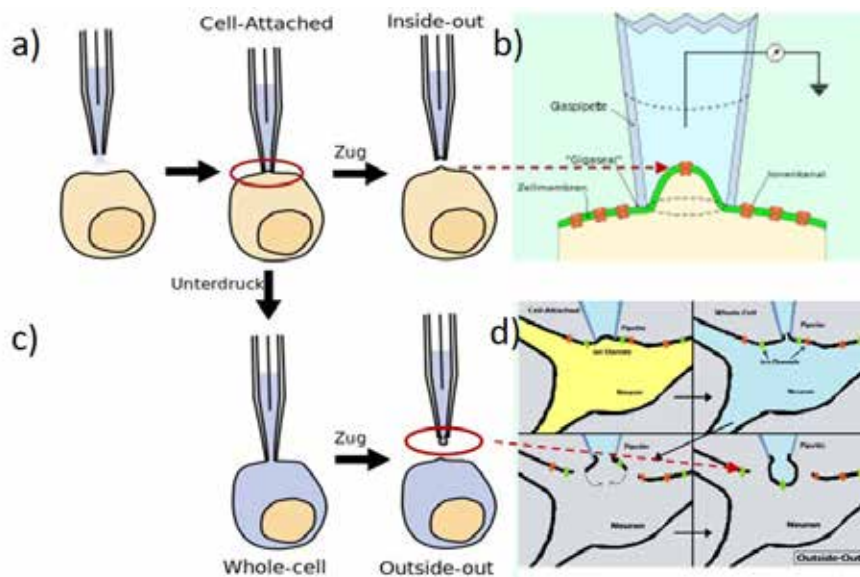


Abb. 7: Bei der Patch clamp-Technik zur Messung eines einzelnen Ionenkanals in einer Zelle wird zunächst eine ausgezogene Messpipette aus Glas mit einer leitfähigen Lösung (grau) gefüllt. Dort hinein wird ein mit Silberchlorid beschichteter Draht getaucht. Die Konstruktion dient als Elektrode. In der Badlösung liegt eine weitere Silberchlorid-Elektrode. a) Die gefüllte Pipette wird an einen Mikromanipulator angeschlossen, mit dem der Unterdruck reguliert werden kann und auf eine Zelle gedrückt. Dadurch wird ein Teil der Membran hochziehbar. Zwischen diesem Innenbereich und der Außenlösung bildet sich ein elektrischer Widerstand, den man Gigaseal (Stempel) nennt. Dadurch muss ein Strom, der durch einen der Ionenkanäle fließt auch durch die Pipette fließen und kann gemessen werden. Durch Anschluss eines Verstärkers kann die Aktivität des einzelnen Ionenkanals im Gigaseal gemessen werden<sup>(39)</sup>. b) **Inside-out**: Wenn die Pipette im cell-attached-Modus von der Zelle abgehoben wird, entsteht ein **inside-out-patch**. Die Membran stülpt sich mit einem Ionenkanal nach außen (siehe rechtes Foto, orangefarbener Kanal). c) **Outside-out**: während die Pipette nach Formung eines Gigaseals wieder abgezogen wird, bricht sie ein Stück der Membran aus der Zelle, in dem sich mehrere Ionenkanäle befinden. d) Das Membranstück formiert sich sehr schnell zu einem Bläschen an der Pipettenspitze, indem die Membranenden miteinander verschmelzen. Dadurch wäre die Kanalausrichtung genau umgekehrt. Intrazelluläre Kanäle wären extrazellulär und extrazelluläre intrazellulär. Daher muss der Vesikel wieder aufgebrochen werden, um die natürliche Kanalausrichtung intra- und extrazellulär wiederherzustellen (vergleiche Abbildung 8).

a) und c) Herstellung eines Gigaseals.

Grafik: BilzOr/Burkhard, Patchmodes.svg, Wikipedia.org.

b) Schematische Herstellung eines Inside-out patches.

Grafik: Peter Wolber, Fischx, Wikipedia.org.

d) Schematische Herstellung eines Outside-out patches.

Grafik: Winter20jb, Wikipedia.org.



## 5. Der hERG Assay

Der hERG-Kanal ist einer von mehreren Kalium-selektiven spannungsabhängigen Kanälen, die bei der Kontrolle der elektrischen Aktivität des Herzens eine Rolle spielen (siehe Abb. 8). Über die Anatomie und Eigenschaften der Kaliumkanäle sei auf MacKinnon<sup>(40)</sup> verwiesen. Wissenschaftler haben seit den 90er Jahren den Kaliumkanal hERG für ihre Untersuchungen auf Herzgiftigkeit genutzt, da sie entdeckt hatten, dass seine Hemmung scheinbar den molekularen Mechanismus der durch Arzneimittel ausgelösten Herzrhythmusstörungen (Torsade-Tachykardie, verbunden mit einer QT-Verlängerung) darstellt<sup>(17)</sup>.

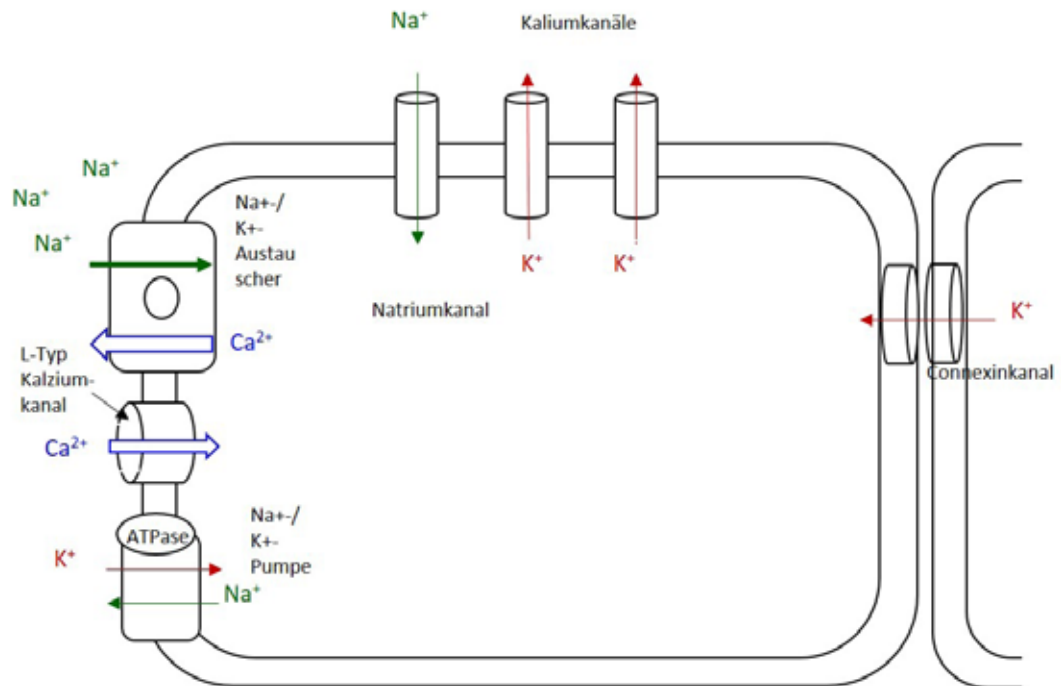


Abb. 8: Schema einer Herzzelle mit den wichtigsten Kanälen.  
Grafik: C. Hohensee

Der einwärts gerichtete, spannungsabhängige Kaliumkanal, der für die Repolarisation in den Herzzellen zuständig ist, ist meist für medikamenteninduzierte Herzrhythmusstörungen verantwortlich und daher Gegenstand entwickelter *in-vitro*-Verfahren.

Bei negativem Membranpotenzial ist der Kanal geschlossen, steigt das Potenzial (Depolarisierung), öffnet sich der Kanal und entlässt Kaliumionen aus dem Zellinneren nach außen<sup>(41)</sup>.

*In-vitro*- und *in-silico*-Ansätze haben ergeben, dass die meisten hERG-Kanal-Blocker am Kanalhohlraum innerhalb der Porenmodule interagieren<sup>(41)</sup> und so zu Herzrhythmusstörungen führen können. Das QT-Intervall ist ein Maß für die Dauer der Depolarisation der Ventrikel und folgender Repolarisierung. Der Kaliumstrom durch den hERG-Kanal hat bei der Repolarisierung eine Schlüsselrolle. Eine Hemmung hat Herzrhythmusstörungen zur Folge<sup>(15)</sup>.

Obwohl eine Verzögerung der Repolarisation durch Modulation von mehreren Arten von Ionenkanälen auftreten kann, ist die Hemmung von IKr (hERG) der häufigste verantwortliche Mechanismus für die pharmazeutisch induzierte Verlängerung des QT-Intervalls beim Menschen<sup>(11)</sup>.

### **Kritik: falsche Ergebnisse, wenn nur hERG gemessen wird**

Aber es gibt auch Kritik an diesem Test, da er zu falsch-positiven Ergebnissen führen kann. So wurden *Verapamil*, *Phenobarbital* oder *Ranolazine* als proarrhythmisch gemessen, obwohl sie nachweislich gar keine Herzrhythmusstörungen auslösen<sup>(42)</sup>. *Verapamil* dagegen wirkt auf den Kalziumkanal und gar nicht auf hERG<sup>(43)</sup>. Demzufolge können andere Mechanismen mit weiteren Kanälen zu ernsthaften Herzrhythmusstörungen führen, die nicht durch hERG abgedeckt sind.

Inzwischen ist bekannt, dass sich eine Verlängerung des Aktionspotenzials sowohl aus einer verminderten Inaktivierung der einwärts gerichteten Na<sup>+</sup>- oder Ca<sup>2+</sup>-Ströme, einer verstärkten Aktivierung des Ca<sup>2+</sup>-Stromes oder der Hemmung eines oder mehrerer der auswärts gerichteten K<sup>+</sup>-Ströme ergeben kann<sup>(15)</sup>. Dabei spielt der spannungsabhängige Kalziumkanal vom L-Typ eine wichtige Rolle, da er für die Erregbarkeit und Kontraktionsfähigkeit des Herzmuskels verantwortlich ist (siehe Abbildung 6). Im Gegensatz zum Kaliumkanal verkürzt eine Blockade des Kalziumkanals die QT-Zeit, wodurch die ausschließliche Konzentration auf mit hERG zu falschen Ergebnissen führen können, weil dieser Mechanismus die QT-Verlängerung aufhebt<sup>(44)</sup>.

**Wichtige spannungsgesteuerte Ionenkanäle sind also drei verschiedene Typen: Ca<sup>2+</sup>-Kanäle, K<sup>+</sup>-Kanäle und Na<sup>+</sup>-Kanäle, die bei unterschiedlichen Potenzialdifferenzen durchlässig werden.**

Medikamente können mehrere Ionenströme des Herzens hemmen. Dazu zählen der Na<sup>+</sup>-Strom (INa), L-Typ Ca<sup>2+</sup>-Strom ( $I_{Ca-L}$ ) und mehrere K<sup>+</sup>-Ströme ( $I_{to}$ ,  $I_{Kr}$ ,  $I_{Ks}$  und  $I_{K1}$ ), die in drei Hauptgruppen, je nach Kanalstruktur eingeteilt werden können. Durch die Störung beeinflussen die Arzneimittel die Aktionspotenziale und lösen Herzrhythmusstörungen aus. Aufgrund der zunehmenden Kenntnisse im Bereich der Genetik, Molekularbiologie und Biochemie kommen die Wissenschaftler den wirklichen Zellmechanismen auf die Spur. Zur Umsetzung neuer Methoden wurde die *Comprehensive in-vitro Proarrhythmie-Assay (CiPA)*-Initiative mit dem Ziel vorgeschlagen, Arzneimittelwirkungen auf mehrere Ionenkanäle des Herzens zu untersuchen (siehe Kapitel 6, Seite 18).

Inzwischen gehen Wissenschaftler davon aus, dass die ICH Guideline S7B mit Schwerpunkt auf der QT-Verlängerung und einem einzelnen Ionenstrom wahrscheinlich die Medikamentenentwicklung sogar negativ beeinflusst hat.

### **Multizelluläre Systeme**

Da nicht nur hERG, sondern auch weitere Ionenkanäle bei der Entwicklung von Herzrhythmusstörungen eine Rolle spielen können, verwenden Forscher neben den Einzelzellen multizelluläre Präparate wie Gruppen von Herzmuskelzellen. Dafür werden die Zellen in Lab-on-a-Chip Systemen perfundiert und die elektrischen Impulse z. B. über Multielektroden abgeleitet.

Dadurch können nicht nur die QT-Verlängerung, sondern verschiedene Stadien der Aktionspotenziale untersucht werden. In den letzten Jahren hat sich dafür die Technik der Differenzierung humaner Herzmuskelzellen-ähnlicher Zellen aus induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSC) entwickelt. Die Assays ermöglichen zumindest einen mittleren Durchsatz, ohne dass dafür Tiere verwendet werden<sup>(37)</sup>.

### Herzzellen vom Tier haben Nachteile

Primäre Herzmuskelzellen wurden aus einer Vielzahl von Tierarten isoliert und in toxikologischen Studien verwendet. Zwar werden dadurch alle Ionenkanäle exprimiert, die dem kardialen Aktionspotenzial zugrunde liegen, jedoch haben adulte Zellen ein geringes Zellteilungspotenzial, so dass immer wieder Herzmuskelzellen isoliert werden müssen und zahlreiche Tiere „verbraucht“ werden. Von Föten und neugeborenen Tieren isolierte Herzmuskelzellen sind auch andere Zelltypen wie Fibroblasten beigemischt, die die gewünschten Herzzellen nach einigen Tagen in Kultur überwachsen<sup>(45)</sup>. Daher hatten sich viele Wissenschaftler vor 10 Jahren der Stammzelltechnologie zugewandt.

## 6. Aktivitäten der Regulationsbehörden der letzten Jahre

ECVAM hatte 2009 einen Workshop zu Arzneimittel-induzierten Herzgiftigkeit mit dem Ziel organisiert, die Möglichkeiten zur Reduktion von Tierversuchen im Bereich der Herzgiftigkeit zu erörtern. Da zu diesem Zeitpunkt der Zusammenhang zwischen präklinischen und klinischen Ergebnissen als „relativ schwach“ angesehen wurde, sollte die medikamenteninduzierte Herzgiftigkeit beim Menschen durch zusätzliche Tests, verbessert werden. Eine Umfrage aus der Praxis ergab, dass die pharmazeutische Industrie *in-vitro*-Studien (hERG-Assays) hauptsächlich bei der Arzneimittelfindung einsetzt und weniger bei der -entwicklung<sup>(46, 22)</sup>.

In den USA hat 2013 die Food and Drug Administration (FDA) die *Comprehensive In-vitro Proarrhythmia Assay (CiPA)*-Initiative entwickelt. CiPA ist ein Vorschlag, der das Ziel hat, das proarrhythmische Risiko von Arzneimitteln mit genaueren und umfassenderen Methoden zu bewerten. Dem Steuerungsteam der Initiative gehören neben der FDA u.a. die amerikanische Safety Pharmacology Society, das Health and Environmental Science Institute sowie Behörden aus Europa, Japan und Canada an<sup>(47)</sup>.

Nicht mehr die QT-Verlängerung mit dem unzureichenden hERG-Kanal-Test, sondern die Proarrhythmie mit spezifischeren *in-vitro*- aber auch *in-silico*-Methoden sollen im Mittelpunkt der Untersuchungen stehen. Die Konzeption besteht aus zwei Schritten:

- a) Im ersten Assay werden die Wirkungen von Arzneimittelkandidaten auf die wichtigsten 7 Ionenkanäle des Herzens untersucht. Anschließend wird in Computersimulationen mit virtuell rekonstruierten menschlichen Herzmuskelzellen des Ventrikels getestet, ob sich proarrhythmische Marker finden lassen. Hierauf folgend wird die Relevanz der *in-silico*-Schlussfolgerungen durch die Bestimmung der elektrischen Aktivität von, aus menschlichen Stammzellen gewonnenen Herzmuskelzellen der Herzkammer verifiziert<sup>(48)</sup>.
- b) Nachgeschaltete Assays mit Herzmuskelzellen, die aus humanen Stammzellen entwickelt worden sind, sind dazu gedacht, die rekonstruierten *in-silico*-Ergebnisse durch reale elektrophysiologische Effekte zu bestätigen. Zusätzlich sollen sie mögliche Erkenntnislücken schließen, die durch elektrophysiologische Effekte aufgetreten sind<sup>(47, 49)</sup>.

Dafür werden derzeit *in-vitro*-Assays sowie *in-silico*-Modelle standardisiert und best practice-Protokolle für die Entwicklung der Herzmuskelzellen erstellt. Bis Dezember 2017 sollte die Validierung dieser Konzeption abgeschlossen sein<sup>(49)</sup>.

Angestrebt wird auch eine Revision der S7B Guideline<sup>(50)</sup>.

Die für die Prüfung von Arzneimitteln entwickelten Assays können auch Potenzial für die Beurteilung von kardialen Effekten bei chronischer wiederholter Exposition mit kosmetischen Inhaltsstoffen haben<sup>(9)</sup>.

### **Trotz neuer Konzepte: *in-vitro* wird mit Tierverbrauch und Tierversuchen kombiniert**

Die Hersteller nutzen schon neue Modelle, aber häufig auch noch „Tiermodelle“, wie eine Umfrage der Safety Pharmacology Society unter der pharmazeutischen Industrie aus Europa, Nordamerika und Asien ergab. Zwar ist der häufigste (75 %) präklinische Ansatz zum Testen auf Proarrhythmie die Durchführung einer Reihe von Bindungs- und Ionenkanal-Elektrophysiologie-Studien, jedoch kombiniert mit *in-vivo*-Sicherheitspharmakologie-Studien. Tierversuche mit implantierten Telemetriesystemen sind bei 88 % der Befragten sehr weit verbreitet. Selbst das Langendorff-Herz wird bei 38 % der Einrichtungen noch angefertigt. Die meisten der Befragten nutzen die Ionenkanaluntersuchungen, aber z. B. nur 46 % Tests mit Herzmuskelzellen aus induzierten pluripotenten Stammzellen. Nur 31 % integrieren bei ihren Studien auch Beobachtungen aus chemischen Struktur-Aktivitäts-Beziehungen und Toxikologie-Studienergebnisse, die bereits vorliegen sowie andere wissenschaftliche Überlegungen (z. B. Arzneimittelindikation, Wirkstoffklasse etc.<sup>(32)</sup>).

## **7. Innovative Zellkultursysteme zur genauen Messung von Funktionen in Herzzellen oder -geweben**

Um den herzscheidenden Effekt eines bereits auf dem Markt befindlichen Krebsmittels zu untersuchen, verwenden Forscher nach aktuellem Stand der Technik *in-vitro*-Methoden mit humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPSC), die z. B. bereits kommerziell erhältlich sind. Aber welche Qualität haben die Zellen?

Herzmuskelzellen, gewonnen aus hiPSC besitzen unausgereifte elektrophysiologische Eigenschaften. Daher haben Wissenschaftler der Universität Köln 2016 versucht, am Beispiel der Maus eine genaue Charakterisierung der elektrophysiologischen Eigenschaften der verschiedenen Entwicklungsstadien des Herzens und der Bereiche des Herzens vorzunehmen. Messungen ergaben signifikante Veränderungen in der Morphologie des Aktionspotenzials während der prä- und postnatalen Entwicklung, aber vor allem auch zwischen Vorhöfen und Ventrikeln. Demnach ließen sich auch Unterschiede zwischen *in-vitro*- und *in-vivo* entwickelten Herzen finden, die die Wissenschaftler auf die unterschiedlichen Bedingungen während der *in-vitro*-Differenzierung zurückführten<sup>(51)</sup>. 2016 gelang es Forschern im Rahmen des europäischen Projekts SEURAT-1, humane induzierte pluripotente Stammzellen in Herzmuskelzellen der Herzkammer zu differenzieren<sup>(52)</sup>.

Die aus hiPSC gewonnenen Zellen zeigen zumindest ähnliche Eigenschaften wie ursprüngliche Herzzellen und lassen sich hauptsächlich in Ventrikelzellen differenzieren. Einige Wissenschaftler bemängeln jedoch, dass die Zellen innerhalb einer Kultur von Anbieter zu Anbieter kein einheitliches Verhalten zeigen. Dadurch sei es schwierig, z. B. mathematische Modelle mit mehreren Ionenkanälen zu testen (persönliche Mitteilung). Standardisierte Zelltypen, die verwendet werden müssen, sind notwendig.

In den USA gibt jedoch auch Forscher, die mit z. B. Herzmuskelzellen aus mit NIH-geprüften Stammzellen arbeiten, die sowohl in Herzkammerzellen, als auch Atrium- und nodale Subtypen differenziert werden können<sup>(3)</sup>.

Im Jahr 2016 erhielten zwei mittelständische Unternehmen gemeinsam mit der Universität Leiden (Niederlande) im Rahmen des Förderprogramms EUROSTAR 2,2 Millionen Euro, um verbesserte Herzmuskelzellen aus induzierten pluripotenten Stammzellen sowie Screening-Plattformen zu entwickeln<sup>(53)</sup>.

All die kritischen Aspekte müssen in eine Standardisierung einfließen. Dazu gibt es einige Projekte der Innovative Medicine Initiative (IMI), eine Initiative zwischen der EU und der European Federation of Pharmaceutical Industries and Associations (EFPIA). Zu nennen ist hier z. B. die europäische Zellbank für induzierte pluripotente Stammzellen EBiSC, eine Plattform für induzierte pluripotente Stammzellen, die der Charakterisierung, Speicherung und weltweiten Verteilung von hochwertigen iPS-Zellen dienen soll<sup>(54)</sup>. Allein die IMI-Förderung beträgt mehr als 21 Millionen Euro. Ein weiteres Projekt ist STEMBANCC (Stem cells for biological assays of novel drugs and predictive toxicology)<sup>(55)</sup>. Das Projekt hatte allein ein IMI-Fördervolumen von 26 Millionen Euro. Ziel ist die Erzeugung und Charakterisierung von 1500 hochqualitativer humaner induzierter pluripotenter Stammzellen für Forscher, die damit Krankheiten erforschen und Arzneimittel-wirksamkeit testen können. Das Projekt lief im März 2018 aus.

Nicht nur Zellen werden verwendet, sondern auch Herzzellgewebe: In einer Validierungsstudie eines Pharmaherstellers wurde ein dreidimensionales Herzmikrogewebe getestet, das aus hiPSC-abgeleiteten Herzmuskelzellen, Endothelzellen und Fibroblasten des Herzens besteht. Die Herzmikrogewebe ermöglichen einen Hochdurchsatz. Die Mikroherzgewebe sind alle gleich groß, schlagen spontan und zeigen innen keinen sauerstoffunterversorgten Kernbereich. Mit den Mikroherzgeweben können die Einschränkungen der Einzelzellschichten (Monolayer) überwunden werden. Getestet wurden 29 auf die Ionenkanäle wirkende (ionotrope) und 13 nicht-ionotrope Substanzen. Das neu entwickelte Herzmikrogewebe erwies sich in Studien als geeignetes Modell, um Arzneimittel-induzierte Veränderungen in der Kontraktilität der Herzmuskelzellen zu beurteilen. In den Tests erwies sich das Modell als zu 80 % sensitiv und zu 91 % spezifisch<sup>(56)</sup>.

## Messplattformen für heterologe Systeme, Herzmuskelzellen und Zellsysteme

### Microelectrode-Arrays (MEAs)

Ein MEA-System besteht aus einem in das Micro-Array eingelassenes Elektrodengitter. Die äußerst kleinen Elektroden haben einen jeweiligen Durchmesser von ca. 30 Mikrometer. Auf dem Array werden die Herzzellen plattiert und das Microarray-System anschließend in einen Messverstärker eingesetzt. Das MEA-System misst hochspezifisch und sensitiv Spannungswerte, die durch die Zellen ausgelöst werden<sup>(57)</sup>.

Gegenüber der Patch-Clamp-Methode, die ebenfalls Spannungswerte messen, haben MEAs den Vorteil, dass sie im Hochdurchsatz eingesetzt werden können, leichter zu handhaben sind und mit verschiedenen elektrischen Beobachtungs- bzw. Aufzeichnungsgeräten verbunden werden können, um den Informationsoutput zu erweitern<sup>(58)</sup>.

Die Methode nutzt nicht nur serum-freie Medien (also keine wachstumsfördernden Zusätze aus tierischem oder menschlichem Blut), um die Messungen an Herzmuskelzellen zuverlässiger zu machen, sie lässt die Zellen auch geordnet in Reihen mit den Mikroelektroden wachsen, um zufällige Ausbreitungen elektrischer Impulse der Herzzellen zu vermeiden.

## xCELLigence-System

Das sogenannte xCELLigence RTCA (Real-time Cell Analyzer) Cardio Instrument ist von Roche, New Jersey, entwickelt worden<sup>(1)</sup>. Es hat das 96-well-Plattenformat, in das Elektroden eingebaut sind, die die Impedanz (Maß für die Kontraktion des Herzens) der Zellen und deren Änderung messen können. Bis dahin hatten die Forscher Herzzellen auf kleinen Mikroelektrodenarrays mit dem Teststoff behandelt und deren elektrische Feldpotenziale mit niedrigem Durchsatz gemessen, was für die Industrie nicht praktikabel war. Die Herzmuskelzellen, aus humanen pluripotenten Stammzellen (hiPSC) gewonnen, werden mit der Testsubstanz behandelt und dann die sogenannte Impedanz (Wechselstromwiderstand, bedingt durch die isolierende Eigenschaft der Plasmamembran der Zelle) in Echtzeit-überwachung gemessen. Das Verfahren ist nicht-invasiv. Es lassen sich damit toxikologische Effekte von Produkten und Inhaltsstoffen auf humane Herzzellen in Langzeittoxizitätstests untersuchen.

Das xCELLigence RTCA Cardio Instrument könne nach Ansicht von Roche<sup>(59)</sup> unter Umständen in Hochdurchsatzanwendungen eingesetzt werden, die direkt das funktionelle Wechselspiel der vielen Ionenkanäle berücksichtigen, die für die Herzmuskelfunktion eine Rolle spielen<sup>(1)</sup>.

Das Verfahren wurde vom Leiter der Sicherheitspharmakologie bei Bayer 2013 getestet<sup>(60)</sup>. Dafür wurden humane induzierte pluripotente Stammzellen (iCells™) von Cellular Dynamics Int. (CDI), Madison, WI, USA) und von embryonalen Stammzellen der Maus abgeleitete Cardiomyozyten (Cor.At™) von Axiogenesis zum Vergleich getestet. Heraus kam, dass humane und embryonale Stammzellen der Maus unterschiedlich auf die getesteten pharmazeutischen Substanzen reagieren und sogar gelegentlich Unterschiede bei der Herkunft dieser Zellen (von etablierten *in-vitro* oder *in-vivo*-Modellen) bestehen. Demnach konnten arzneimittelauslösende kardiotoxische Effekte mit diesem System detektiert werden, jedoch wurde zu dem Zeitpunkt die Vorhersagbarkeit oder der Wert der Übertragbarkeit der Ergebnisse als begrenzt und als noch nicht fest etabliert eingeschätzt<sup>(60)</sup>.

Der Pharmakonzern AstraZeneca hat inzwischen mit dem xCELLigence-System eine Validierungsstudie mit 49 Substanzen durchgeführt. Bei Verwendung von humanen induzierten pluripotenten Stammzellen war das xCELLigence Cardio-System in der Lage, 7 von 9 positiv-inotrope Substanzen (78 %) und 20 von 21 negativ-Inotrope (95 %) zu detektieren. Inotrope Substanzen beeinflussen die Kontraktionskraft des Herzens. Die Wissenschaftler bewerteten den hiPSC-CM-Impedanz-Assay als von ausgezeichneter Sensitivität, guter Prädiktivität und mit akzeptabler Spezifität bezogen auf ECVAM-Kriterien<sup>(61)</sup>. Der Test hat den Vorteil, dass er humanspezifisch ist und einen höheren Durchsatz erlaubt als der derzeitige Goldstandard des Unternehmens in diesem Bereich, dem CM optical Assay mit Herzmuskelzellen vom Hund<sup>(61, 62)</sup>.

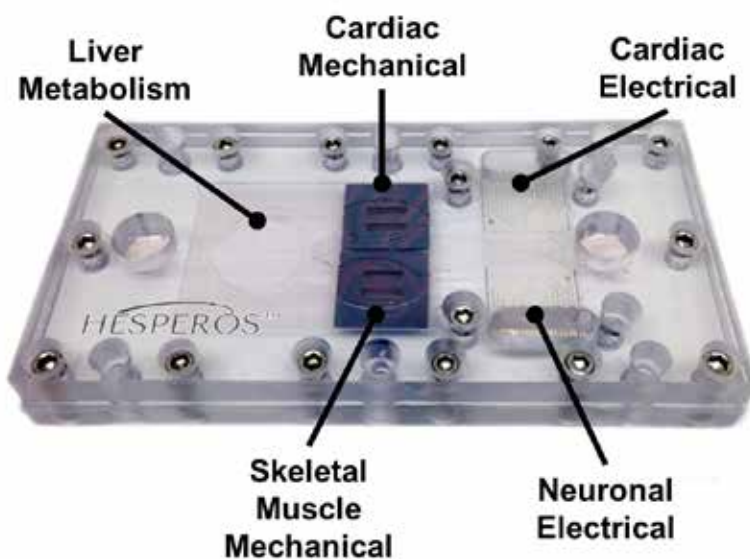
Das Verfahren ist auch für die Kosmetik interessant: Ein deutsches Forscherteam hat 5 bekannte kosmetische Substanzen auf Herzgiftigkeit getestet. Dafür verwendeten sie humane induzierte pluripotente Stammzellen in einem xCELLigence RTCA Cardio System und nahmen u.a. Impedanzmessungen vor. Sie konnten zeigen, dass unter serum-freien Bedingungen bei hohen Konzentrationen von drei Testsubstanzen strukturelle Schäden oder Fehlfunktionen des Herzschlages in den Herzmuskelzellen auftraten. Der Assay erwies sich als geeignet, das Humanrisiko für die Testsubstanzen abzuschätzen, wenn zusätzliche Biomonitoring-Daten verfügbar sind. Die Wissenschaftler betonen, dass das Verfahren noch validiert werden muss<sup>(21)</sup>.

## Mikrokavitäts-Chips

Bereits 2013 konnte die Forschergruppe um Prof. Andrea Robitzki vom Biotechnologisch-Bio-medinischen Zentrum der Universität Leipzig<sup>(63)</sup> neuartige 3D-Mikrokavitätenchips herstellen, um an humanen Herzmuskelzellen Impedanzmessungen und elektrophysiologische Messungen durchzuführen. Gemessen werden können Schlagfrequenz, Erregungsgeschwindigkeit und Aktionspotenzialdauer. Messungen von 2 D- oder 3D-Kulturen, in MEAS oder in 96/384 Well Plates sind möglich<sup>(52)</sup>. Integriert wurden ferner '-omics'-Technologien (Metabolomics, Transcriptomic, Epigenetics, Proteomics), statistische Modellierung und bioinformatische Ansätze. In Machbarkeitsstudien konnten Referenzsubstanzen für Arrhythmie erfolgreich getestet sowie weitere Parameter erhoben werden. Wie es damals hieß, habe sich das etablierte System als zweckmäßig erwiesen und werde nun für die Langzeitüberwachung von Toxizitätseffekten bei chronischer/ wiederholter Dosis eingesetzt<sup>(64, 65)</sup>. Bei dieser Gelegenheit hat das Teilprojekt NOTOX das lange vergessene Thema „serum-freie Medien“ aufgegriffen, um zu verhindern, dass es z. B. zu unerwünschten Proteinbindungen kommt.

## Cantilever-Chips

Die Chiptechnologie aus den USA besteht aus 32 mikroskopisch kleinen 32 Silizium-Freischwingern, den Cantilevern, die mit Herz- oder Muskelzellen bestückt werden können. Ein Laser- und Fotodetektorsystem dient der Aufzeichnung der zellulären Kontraktion an den Freischwingern, die durch die kleinste Zellbewegung in Biegung versetzt werden. Beeinflusst eine Testsubstanz eine Herzmuskelzelle, wird die Kontraktionsabweichung in Ausmaß, Zeit und Dauer genau erfasst<sup>(66)</sup>. Die Cantilever-Chips werden derzeit in Validierungsstudien in der pharmazeutischen Industrie eingesetzt.



*Abb. 9: 4-Organ-System mit integrierten bioMEMS-Geräten zur Messung der Gewebefunktion. Das System wurde von Hesperos Inc entwickelt. Die Plattform wird mit Leber-, Herzmuskel-, Skelettmuskelgewebe und Neuronen bestückt. Die Zellen und Gewebe werden in einem gemeinsamen serumfreien Medium verwendet.*

*Copyright: Hesperos Inc.*

In einem kombinierten Modell der Universität Central Florida werden über Multielektroden-Arrays die Spannungswerte der Zellen gemessen und mit dem Cantilever-Modell Stresskontraktionen der Herzmuskelzellen mit dem Photodiodenlaser- und -detektorsystem gemessen. Die Parameter, die gemessen werden können, sind u.a. spontane Schlagrate der Zellen, Leitungsgeschwindigkeit der Ionenkanäle, Länge des Aktionspotenzials oder des QT-Intervalls<sup>(3)</sup>.

## Celloptiq®

Diese Plattform von Clyde Biosciences mit Sitz in Maryland kann im Hochdurchsatz eingesetzt werden und unabhängig und gleichzeitig Spannung, Kalziumfluss (mit radiometrischer Färbetechnik gemessen) und Kontraktilität von 2D oder 3D Zellkulturen messen<sup>(67)</sup>.

## Zusätzliche Biomarkermessungen

Transkriptom- und Metabolomanalysen können zeigen, dass Testsubstanzen einen Einfluss auf die Mitochondrienfunktion ausüben<sup>(64, 68)</sup>. Forscher kombinierten hiPSC-CMs z. B. auf dem xCELLigence RTCA Cardio system mit Transkriptomanalysen, um die Genexpression nach Exposition der Zellen mit der Testsubstanz zu untersuchen<sup>(69)</sup>.

Gemessen werden kann auch z. B. die Troponinfreisetzung. Troponin ist seit langem ein klinischer Marker für die Schädigung des Herzmuskels, z. B. der linken Herzkammer<sup>(61)</sup>. Zudem konzentrierten sich die Forscher auf die Messung reaktiver Sauerstoffmoleküle mit einem Färbetest. Es gibt auch die Möglichkeit, einige Tyrosinkinase-Hemmungen (Hemmung der Signalübertragung) zu analysieren sowie Störungen des Zytoskeletts (F-Aktin) nachzuweisen<sup>(61)</sup>.

Zur Untersuchung zusätzlicher Metabolismus-Biomarker nutzte ein deutsches Forscherteam die NMR-basierte Spektroskopie für Hinweise auf Herzgiftigkeit und Myopathien<sup>(69)</sup>. Sie konnten so z. B. zeigen, dass Doxorubicin den Mitochondrienstoffwechsel in den Herzmuskelzellen beeinträchtigt<sup>(70)</sup>.

## In-silico-Methoden

Zur Vorhersage der Blockierung verschiedener Kanäle wie des hERG und des Ca<sup>2+</sup>, L-Typ haben Wissenschaftler Computermodelle entwickelt. Damit können sie die Interaktion der verschiedenen Kanäle beschreiben, um zu einer zutreffenderen Einschätzung einer QT-Verlängerung zu gelangen. Die Daten stammen aus *in-vitro*-Studien. Berücksichtigt werden ferner IC<sub>50</sub>-Werte von Tierversuchsstudien (inhibitory concentration ist ein Maß für die Effektivität eines Arzneimittels. Man misst die Konzentration eines Hemmstoffs, bei der 50 % der Arzneimittelwirkung aufgehoben sind) und physikalisch-chemische Eigenschaften der untersuchten Substanzen<sup>(44)</sup>.

Es gibt zudem das DEREK nexus Expertensystem zur Vorhersage der Hemmung des hERG-Kanals<sup>(9)</sup>. Das Modell basiert auf Ergebnissen von Patch Clamp-Untersuchungen mit ganzen Zellen verschiedener Zelltypen. Entwickelt wurde es von Lhasa Limited<sup>(71)</sup>. Das letzte Update war vom 1. Dezember 2017. Der Anerkennungsstatus 2010 war „optimiert“.

Eine formale Validierung war nicht notwendig<sup>(9)</sup>. Die Informationen fließen in die QSAR-Modelldatenbank des Joint Research Centers (JRC) ein, welche wiederum Informationen über die Validität von Modellen der quantitativen Struktur-Aktivitäts-Beziehungen (QSAR, siehe unten) liefert. Ziel ist es, valide QSARs zu finden, die bei der Bewertung von Chemikalien hilfreich sind<sup>(72)</sup>.

Aus SEURAT-1 war zusätzlich ein Kooperationsprojekt hervorgegangen: HeCaToS (Hepatic and Cardiac Toxicity Systems Modelling). Insgesamt 14 europäische Teilnehmer aus Wissenschaft und Industrie arbeiten an der Entwicklung eines *In-silico*-Tools zur Vorhersage toxischer Störungen auf Leber und Herz. Das Projekt läuft noch bis Oktober 2018<sup>(73)</sup>.



Eines der *in-silico*-Projekte ist das „Living Heart“-Projekt von Prof. Philipp Kügler vom Institut für Angewandte Mathematik und Statistik der Universität Hohenheim. Hiermit werden die Auswirkungen von Arzneimitteln auf die Herzfunktion simuliert.

Für die dreidimensionale Darstellung kooperiert er dabei mit der französischen Firma Dassault Systèmes<sup>(41)</sup>. Das Simulationsprojekt befindet sich noch in der Entwicklung. Die Daten für das Simulationsprogramm stammen unter anderem aus Medikamententests mit Herzmuskelzellen, die aus humanen induzierten pluripotenten Stammzellen gewonnen wurden. Noch sollen sich jedoch die aus Stammzellen gewonnenen Herzmuskelzellen<sup>(74)</sup> in bestimmten Eigenschaften von denen des echten Herzens unterscheiden. Die Zellen werden auf Elektrodenchips aufgetragen, die elektrischen Signale der Zellen aufgezeichnet und Differenzialgleichungen daraus erstellt. Die werden mit einer sogenannten Bifurkationsanalyse mit der Modellgleichung abgeglichen. Bei Abweichung wird die Modellgleichung an die *in-vitro*-Ergebnisse angepasst. Wenn die Ergebnisse aus seinem Modell für einzelne Zellen und Zellverbände durch Experimente bestätigt sind, werden sie von der Zellebene auf das gesamte Herz übertragen. Die pharmazeutische Industrie und die amerikanische FDA haben an dem Modell bereits Interesse gezeigt und testen das Programm bereits.

## QSAR-Modelle

Mittels der QSAR-Methoden wird versucht, zwischen der Struktur von Molekülen und deren Wirkungen (z. B. physikalisch, chemisch, pharmakologisch, biologisch) quantitative Beziehungen herzustellen, die sich in Zahlenverhältnissen ausdrücken lassen<sup>(75)</sup>.

Ein neueres Modell für die Prüfung zur Vorhersage von Ionenstromänderungen kombiniert *in-vitro*-Daten und physikalisch-chemische Informationen von Testsubstanzen. Es dient der Modellierung der Wechselwirkung von Ionenkanälen der Herzzellen und Arzneimitteln<sup>(76)</sup>.

## Ausblick

Die vorgesehenen Funktionsprüfungen, wie die Messung von Ionenströmen, Aktionspotential-Parametern und proarrhythmische Effektmessungen könnten nach heutigem Stand der Technik *in-vitro* durchgeführt werden.

Die Untersuchungen müssten allerdings mit der Ausgangssubstanz und mit den Metaboliten durchgeführt werden, wenn kein entsprechendes Lebergewebe, z. B. über einen zwei-Organ-Chip dabei ist, welches die Ausgangssubstanz in Metabolite umwandelt. Auch hier gibt es bereits Entwicklungen.

Letztliche telemetrische EGKs dagegen werden auch weiterhin am Tier (meist Hund) gemessen, weil sich der Einfluss des Blutflusses auf das Herz und mögliche andere Proarrhythmie-Parameter derzeit nicht simulieren lassen.

## Literatur

- (1) Roche Diagnostics (2011). Roche Diagnostics supports European Union's DETECTIVE Project to reduce Animal Testing. [online] Available at: <https://www.pressebox.com/pressrelease/roche-diagnostics-gmbh/Roche-Diagnostics-supports-European-Unions-DETECTIVE-Project-to-reduce-Animal-Testing/boxid/431272>. [3. März 2018]
- (2) Stancescu, M., Molnar, P., McAleer, C. W., McLamb, W., Long, C. J., Oleaga, C., Prot, J.-M. & Hickman, J. J. (2015): A phenotypic in vitro model for the main determinants of human whole heart function. *Biomaterials* 60: 20-30.
- (3) Wang, Y. I., Carmona, C., Hickman, J. J. and Shuler, M. L. (2017). Multiorgan Microphysiological Systems for Drug Development: Strategies, Advances, and Challenges. *Adv. Healthcare Mater.* 2017, 1701000.
- (4) Glasser, S. P. (ed.) (2014). *Essentials of Clinical Research*. 2. ed. Springer International Publishing Switzerland, pp. 111-112.
- (5) *Ärztblatt* (2010). Reductil: Rücknahme in Europa – Kontraindikationen in den USA. [online] Available at: <https://www.aerzteblatt.de/nachrichten/39765/Reductil-Ruecknahme-in-Europa-Kontraindikationen-in-den-USA> [3. März 2018]
- (6) Scott, C. W., Zhang, X., Abi-Gerges, N., Lamore, S. D., Abassi, Y. A. and Peters, M. F. (2014). An impedance-based cellular assay using human iPSC-derived cardiomyocytes to quantify modulators of cardiac contractility. *Toxicological Sciences* 142(2), pp. 331-338.
- (7) EMA (European Medicines Agency) (1997). ICH S6 (R1) Preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals. CHMP/ICH/731268/1998. [online] Available at: [http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/regulation/general/general\\_content\\_000954.jsp&mid=WC0b01ac0580029570](http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/regulation/general/general_content_000954.jsp&mid=WC0b01ac0580029570) [3. März 2018]
- (8) EMA (European Medicines Agency) (2010). Guideline on repeated dose toxicity. vom 18 March 2010, CPMP/SWP/1042/99 Rev 1, Corr\*. [online] Available at: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2010/03/WC500079536.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2010/03/WC500079536.pdf) [8. April 2018]
- (9) Adler, S., Basketter, D., Creton, S. et al. (2011): Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects—2010. *Arch Toxicol* 85: 367–485.
- (10) ICH (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use) (2009a): Nonclinical Evaluation for Anticancer Pharmaceuticals 59. 29. Oktober 2009.
- (11) EMA (European Medicine Agency) (2005): ICH Topic S7B. The nonclinical Evaluation of the Potential for delayed Ventricular Repolarization (QT Interval Prolongation) by Human Pharmaceuticals. CPMP/ICH/423/02. London.
- (12) Thews, G. und Vaupel, P. (2005). *Vegetative Physiologie*. 5th ed., Heidelberg-Springer, pp. 100-120.
- (13) *Gesundpedia* (2018). His-Bündel. [online] Available at <http://gesundpedia.de/His-B%C3%BCndel> [8. April 2018].
- (14) Husser, O. (2009). Regulation kardialer K<sup>+</sup>-Kanäle und deren Blockade im Modell der Tachykardie-induzierten Herzinsuffizienz. Dissertation, Universität Regensburg, pp. 10, 17-18.
- (15) Singh, J. N. and Sharma, S. S. (2011). hERG Potassium Channels in Drug Discovery and Development. In: Gupta, S. P. (ed.). *Ion Channels and Their Inhibitors*. Heidelberg, Springer, pp. 160-161.
- (16) DocCheck Flexikon (2018c). Torsade de Pointes. [online] Available at: <http://flexikon.doccheck.com/de/Torsade-de-Pointes-Tachykardie> [3. März 2018]
- (17) Rampe, D. & Brown, A. M. (2013): A history of the role of the hERG channel in cardiac risk assessment. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 68: 13–22.
- (18) ICH (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use) (2009b): Guidance on nonclinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials and Marketing Authorization for Pharmaceuticals M3(R2).
- (19) NC3Rs (National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research) (2018): Reducing the use of recovery animals. <https://www.nc3rs.org.uk/reducing-use-recovery-animals>
- (20) Barel, A. O., Paye, M & Maibach, H. I. (Hrsg. 2014): *Handbook of Cosmetic Science and Technology*. p. 653. CRC Press Taylor & Francis Group. Fourth Edition.
- (21) Chaudhari, U., Nemade, H. Sureshkumar, P., Vinken, M., Ates, G., Rogiers, V., Hescheler, J. Hengstler, J. G. and Sachinidis, A. (2018). Functional cardiotoxicity assessment of cosmetic compounds using human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Archives of Toxicology* 92, pp. 371–381.
- (22) Zuang, V., Barroso, J., Bremer, S., Casati, S., Ceridono, M., Coecke, S., Corvi, R., Eskes, C., Kinsner, A., Pellizzer, C. Prieto, P., Worth, A. and Kreysa, J. (2010). ECVAM Technical Report on the Status of Alternative Methods for Cosmetics Testing (2008-2009). A report prepared in the framework of Directive 2003/15/EC (7th Amendment to the Cosmetics Directive). European Commission, Joint Research Centre, Institute for Health and Consumer Protection. Ispra.
- (23) Biobide (2018). Cardiotox Assay. [online] Available at: [https://www.biobide.es/sites/default/files/pdf/CARDIOTOX%20AS-SAY\\_2017.pdf](https://www.biobide.es/sites/default/files/pdf/CARDIOTOX%20AS-SAY_2017.pdf) [Assessed 25 February 2018]
- (24) Prieto, P., Burton, J., Graepe, R., Price, A., Whelan, M. and Worth, A. (2014). EURL ECVAM strategy to replace, reduce and refine the use of animals in the assessment of acute mammalian systemic toxicity.
- (25) Toyoshima, S., Kanno, A., Kitayama, T., Sekiya, K., Nakai, K., Haruna, M., Mino, T., Miyazaki, H., Yano, K. and Yamamoto, K. (2005). QT PRODACT: In Vivo QT Assay in the Conscious Dog for Assessing the Potential for QT Interval Prolongation by Human Pharmaceuticals. *Journal of Pharmacology Sciences* 99, pp. 459 – 471.
- (26) DocCheck Flexikon (2018a). Solatol. [online] Available at: <http://flexikon.doccheck.com/de/Sotalol> [3. März 2018]
- (27) DocCheck Flexikon (2018b). Elektrokardiogramm. [online] Available at: <http://flexikon.doccheck.com/de/Elektrokardiogramm> [3. März 2018]
- (28) Ando, K., Hombro, T., Kanno, A., Ikeda, H., Imaizumi, M., Shimizu, N., Sakamoto, K., Kitani, S.-I, Yamamoto, Y., Hizume, S., Nakai, K., Kitayama, T. and Yamamoto, K. (2005). QT PRODACT: In Vivo QT Assay With a Conscious Monkey for Assessment of the Potential for Drug-Induced QT Interval Prolongation. *Journal of Pharmacological Sciences* 99: pp. 487 – 500.
- (29) Skrzypiec-Spring, M., Grotthus, B., Szeląg, A. and Schulz, R. (2007). Isolated heart perfusion according to Langendorff—Still viable in the new millennium. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 55, pp. 113–126.
- (30) Döring, H. J. (1990). The isolated perfused heart according to Langendorff technique-function-application. *Physiologica Bohemoslovaca* 39(6): 481-504.
- (31) Hamlin, R. L. (2007). Animal models of ventricular arrhythmias. *Pharmacology & Therapeutics* 113, pp. 276–295.

- (32) Authier, S., Pugsley, M. K., Koerner, J. E., Fermini, B., Redfern, W. S., Valentin, J.-P., Vargas, H. M., Leishman, D. J., Correll, K. and Curtis, M. J. (2017). Proarrhythmia liability assessment and the comprehensive in vitro Proarrhythmia Assay (CiPA): An industry survey on current practice. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 86, pp. 34–43.
- (33) Berridge, B. R., Hoffmann, P., Turk, J. R., Sellke, F., Gintant, G., Hirkaler, G., Dreher, K., Schultze, A. E., Walker, D., Edmunds, N., Halpern, W., Falls, J., Sanders, M. and Pettit, S. D. (2013). *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 65, pp. 38–46.
- (34) Hailey, J. R., Maleeff, B. E., Thomas, H. C., Pearse, G., Klapwijk, J. C., Cristofori, P. G., Berridge, B., Kimbrough, C. L., Parker, G. A., Morton, D., Elmore, S., Hardisty, J. F., Dybdal, N. O., Rehagen, D. A., Fikes, J. D., Lamb, M., Biddle, K., Buetow, B. S., Carreira, V., Nyska, A., Tripathi, N. K., Workman, H. C., Bienvenu, J. G., Brees, I., Turk, J. R. and Adler, R. R. (2017). A Diagnostic Approach for Rodent Progressive Cardiomyopathy and Like Lesions in Toxicology Studies up to 28 Days in the Sprague Dawley Rat (Part 1 of 2). *Toxicologic Pathology* 45(8), pp. 1055–1066.
- (35) Cross, M. J., Berridge, B. R., Clements, P. J., Cove-Smith, L., Force, T. L., Hoffmann, P., Holbrook, M., Lyon, A. R., Mellor, H. R., Norris, A. A., Pirmohamed, M., Tugwood, J. D., Sidaway, J. E. and Park, B. K. (2015). Physiological, pharmacological and toxicological considerations of drug-induced structural cardiac injury. *British Journal of Pharmacology, Review* 172(4), pp. 957–974.
- (36) Eimon, P. M. and Rubinstein, A. L. (2009). Die use of in vivo zebrafish assays in drug toxicity screening. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* 5 (4), pp. 393–401.
- (37) Kratz, J. M., Grienke, U., Scheel, O., Mann, S. A. and Rollinger, J. M. (2017). Natural products modulating the hERG channel: heartaches and hope. *Natural Product Reports* 34/8, pp. 957–980.
- (38) Molecular Devices (2018). Was ist die TEVC-Methode (Two Electrode Voltage-Clamp)? [online] Available at: <https://de.moleculardevices.com/what-two-electrode-voltage-clamp-tevc-method> [3. März 2018]
- (39) Wikipedia (2018). Patch-Clamp-Technik. [online] Available at: <https://de.wikipedia.org/wiki/Patch-Clamp-Technik> [3. März 2018]
- (40) MacKinnon, R. (2004). Potassium Channels and the Atomic Basis of Selective Ion conduction (Nobel Lecture). *Angew. Chem. Int. Ed.* 43: 4264–4277.
- (41) Universität Hohenheim (2017). Living Heart Project: Virtuelles Herz für bessere Medikamententests & weniger Tierversuche. [online] Available at: [https://www.uni-hohenheim.de/pressemitteilung?tx\\_ttnews%5Btt\\_news%5D=35393&cHash=1cfff49d7d72c10984f6530d2fbc2b0bb](https://www.uni-hohenheim.de/pressemitteilung?tx_ttnews%5Btt_news%5D=35393&cHash=1cfff49d7d72c10984f6530d2fbc2b0bb) [3. März 2018]
- (42) Dokmanovic, M., Kathryn E. King, Nishant Mohan, Yukinori Endo and Wen Jin Wu (2017). Cardiotoxicity of ErbB2-targeted therapies and its impact on drug development, a spotlight on trastuzumab, *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, DOI: 10.1080/17425255.2017.1337746
- (43) Chi, K. R. (2013). Revolution dawning in cardiotoxicity testing. *Nature Reviews Drug Discovery* 12/8, pp. 565–567.
- (44) Wiśniowska, B., Mendyk, A., Fijorek, K., Glinka, A. Polaka, S. (2012). Predictive model for L-type channel inhibition: multichannel block in QT prolongation risk assessment. *Journal of Applied Toxicology* 32/10, pp. 858–866.
- (45) Kettenhofen, R. & Bohlen, H. (2008). Preclinical assessment of cardiac toxicity. *Drug Discovery Today*. 13 (15–16): 702–707.
- (46) Stummann, T. C., Beilmann, M., Duker, G., Dumotier, B., Fredriksson, J. M., Jones, R. L., Hasiwa, M., Kang, Y. J., Mandenius, C.-F., Meyer, T., Minotti, G., Valentin, Y., J.-P., Zünkler, B. J. and Bremer, S. (2009). Report and Recommendations of the Workshop of the European Centre for the Validation of Alternative Methods for Drug-Induced Cardiotoxicity. *Cardiovascular Toxicology* 9: 107–125.
- (47) CiPA (2018). About CiPA. [online]. Available at: <http://cipaproject.org/about-cipa/> [3. März 2018]
- (48) Cavero, I. and Holzgreve, H. (2014). Comprehensive in vitro Proarrhythmia Assay, a novel in vitro/in silico paradigm to detect ventricular proarrhythmic liability: a visionary 21st century initiative. *Journal Expert Opinion on Drug Safety* 13/6, pp. 745–758.
- (49) Colatsky, T., Fermini, B., Gintant, G., Pierson, J. B., Sager, P., Sekino, Y., Strauss, D. G. and Stockbridge, N. (2016). The Comprehensive in Vitro Proarrhythmia Assay (CiPA) initiative — Update on progress. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 81, pp. 15–20.
- (50) Gintant, G. (2013). Further Considerations DRAFT (Is-is not-Theme) For Discussion of the Comprehensive in Vitro Proarrhythmia Assay Group. 19. August 2013. <http://cipaproject.org/wp-content/uploads/sites/24/2016/04/CiPA-What-it-IS-Is-Not.pdf>
- (51) Peinkofer, G., Burkert, K., Urban, K., Krausgrill, B., Hescheler, J., Saric, T. & Halbach, M. (2016). From early embryonic to adult stage: Comparative study of action potentials of native and pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Stem Cells and Development* 25(19), pp. 1397–1406.
- (52) Gocht, T & Schwarz, M. (eds.) (2016). The Blueprint for Future Safety Assessment of Chemicals. *Seurat-1, Part 4*. Paris.
- (53) Metrion. (2018). Metrion Biosciences and EU partners receive €2.2M funding award under Eurostars SME programme. [online] Available at: <http://www.metrionbiosciences.com/wp-content/uploads/2016/12/Metrion-Biosciences-Eurostars-Grant-press-release-21-03-2016-v2.pdf> [3. März 2018]
- (54) IMI (Innovatives Medicine Initiative). (2018b) <http://www.imi.europa.eu/projects-results/project-factsheets/ebisc>
- (55) IMI (Innovatives Medicine Initiative). (2018a). STEMBANCC. [online] Available at: <http://www.imi.europa.eu/projects-results/project-factsheets/stembancc> [3. März 2018]
- (56) Pointon, A., Pilling, J., Dorval, T., Wang, Y., Archer, C. and Pollard, C. (2017). High-Throughput Imaging of Cardiac Microtissues for the Assessment of Cardiac Contraction during Drug Discovery. *Toxicological Sciences* 155(2), pp. 444–457.
- (57) Reppel, M. and Hescheler, J. (2010). Pharmakologisches Screening unter Verwendung von aus humanen embryonalen Stammzellen abgeleiteten Kardiomyocyten. Abgeschlossenes Förderprojekt 039, 2006–2008. [http://www.stiftung-set.de/fileadmin/user\\_upload/herunterladen/Projekt-pdf/P039-Reppel.pdf](http://www.stiftung-set.de/fileadmin/user_upload/herunterladen/Projekt-pdf/P039-Reppel.pdf)
- (58) Natarajan, A., Stancescu, M., Dhir, V., Armstrong, C., Sommerhage, F., Hickman, J. J. and Molnar, P. (2011). Patterned Cardiomyocytes on Microelectrode Arrays as a Functional, High Information Content Drug Screening Platform. *Biomaterials* 32(18), pp. 4267–4274.
- (59) Roche Diagnostics Deutschland GmbH (2011). Risikobestimmung für medikamenteninduzierte Proarrhythmie mit dem xCELLigence RTCA Cardio Instrument von Roche und Kardiomyozyten aus pluripotenten Stammzellen. Pressemitteilung vom 22.07.2011, [online]. Available at: <https://www.pressebox.de/pressemitteilung/roche-diagnostics-gmbh/Risikobestimmung-fuer-medikamenteninduzierte-Proarrhythmie-mit-dem-xCELLigence-RTCA-Cardio-Instrument-von-Roche-und-Kardiomyozyten-aus-pluripotenten-Stammzellen/boxid/437141> [3. März 2018]

- (60) Himmel, H. H. (2013): Drug-induced functional cardiotoxicity screening in stem cell-derived human and mouse cardiomyocytes: Effects of reference compounds. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 68: 97–111.
- (61) Talbert, D. R., Doherty, K. R., Trusk, P. B., Moran, D. M., Shell, S. A. and Bacus, S. (2015). A Multi-parameter In Vitro Screen in Human Stem Cell-Derived Cardiomyocytes Identifies Ponatinib-Induced Structural and Functional Cardiac Toxicity. *Toxicological Sciences*, 143 (1), pp. 147–155.
- (62) IonOptix (2018). Cardiac Myocytes. [online] Available at: [http://www.ionoptix.com/application\\_notes/cardiac-myocytes/](http://www.ionoptix.com/application_notes/cardiac-myocytes/) [3. März 2018]
- (63) Universität Leipzig (2018). Research Projects. Etablierung einer Halbleitertechnologie für die Entwicklung von 3D-Mikro-kavitätenmultielektrodenarrays (MCA). [online] available at: [http://research.uni-leipzig.de/dmpt/e\\_proj\\_11.htm](http://research.uni-leipzig.de/dmpt/e_proj_11.htm) [accessed 12. März 2018].
- (64) Seurat-1 (2013). Towards the Replacement of in vivo Repeated Dose Systemic Toxicity Testing. *Toxicology in the 21st Century: Mechanism-driven Toxicology defines the safe dose. Volume 3.* France.
- (65) Jahnke H-G, Steel D, Fleischer S, Seidel D, Kurz R, et al. (2013) A Novel 3D Label-Free Monitoring System of hES-Derived Cardiomyocyte Clusters: A Step Forward to In Vitro Cardiotoxicity Testing. *PLoS ONE* 8(7): e68971. doi:10.1371/journal.pone.0068971
- (66) Smith, A., S., T., Long, C. J., McAleer, C., Bobbitt, N., Srinivasan, B. and Hickman, J. J. (2014). Utilization of Microscale Silicon Cantilevers to Assess Cellular Contractile Function In Vitro. *Journal of Visualized Experiments* 92. doi:10.3791/51866
- (67) Clyde Biosciences. (2018). Comparison of CelloPTIQ® to Standard CV Tox Assays. [online] Available at: <https://www.clydebio.com/technical/assay-comparison/> [3. März 2018].
- (68) Gocht, T & Schwarz, M. (2014). The Proof-of-concept Case Studies. *Seurat-1, Part 4.* Paris.
- (69) Chaudhari, U., Nemade, H., Wagh, V., Gaspar, J. A., Ellis, J. K., Srinivasan, S. P., Spitkovski, D., Nguemo, F., Louise, J., Bremer, S., Hescheler, J., Keun, H. C., Hengstler, J. G. and Sachinidis, A. (2016). Identification of genomic biomarkers for anthracycline-induced cardiotoxicity in human iPSC-derived cardiomyocytes: an in vitro repeated exposure toxicity approach for safety assessment. *Archives of Toxicology* 90/11, pp.2763-2777. <https://doi.org/10.1007/s00204-015-1623-5>
- (70) Chaudhari, U., Ellis, J. K., Wagh, V., Nemade, H., Hescheler, J., Keun, H. C. and Sachinidis, A. (2017). Metabolite signatures of doxorubicin induced toxicity in human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Amino Acids* 49, pp. 1955–1963.
- (71) Lhasa Limited (2018). Derek nexus. [online] Available at: <https://www.lhasalimited.org/Public/Library/2017/Derek%20Nexus%20HERG%20QMRF.pdf> [3. März 2018]
- (72) JCR (Joint Research Centre). (2018). Welcome to the JRC QSAR Model Database [online] Available at: <https://qsar.db.jrc.ec.europa.eu/qmrf/> [3. März 2018].
- (73) HECATOS (2018). Hecatos. [online] Available at: <http://www.hecatos.eu/news/press-release-for-the-start-of-the-hecatos-project> [3. März 2018]
- (74) Saxena, P., Hortigon-Vinagre, M. P., Beyl, S., Baburin, I., Andranovits, S., Iqbal, S. M., Costa, A., IJzerman, A. P., Kügler, P., Timin, E., Smith, G. L. and Hering, S. (2017). Correlation between human ether-a-go-gorelated gene channel inhibition and action potential prolongation. *British Journal of Pharmacology* 174, pp. 3081–3093.
- (75) Internetchemie.info (2018). QSAR Quantitative Structure Activity Relationship. [online] Available at: <http://www.internetchemie.info/chemie/qsar.php> [3. März 2018]
- (76) Wiśniowska, B., Mendyk, A., Szłęk, J., Kołaczkowski, M. and Polak, S. (2015). Enhanced QSAR models for drug-triggered inhibition of the main cardiac ion currents. *Journal of Applied Toxicology* 35(9), pp. 1030-1039.

## Anhang

Tab. 2:

Allgemeine toxikologische Langzeitstudiendauer (repeated-dose) nach ICH an Tieren im Vorfeld der klinischen Studien

Anwendungsdauer	Nagetiere	Nicht-Nagetiere
bis zu 14 Tage	14 Tage	14 Tage
14 Tage bis 6 Monate	6 Monate	6 Monate
länger als 6 Monate	6 Monate	9 Monate (EU akzeptiert 6-Monats-Studie)

Tab. 3:

Versuchstierstudien nach ICH in Abhängigkeit von einer beabsichtigten späteren Anwendungsdauer

Anwendungsdauer	Nagetiere	Nicht-Nagetiere
bis zu 14 Tage	1 Monat	1 Monat
14 Tage bis 1 Monat	3 Monate	3 Monate
1 Monat bis 3 Monate	6 Monate	6 Monate
länger als 3 Monate	6 Monate	9 Monate (EU akzeptiert 6-Monats-Studie)

Tab. 4:

## Vorgeschriebene Organtoxizitätsuntersuchungen für eine Chemikaliertestung nach OECD

OECD Testrichtlinie	Testdauer	Exposition	Versuchstiere	Mindestanzahl Tiere
407	28 Tage	oral	Ratte (Maus)	Wenigstens 5 Tiere pro Geschlecht und Konzentration zzgl. 1-2 Kontrollen = <b>40-50</b>
408	90 Tage	oral	Ratte (Maus)	je 10 von jedem Geschlecht und Konzentration zzgl. Kontrolle = <b>80</b>
409	90 Tage	oral	Hund	wenigstens 4 Tiere pro Geschlecht und Konzentration zzgl. Kontrolle = <b>36</b>
410	28 Tage	dermal	Ratte, Kaninchen, Meerschweinchen	Wenigstens 5 Tiere pro Geschlecht und Konzentration zzgl. Kontrolle = <b>40</b>
411	90 Tage	dermal	Ratte, Kaninchen, Meerschweinchen	Wenigstens 10 Tiere je Geschlecht und Dosis zzgl. Kontrolle = <b>80</b>
412	28 Tage (6 Stunden am Tag)	inhalativ	Ratte	Bei der Hauptstudie mindestens 5 Tiere pro Geschlecht und Konzentration zzgl. Kontrolle = <b>40</b>
413	90 Tage (6 Stunden am Tag)	inhalativ	Ratte	Hauptstudie: je 10 pro Geschlecht und Konzentration zzgl. Kontrolle = <b>80</b>
452	12 Monate oder länger	meist oral	Nagetiere, in bestimmten Fällen nicht-Nager	Nager: je 20 von jedem Geschlecht per Dosis zzgl. Kontrolle = <b>160</b> Nicht-Nager: je mindestens 4 pro Geschlecht und Dosis zzgl. Kontrolle = <b>36</b>

Wir freuen uns, dass Sie sich für unsere Arbeit interessieren. Um die Abschaffung des Tierversuchs zu erreichen, sind wir als gemeinnütziger Verein auf Ihre Mithilfe angewiesen.

Bitte unterstützen Sie unsere Arbeit mit einer Mitgliedschaft oder Spende.  
Vielen Dank!

## Tiere haben Rechte – wir fordern sie ein!

Trotz Tierschutzgesetz und Staatsziel Tierschutz leiden jeden Tag Millionen Tiere in Tierversuchen, in der industriellen Landwirtschaft, auf Transporten und Schlachthöfen. Hinzu kommen artwidrig gehaltene Haus- und Wildtiere in Privathaushalten, in Zoo und Zirkus, „Pelztiere“ und unzählige Tiere, die jährlich Opfer der Jagd werden. Um dieses millionenfache Leid zu beenden, setzen wir uns aktiv für den Ausstieg aus dem Tierversuch und der „Nutztier“-Haltung sowie gegen jeglichen Missbrauch von Tieren ein. Um diesen Systemwechsel einzuleiten, brauchen wir einen Masterplan für den Abbau von Tierversuchen und eine Kehrtwende in der Landwirtschaft von der tierischen zur pflanzlichen Eiweißproduktion. Unser langfristiges Ziel: Das Mensch-Tier-Verhältnis muss sich grundsätzlich ändern. Tiere haben ein Recht auf Leben, auf Freiheit und auf Unversehrtheit. Der Weg zur Anerkennung dieser Rechte ist beschwerlich – wir gehen ihn pragmatisch, schrittweise und konsequent.

Unterstützen Sie uns bei unserem Kampf für die Tiere! Werden Sie Mitglied oder unterstützen Sie unsere Arbeit durch eine Spende! Danke!



### BLEIBEN SIE INFORMIERT

Abonnieren Sie unter: [www.newsletter.tierrechte.de](http://www.newsletter.tierrechte.de) unseren Tierrechte-Newsletter und folgen Sie uns auf Facebook: [www.facebook.com/menschenfuertierrechte](http://www.facebook.com/menschenfuertierrechte)

### SPENDEN

Der Bundesverband ist seit über 30 Jahren als gemeinnützig und besonders förderungswürdig anerkannt. Spenden und Mitgliedsbeiträge sind steuerlich absetzbar.

Sparkasse Aachen  
IBAN DE02 3905 0000 0016 0079 73  
SWIFT-BIC AACSD33

### KONTAKT

Geschäftsstelle:  
Mühlenstr. 7a | 40699 Erkrath  
Tel. 0211 - 22 08 56 48 | Fax 0211 - 22 08 56 49  
[info@tierrechte.de](mailto:info@tierrechte.de) | [www.tierrechte.de](http://www.tierrechte.de)

 **Menschen für Tierrechte**  
Bundesverband der Tierversuchsgegner e. V.