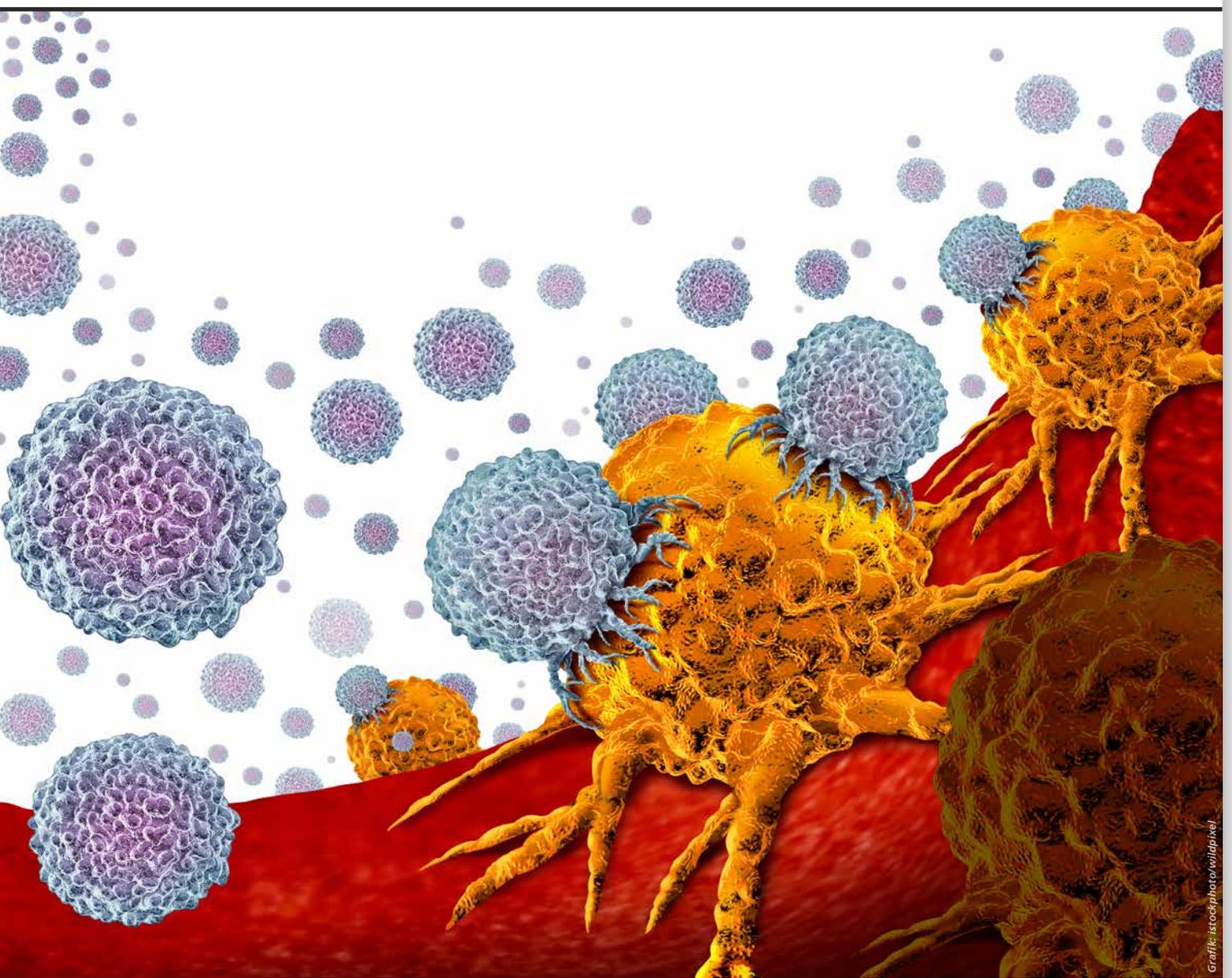


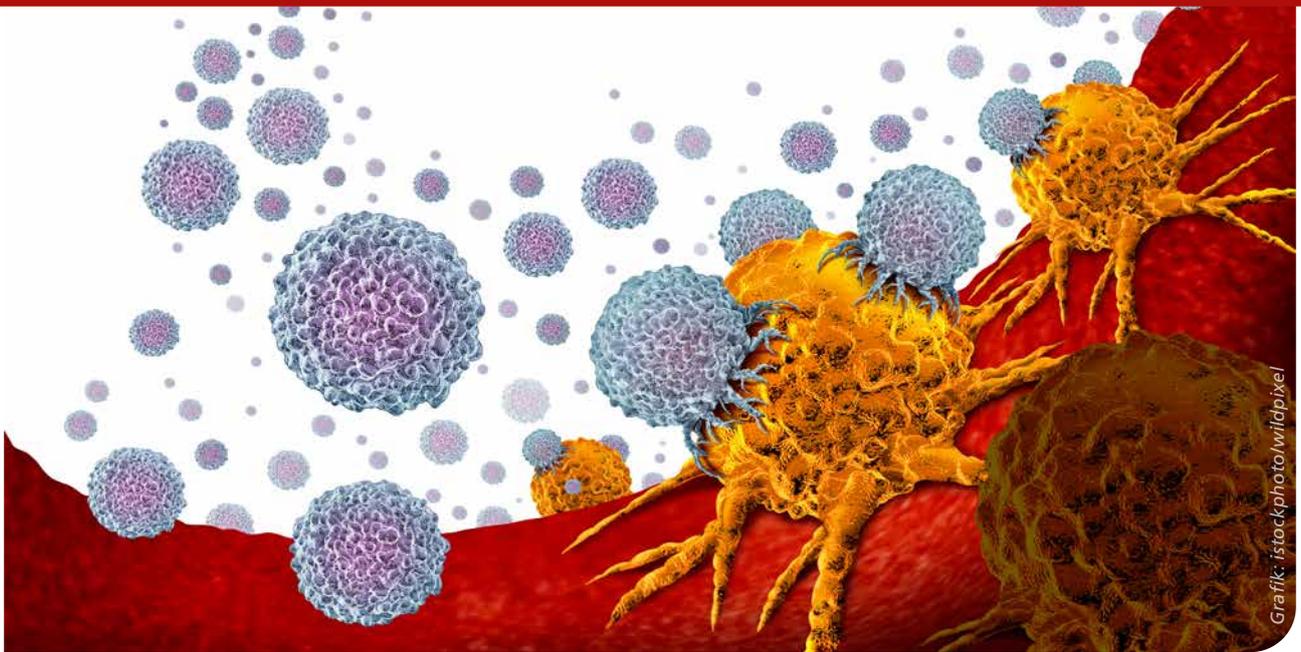
# Replacement des Jahres 2020



Tierversuche zur Untersuchung des Krebsrisikos (Karzinogenität)

# Inhalt

<b>Replacement des Jahres 2020: Tierversuche zur Untersuchung des Krebsrisikos (Karzinogenität)</b> .....	<b>3</b>
Zusammenfassung .....	3
<b>Einleitung, Problemstellung</b> .....	<b>4</b>
Genotoxizität, Mutagenität, Karzinogenität .....	5
Schrittweise Entstehung von Tumoren nach langer Latenzzeit .....	5
Gesetzliche Vorschriften .....	6
Tierversuchsfrei bedeutet nicht tierleidfrei .....	7
Rechtsgrundlagen .....	8
<b>Tierversuche zur Untersuchung in der Karzinogenität</b> .....	<b>8</b>
Pro Test mindestens 500 Tiere und mehr .....	9
Tägliche Vergiftung 24 Monate lang .....	9
Testhäufigkeit in Deutschland und Europa .....	10
<b>Kritik am Tierversuch</b> .....	<b>11</b>
Belastung .....	11
Reproduzierbarkeit .....	11
Die Reproduzierbarkeitskrise in der Krebsforschung – Gründe und Konsequenzen .....	11
Das RP: CB Projekt .....	12
Die Gründe mangelnder Nachvollziehbarkeit .....	12
Relevanz .....	12
<b>Alternativen zu Tiertests auf Karzinogenität</b> .....	<b>13</b>
Keine Zwei-Jahres-Karzinogenitätsstudie – Daten zur Pharmakologie, Genotoxizität und chronischen Toxizität reichen aus .....	14
<b>Ausblick</b> .....	<b>16</b>
<b>Literatur</b> .....	<b>18</b>
<b>Anhang</b> .....	<b>20</b>



## Replacement des Jahres 2020: Tierversuche zur Untersuchung des Krebsrisikos (Karzinogenität)

### Zusammenfassung

An dieser Stelle informieren wir über Karzinogenitätstests - Tests zur Feststellung, ob eine Substanz Krebs auslösen kann oder nicht. Das Wissen darüber ist notwendig, um Stoffe richtig zu klassifizieren, ihre Nutzung mit ihnen zu verbieten, sie einzuschränken oder zumindest Sicherheits- /Warnhinweise beim Umgang mit ihnen an die Hand zu geben. Beispiel: die Verwendung des Pestizids Linuron ist seit 2018 in der EU unter anderem wegen seiner karzinogenen Eigenschaften verboten.<sup>(1,2)</sup>

Bislang werden derartige Tests an Nagetieren durchgeführt. Seit einiger Zeit sind Regulationsbehörden, Industrie und Wissenschaft darin übereingekommen, dass die Tests am Tier nicht mehr zwingend notwendig sind – in erster Linie deshalb, weil zum Zeitpunkt des Beginns dieser Tests bereits ausreichend Informationen aus Tierversuchen über eine mögliche Krebsgefahr beim Menschen vorliegen. Jedoch ist die entsprechende Vorschrift noch immer nicht gestrichen worden und diese für das Tier zum großen Teil hochbelastenden Tests werden weiter durchgeführt.





*Angriffspunkt von chemischen Karzinogenen: die DNA*  
Grafik: Darwin Laganzon, Pixabay

## Einleitung, Problemstellung

Krebs ist eine der häufigsten ernsthaften Erkrankungen weltweit: Als Ursache für einen vorzeitigen Tod vor Vollendung des 65. Lebensjahrs steht Krebs mit fast 20% aller Fälle in Europa an zweiter Stelle.<sup>(3)</sup> Allein in Deutschland erlagen 2018 über 230.000 Menschen einem Krebsleiden<sup>(4)</sup>. Jedoch könnten rund 37 Prozent aller Neuerkrankungen vermeidbar oder zumindest beeinflussbar sein, sie betreffen Ursachen wie Tabakkonsum, Übergewicht, Bewegungsmangel und ausgiebiges Sonnenbaden.<sup>(5)</sup>

Tumore können jedoch auch genetisch bedingt sein oder durch ionisierende Strahlen, Viren oder chemische Substanzen (Stoffe oder Gemische) entstehen. Angriffspunkt ist die genetische Grundausstattung (Genom) der Zelle, die Desoxyribonukleinsäure (DNA). Auch der eigene Körper kann die DNA durch Basenverlust, Basenmodifikation oder DNA-Einzel- oder Doppelstrangbruch durch sogenannte reaktive Sauerstoffmoleküle, bspw. aus der Atmungskette, schädigen.

Pro Stunde kommt es in der Zelle allein zu 5.000 sogenannten DNA-Strangbrüchen, vermuten Forscher.<sup>(6)</sup> Allerdings repariert die Zelle im Normalfall derartige Fehler selbst, es sei denn, die eigenen Reparatursysteme funktionieren immer schlechter. Dies kann durch Vergiftungen, eine ausgiebige Exposition mit UV- oder ionisierenden Strahlen oder durch ein zunehmendes Alter verursacht werden. Möglicherweise sind die Reparatursysteme von einer Mutation betroffen.

In einem bestimmten Umfang könnten auch Umweltchemikalien eine Rolle spielen. Deshalb muss der Schutz der Gesundheit aller Personengruppen gewährleistet sein, die bei Produktion, Handel oder Umgang mit Chemikalien wie z. B. Pflanzenschutzmitteln oder deren Rückständen in Kontakt kommen können. Deshalb müssen diese für eine Zulassung auch auf ein mögliches krebsauslösendes Potenzial (Karzinogenität) hin getestet werden.<sup>(7)</sup>



*Darstellung der DNA-Helix mit DNA-Strangbruch*  
Grafik: PhonlamaiPhoto, iStockphoto

## Genotoxizität, Mutagenität, Karzinogenität

**Genotoxisch** sind Substanzen, die eine schädigende Wirkung auf das Genom haben. Sie können zu Mutationen führen oder die Fehlerrate bei der Verdopplung der DNA bei jeder Zellteilung erhöhen. Die Genotoxizität ist somit nicht notwendigerweise mit einer Mutagenität verbunden.<sup>(8)</sup>

Davon abzugrenzen ist die **Mutagenität**: Mutagene sind Stoffe oder Strahlung, die eine Veränderung in der DNA hervorrufen, welche zu einer Erbgutveränderung führt. Eine Mutation bedeutet jedoch (noch) keine Tumorbildung.

Ein **Karzinogen** (auch **Kanzerogen**) ist eine Substanz, die eine Zelle in eine Tumorzelle umwandeln kann, also tumorerzeugendes Potenzial hat.<sup>(9)</sup> Dies erfolgt durch Veränderung der DNA und dadurch bedingte Initiation der Tumorentwicklung. Aufgrund ihrer toxischen Wirkungen unterscheidet man zwischen genotoxischen und nicht-genotoxischen Kanzerogenen. Genotoxische Kanzerogene reagieren direkt mit der DNA der Zelle, wodurch es am Ende zu einer Mutation kommt. Nicht-genotoxische Substanzen wirken über sekundäre Mechanismen, die keine direkte Interaktion mit der DNA auslösen. Sie lösen keine kurzfristigen Mutationen in eukaryotischen und prokaryotischen Mutationstests aus und induzieren auch keine direkten DNA-Schäden im Zielorgan.<sup>(10)</sup> Sie können demnach über Genotoxizitätstests nicht erkannt werden. Nicht-genotoxische Karzinogene umfassen auch epigenetische Veränderungen. Sie reagieren z. B. auch mit Proteinen oder Immunzellen, wie es bei Asbest der Fall ist.<sup>(6,10)</sup>

Ein *Tumor* bedeutet zunächst einmal eine Wucherung oder Geschwulst durch vermehrte Zellteilung von Gewebe. Nur bösartige Tumoren bezeichnet man als *Krebs*. Ob die Wucherung gutartig (benigne), halbgutartig (semimaligne) oder bösartig (maligne) ist, hängt von ihrem Wachstumsverhalten ab.<sup>(11)</sup> Mit Ausnahme von Blutkrebs wachsen derartige Tumore aggressiv in das umliegende Gewebe ein und zerstören es.<sup>(12)</sup> Sie können außerdem Tochtergeschwülste in entfernteren Regionen des Körpers bilden, die Metastasen.

## Schrittweise Entstehung von Tumoren nach langer Latenzzeit

Kanzerogene Effekte treten meist lange Zeit nach der relevanten Exposition auf. Die Krebsentstehung erfolgt in den drei Etappen Tumorigenese, Tumorpromotion und Tumorprogression.<sup>(13)</sup>

Der erste Schritt zur Entartung von Zellen wird als *Initiation* bezeichnet. Einzelne, teilungsfähige Zellen (Stammzellen) mutieren. Es kommt zu einer irreversiblen, vererbaren Veränderung, die bei der Zellteilung an die Tochterzellen weitergegeben wird. Der DNA-Schaden wird von Zellgeneration zu Zellgeneration weitergereicht.<sup>(6)</sup>

Bei der *Promotion* wird der Prozess der Tumorentwicklung beschleunigt. Dabei wird die Selektion der tumorinitiierten Zellen gefördert. Es kommt zu sogenannten Präneoplasien – gutartigen Tumoren. Verletzungen, Entzündungsprozesse oder ein hormoneller Stimulus können diese Entwicklung fördern.<sup>(6)</sup>

Der letzte Schritt, die *Progression*, bedeutet die Umwandlung von zunächst gutartigen in bösartige Tumore. Dabei kommt es in den Zellen zu genetischen und phänotypischen Veränderungen. Fatal ist die Inaktivierung von solchen Genen, die für Reparaturenzyme kodieren. Mutationen häufen sich in den Zellen an. Es entstehen zunehmend aggressive Zellen, die unbegrenzt teilungsfähig sind. Der Stoffwechsel wird zugunsten der Tumornahrung umprogrammiert, es bilden sich Blutgefäße im Tumor, die ihn mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgen. Die Zellen werden unempfindlich gegen Angriffe des Immunsystems, der Mechanismus des programmierten Zelltodes (Apoptose) funktioniert nicht mehr. Es bilden sich Metastasen, die in andere Gewebe einwandern und dort ihrerseits ihr zerstörerisches Werk entfalten.<sup>(6)</sup>

## Gesetzliche Vorschriften

Regulatorische Anforderungen an die Prüfung der Kanzerogenität von Chemikalien variieren in Abhängigkeit von den Eigenschaften und den Produktionsmengen der Chemikalie. An erster Stelle stehen In-vitro-Genotoxizitätstests. Wenn diese positiv ausfallen, wird das Ergebnis in vivo überprüft und mit Tests an Säugetieren ergänzt.<sup>(10)</sup>

Genotoxizitätstest werden durchgeführt, um zu untersuchen, ob durch die Testsubstanz Gen-, Chromosomen oder Genommutationen ausgelöst werden.

### Genotoxizitätstest nach OECD

Nr.	OECD TG Nr.	Test	Beschreibung	in vitro/in vivo
1	471	Bacterial Reverse Mutation Test (Ames)	Bakterientest mit metabolischer Aktivierung (S9Mix) aus Rattenlebermikrosomen	In vitro (mit Tierorganverbrauch)
2	473	In Vitro Mammalian Chromosomal Aberration Test	Erkennen von strukturellen Chromosomenveränderungen in Zelllinien (CHO, V79 des Hamsters, Hamsterlungenzellen), Primärzellkulturen (humane oder Säuger-Lymphozyten), mit metabolischer Aktivierung (S9Mix) aus Rattenlebermikrosomen	In vitro (mit Tierorganverbrauch)
3	474	Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test	Erkennen von Chromosomenschäden oder Schäden des Spindelapparats durch Auftreten von Mikrokernen in der Interphase des Zellzyklus von Blutzellen	In vivo (Ratten, Maus)
4	475	Mammalian Bone Marrow Chromosomal Aberration Test	Erkennen von strukturellen Chromosomenveränderungen in Knochenmarkszellen	In vivo (Ratte, Maus, Hamster)
5	476	In Vitro Mammalian Cell Gene Mutation Tests using the Hprt and Xprt genes	Messen von Mutationen in HPRT and XPRT Gen (bestimmte Enzyme). Zelllinie V79 des chinesischen Hamsters, metabolische Aktivierung durch S9-Mix (Ratte).	In vitro (mit Tierorganverbrauch)
6	483	Mammalian Spermatogonial Chromosomal Aberration Test	Strukturelle Chromosomenveränderungen (Änderungen in Struktur und Anzahl der Chromosomen) in den Keimzellen	In vivo (Nagetiere)
7	485	Mouse Heritable Translocation Assay	Erkennen von strukturellen und/oder numerischen Chromosomenveränderungen bei der ersten Nachkommengeneration	In vivo (Maus)
8	486	Unscheduled DNA Synthesis (UDS) Test with Mammalian Liver Cells in vivo	Feststellen der außerplanmäßigen DNA-Synthese (UDS) in Leberzellen, die auf eine DNA-Schädigung und anschließende Reparatur in Leberzellen hindeutet.	In vivo (Ratte)
9	487	In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test (Zelllinien oder Lymphozyten)	Erkennen von Chromosomenschäden oder Schäden des Spindelapparats durch Auftreten von Mikrokernen in der Interphase des Zellzyklus	In vitro (mit Tierorganverbrauch)

Nr.	OECD TG Nr.	Test	Beschreibung	in vitro/in vivo
10	488	Transgenic Rodent Somatic and Germ Cell Gene Mutation Assays	Feststellung von Genmutationen in somatischen und Keimzellen	In vivo (Ratte oder Maus)
11	489	In Vivo Mammalian Alkaline Comet Assay	DNA-Strangbrüche in eukaryotischen Zellen oder Zellkernen	In vivo (Ratte)
12	490	In Vitro Mammalian Cell Gene Mutation Tests Using the Thymidine Kinase Gene (Zelllinien: Lymphomzellen der Maus L5178Y oder humane Lymphomzellen Tk6)	Feststellung von Genmutationen in Zelllinien, aber mit metabolischer Aktivierung (S9Mix) aus Rattenleber-mikrosomen	In vitro (mit Tierorganverbrauch)

Genmutationstests dienen der Feststellung, ob eine Veränderung an einem einzelnen Gen, z. B. ein Basenaustausch, Basenwegfall oder eine Einfügung einer einzelnen Base stattgefunden hat. Genommutationstests untersuchen Änderungen in der Gesamtheit aller Gene, z. B. die Anzahländerung aller Gene im Chromosomensatz.

## Tierversuchsfrei bedeutet nicht tierleidfrei

Zwölf verschiedene Tests können zur Untersuchung von DNA-Basenänderungen oder strukturellen/numerischen Chromosomenänderungen genutzt werden. Kein Verfahren kommt dabei ohne Tiere aus, auch wenn fünf Tests in vitro durchgeführt werden. Der Grund ist, dass mit Hilfe von Enzymen aus Rattenlebern (sogenannter S9-Mix) der Stoffwechsel in den Zellkulturen erst angekurbelt wird. In der Regel werden dafür Ratten mit der Substanz Arochlor 1254, die früher z. B. als Flammschutzmittel Verwendung fand, vergiftet. Danach werden die Tiere getötet und ihre Lebern zur Isolation eines Enzyms entnommen. Aus diesem Grund sind diese in vitro-Tests keine tierleidfreie Alternative.

Wenn die pro Jahr in Europa produzierte Chemikalienmenge 1000 Tonnen oder mehr beträgt, kann nach Anhang X der REACH-Verordnung im Verlauf der Chemikalienregistrierung der Registrant oder die europäische Chemikalienagentur (ECHA) eine Prüfung vorschlagen bzw. einfordern. Die ECHA fordert dies, wenn die produzierte Chemikalie weit verbreitet wird oder Hinweise auf häufige oder lang andauernde Expositionen von Menschen vorliegen. Ein weiterer Grund ist, wenn die Chemikalie bereits als keimzellmutagen der Kategorie 2 eingestuft wurde oder Langzeit-Tierstudien ergeben haben, dass der Stoff eine Vergrößerung eines Organs/Gewebes durch abnorme Zellvermehrung<sup>(14)</sup> bzw. eine mögliche oder gesicherte Vorstufe einer Krebserkrankung (Präneoplasie) hervorrufen kann. Wenn die Chemikalie dagegen bereits als keimzellmutagen der Kategorien 1A oder 1B eingestuft wurde, braucht keine Karzinogenitätsprüfung durchgeführt werden.

Bei der Arzneimittelentwicklung ist bislang eine Studie an Nagetieren durchzuführen, wenn es Hinweise aus vorhergehenden tierexperimentellen Giftigkeitsstudien und Humandaten gibt, dass die Substanz ein karzinogenes Potenzial haben kann. Die Tests wurden vor dem Hintergrund eingeführt, dass das Arzneimittel regelmäßig über wenigstens sechs Monate vom Patienten eingenommen wird.<sup>(15)</sup>

## Rechtsgrundlagen

Die rechtlichen Grundlagen für präklinische Tests an Tieren zur Chemikalienregulierung sind die REACH-Verordnung 1907/2006 sowie die Verordnung 1272/2008 zur Einstufung, Kennzeichnung und Verpackung von Stoffen und Gemischen.

Die Grundlagen für die Testdurchführungen bilden die OECD Testrichtlinie 451 (Carcinogenicity Studies)<sup>(16)</sup> und 453 (Combined Chronic Toxicity-Carcinogenicity Studies).<sup>(17)</sup> Auch bei der Arzneimittelentwicklung sind Tierversuche vorgesehen: Grundlagen sind die Richtlinien des International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH) S1A, S1B, S1C(R2) sowie S2 (R1).<sup>(15,18)</sup>

## Tierversuche zur Untersuchung der Karzinogenität

Karzinogenitätsstudien finden im Anschluss an alle anderen gesetzlich vorgeschriebenen Tierversuche statt. Ist der Prüfstoff ein Arzneimittel, so befindet sich der Prüfprozess dabei bereits am Ende der klinischen Phase 2.<sup>(19)</sup>

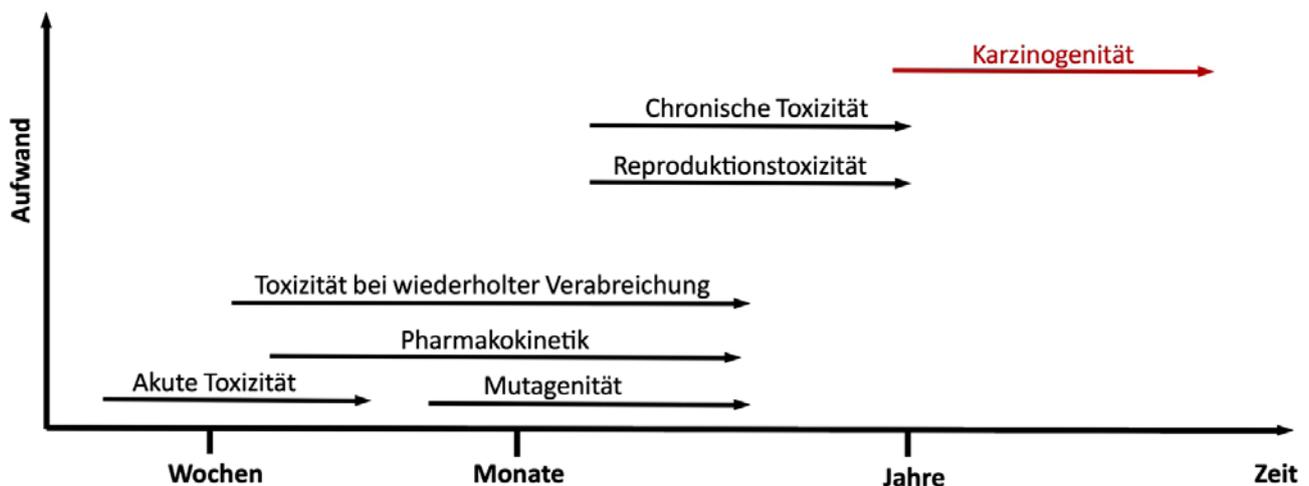


Abb. 1: Schema der Stufenstrategie von Toxizitätsprüfungen.  
In Anlehnung nach Aktories et al. (2009).<sup>(13)</sup>

Die Tierversuche dienen dem Nachweis von nicht-genotoxischen Karzinogenen (Erläuterung siehe Kasten Genotoxizität, Mutagenität, Karzinogenität).<sup>(10)</sup> Die bevorzugte Versuchstierspezies ist die Ratte, jedoch kann auch eine andere Nagetierart, z. B. die Maus, verwendet werden. Der Grund für die Verwendung dieser beiden Spezies ist ihre kurze Lebensspanne und ihre Anfälligkeit für Tumore.<sup>(16)</sup> Wenn sie zwei Jahre alt geworden sind, sind sie schon relativ alt, die Wahrscheinlichkeit steigt, dass die Tiere Krebs entwickeln. Deshalb laufen Karzinogenitätsstudien auch zwei Jahre. Wie bei anderen Säugetieren und dem Menschen auch altert dann das Immunsystem. Ein zusätzlicher Grund ist, dass die Tiere als Hauptspezies auch in anderen toxikologischen und pharmakologischen Studien verwendet werden und deshalb viele Informationen über die Physiologie und Pathologie vorliegen.<sup>(16)</sup>



*Albinoratte im Labor*  
Foto: Fotografixx, iStockphoto



*Mäuse in reizarmen Makrolonkäfigen*  
Foto: UnoL, iStockphoto

## Pro Test mindestens 500 Tiere und mehr

In den Karzinogenitätsstudien werden adulte Tiere eines gewöhnlichen Laborzuchtstammes beiderlei Geschlechts eingesetzt. Es gibt mindestens drei Dosisgruppen und eine Kontrollgruppe. Die Dosen richten sich nach den Ergebnissen der vorhergehenden Langzeit- oder aus Dosisfindungsstudien. In jeder Dosisgruppe sollen je 50 Tiere verwendet werden, d.h. es sind insgesamt mindestens 400-480 Tiere. Jedoch können zur Erhöhung der statistischen Aussagekraft gerade in den Gruppen der niedrigen Dosisgruppe mehr Tiere eingesetzt werden, und auch dann, wenn durch Todesfälle oder Entnahmen zur Nekropsie die Gruppengrößen nicht mehr vergleichbar sind. Es können auch noch zusätzlich sogenannte Sentinel-Tiere dazu kommen (in der Regel 5 Tiere pro Geschlecht). Sentinel-Tiere sind solche, die dem Zweck dienen, eventuell latent vorhandene Krankheitserreger in den eigentlichen Versuchstieren nachzuweisen.<sup>(20)</sup> So soll ausgeschlossen werden, dass ein Krankheitsphänomen auf eine andere Ursache als die Testsubstanz zurückgeführt werden kann.

## Tägliche Vergiftung 24 Monate lang

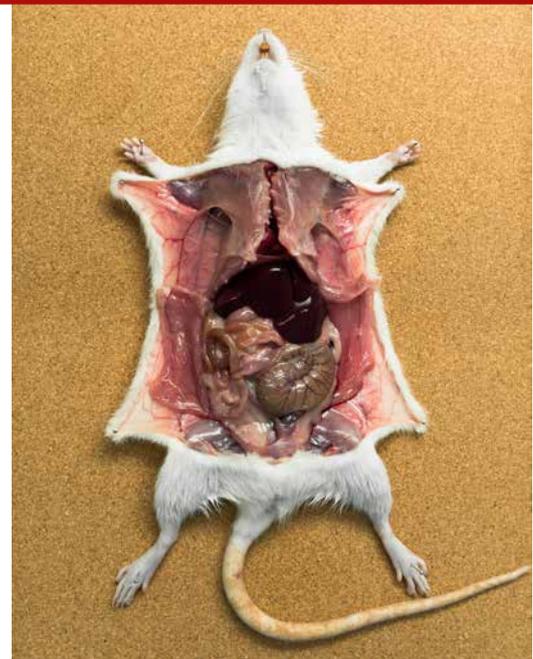
Die Ratten und/oder Mäuse müssen die Testsubstanz regelmäßig über einen Zeitraum von zwei Jahren schlucken, bekommen sie auf die Haut aufgetragen oder müssen sie einatmen, je nachdem, wie der Mensch mit dem Chemikalienprodukt später voraussichtlich in Berührung kommt (Exposition). Die häufigste Testroute ist jedoch oral (über den Mund). Die Gabe erfolgt sieben Tage die Woche täglich, bei oral zu verabreichenden Testsubstanzen über das Futter, Trinkwasser oder eine Schlundsonde.



*Einer Ratte wird die Substanz zwangsweise über eine Schlundsonde eingegeben.*  
Foto: Peta2

10 der Tiere pro Geschlecht und Dosisgruppe werden ggfs. schon nach einem Jahr getötet und auf neoplastische Veränderungen und mechanistische Informationen hin untersucht, wenn keine Daten aus vorherigen Langzeitstudien vorliegen. In diesem Fall müssen die Dosisgruppen entsprechend größer sein. Der Großteil wird jedoch nach 24 Monaten getötet, eine Nekropsie durchgeführt und überprüft, ob sich bei den Tieren gutartige oder bösartige Tumore entwickelt haben.<sup>(16)</sup>

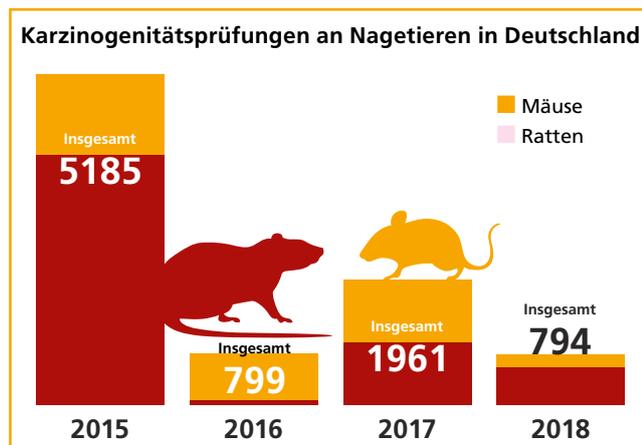
Ziel der Untersuchungen ist es, festzustellen, ob die Testsubstanz bei den Tieren zu einem erhöhten Auftreten von Neoplasien, einem erhöhten Anteil bösartiger Tumor-Neubildungen oder zu einer Verkürzung der Zeit bis zum Auftreten von derartigen Neubildungen im Vergleich zu den Kontrollgruppen geführt hat. Außerdem soll untersucht werden, in welchen Organen die Krebsentwicklung erfolgt und wann sie auftreten. Des Weiteren wird die Frage geklärt, ab welcher Dosis sich Neoplasien bilden und vor auch, wie hoch die Dosis sein kann, bei der es zu keiner Tumorentwicklung kommt (so genanntes no-observed-adverse-effect level, NOAEL).



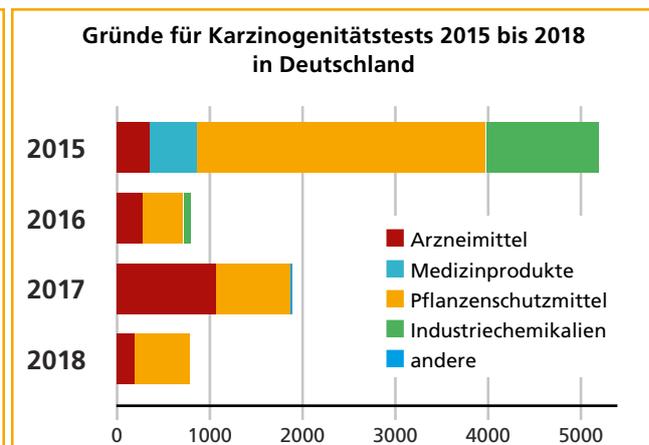
Ratte bereit für eine Nekropsie  
Foto: unoL, iStockphoto

## Testhäufigkeit in Deutschland und Europa

Die Karzinogenitätsprüfungen haben in Deutschland und Europa in den letzten Jahren abgenommen, sind aber nicht beendet worden.



Anzahl der Versuchstiere (Ratte und Maus) in Karzinogenitätsprüfungen der Jahre 2015-2018. Die Ratte ist die typische Versuchstierspezies. Insgesamt haben die Zahlen über die Jahre abgenommen, Karzinogenitätstests finden jedoch auch in Deutschland noch immer statt.



Karzinogenitätstests werden hauptsächlich zur Sicherheitsbewertung von Pflanzenschutzmitteln und Arzneimitteln durchgeführt.

Quelle: Versuchstierstatistiken BMEL

Während 2015 in Deutschland noch über 5.000 Versuchstiere in Karzinogenitätsstudien leiden mussten, hat ihre Zahl 2018 auf unter 1.000 Tiere abgenommen. Die Tests wurden zuletzt ausschließlich für die Herstellung von Arzneimitteln und Pflanzenschutzmitteln durchgeführt. Das sind die Produkte, bei denen der Endverbraucher den Stoff regelmäßig und langfristig aufnimmt.

EU-weit hat sich die Anzahl verwendeter Versuchstiere 2017 gegenüber 2015 auf 12.493 halbiert. Die europäischen Länder, die noch immer Karzinogenitätstests mit Versuchstieren durchführen, sind Deutschland, Frankreich, die Niederlande und das Vereinigte Königreich.

## Kritik am Tierversuch

Es gibt zahlreiche Kritik an den Tierversuchen, angefangen bei der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, über die Relevanz der Tierstudien bis hin zu ethischen Überlegungen, dass derartige schwerwiegende Tests und zweijährige, andauernde Behandlungen hoch belastend und in Hinblick auf die unzuverlässigen Ergebnisse und die Überflüssigkeit nicht gerechtfertigt sind.

### Belastung

Nach europäischer Tierversuchsrichtlinie Anhang VIII<sup>(11)</sup> kann der Belastungsgrad von Karzinogenitätsstudien von mittel bis schwer reichen, vor allem bei Induktion von Tumoren oder spontanen Tumoren, bei denen zu erwarten ist, dass sie eine fortschreitende tödliche Krankheit mit lang andauerndem mittelstarkem Schmerz, mittelschweren Ängsten oder Leiden verursachen. Dazu zählen beispielsweise Auszehrung (Kachexie) verursachende Tumore, invasive Knochentumore, metastasierende Tumore und Tumore, die bis zur Geschwürbildung (Ulzeration) belassen werden.

Tumorforschung ist also oft für die Tiere hochbelastend. Aus diesem Grund müssen bei der Projektplanung zwingend Abbruchkriterien berücksichtigt werden, bspw. eine bestimmte Tumorgroße, die für das Tier nicht mehr zumutbar ist. Wie an einem Fallbeispiel dargelegt<sup>(21)</sup>, betrug die Zeit in einem ersten Experiment 75 Tage, bis der Primärtumor diese Größe erreicht hatte. In dieser Zeit war er metastasiert, und diese Metastasen wurden erforscht. In der Replikation wuchs der Tumor plötzlich sehr viel schneller und hatte nach 45 Tagen seine kritische Größe erreicht – nicht genug Zeit, um ausreichend Metastasen zu bilden und das erste Experiment nachzuvollziehen. Hier handelt es sich also um eine biologische Variation, die auch vom sorgfältigsten Wissenschaftler nicht beeinflussbar ist.

### Reproduzierbarkeit

Auf der Verlässlichkeit publizierter Daten ruht der gesamte wissenschaftliche und medizinische Fortschritt. Die pharmazeutische Industrie verwendet die Erkenntnisse, um Kandidaten für mögliche Medikamente zu identifizieren und weiterzuentwickeln. Wenn, wie zum Beispiel im folgenden Fall, nur 21% der veröffentlichten Literatur komplett nachvollzogen werden können, endet dies in der Regel mit dem Abbruch des Projektes, da weitere Investitionen nicht begründet werden können.<sup>(22)</sup> Dies behindert die Medikamentenentwicklung, und bedeutet unnötigen Tierversuch. In der Krebsforschung ist die Reproduzierbarkeit besonders schlecht, zudem werden dort hochbelastende Tierversuche durchgeführt.

#### ***Die Reproduzierbarkeitskrise in der Krebsforschung – Gründe und Konsequenzen***

Bayer Health Care berichtete 2011 darüber, dass überraschend häufig Schlüsselergebnisse publizierter wissenschaftlicher Artikel, 70% aus der Krebsforschung, in ihrem Haus nicht nachvollzogen werden konnten. Dieser Eindruck wurde ein Jahr später durch eine systematische Studie der Firma Amgen bestätigt, die von 53 veröffentlichten Studien nur knapp 7% reproduzieren konnte – in 47 Fällen gelang dies NICHT. Was bedeutet das für Wissenschaft, Medizin und, nicht zuletzt, die Versuchstiere?

### **Das RP: CB Projekt**

Das Reproducibility Project: Cancer Biology wurde in Reaktion auf diese erschreckenden Befunde 2013 gegründet mit dem Ziel, insgesamt 50 Krebsstudien mit größtmöglicher Sorgfalt nachzustellen und auf ihre Nachvollziehbarkeit zu überprüfen. Es gilt, die Ursachen mangelnder Reproduzierbarkeit zu erforschen und wenn möglich, zu eliminieren. Die Autoren der Originalveröffentlichungen wurden gebeten, die ursprünglichen Reagenzien zur Verfügung zu stellen und Details ihrer Methoden preiszugeben. Die Ergebnisse der ersten 5 Studien wurden 2017 veröffentlicht<sup>(24)</sup> und ergaben ein durchwachsendes Bild. Von fünf Studien konnten nur zwei die Ergebnisse der Vorstudien nachvollziehen. Eine war nicht reproduzierbar, und zwei Wiederholungsversuche wurden als „nicht interpretierbar“ eingestuft.<sup>(25)</sup> Andere Forscher<sup>(26)</sup> konnten vier von fünf Studien nicht reproduzieren, was den Ergebnissen der Amgen-Studie schon sehr nahekommt.<sup>(27)</sup>

### **Die Gründe mangelnder Nachvollziehbarkeit**

Diese Gründe kann man in allgemeine (die für die gesamte Forschung zutreffen) und solche, die spezifisch für die Tumorforschung sind, einteilen. Wissenschaftler der University of Texas führten dazu eine ausführliche Umfrage durch.<sup>(28)</sup> Danach gaben fast 55% aller Forscher an, dass sie schon einmal Ergebnisse einer wissenschaftlichen Arbeit nicht hatten nachvollziehen können. Die Mehrzahl (fast 80%) suchten daraufhin Hilfe bei den Originalautoren. Von diesen antworteten knapp 40% auf kooperative Weise, aber die Mehrheit der Angefragten reagierte unkooperativ oder überhaupt nicht. Dies ist insofern skandalös, als der Wissenschaftler für seine Arbeit und Ergebnisse natürlich verantwortlich ist und dafür zu sorgen hat, dass nachfolgende Studien darauf aufbauen können.

Interne Abhängigkeiten sind ein weiteres Problem: In der Arbeitsgruppe eines Professors werden sich Mitarbeiter eventuell hüten, die Ergebnisse ihres Vorgesetzten in Frage zu stellen, auch wenn ihre eigenen Daten diese Hypothesen nicht untermauern. Der erhebliche Publikationsdruck tut ein Übriges, sodass Daten veröffentlicht werden, auch wenn der Autor selber nicht wirklich von der Validität seiner Daten überzeugt ist. Auf diese Weise können z. B. durch Gruppendruck regelrechte „wissenschaftliche Mythen“ entstehen.

Nun muss man der Forschung zugutehalten, dass kein Paper, das komplexe Sachverhalte behandelt und mehrere Ergebnisse präsentiert, zu 100% replizierbar ist. Dafür ist die Biologie (der Zellen bzw. der Versuchstiere) zu komplex und zu stör anfällig. Eine solche Rate wie sie sich hier abzeichnet ist allerdings völlig inakzeptabel. Wie oben dargelegt, liegt dies speziell in der Krebsforschung nicht nur an mangelnder Durchführung und dem Publikationszwang, sondern könnte biologische Gründe haben, die eventuell nicht kontrollierbar sind. Sollte dies der Fall sein, braucht die Krebsforschung völlig neue Methodologien.

## **Relevanz**

Evolution findet auch im Labor statt.<sup>(26)</sup> Tiere, Zellen und Tumorzellen verändern sich fortlaufend in ihrer genetischen Ausstattung, die Zellen mutieren. Da die Mutationen sich gegenseitig beeinflussen und aufeinander aufbauen können, ist es möglich, dass sich ein Tumor in einem Tier bzw. zu einem bestimmten Zeitpunkt völlig anders entwickelt als in einem anderen Tier oder zu einem anderen Zeitpunkt. Demnach wäre also eine schlechte Reproduzierbarkeit in der Krebsforschung in gewisser Weise „intrinsisch“ und auch nicht beeinflussbar. Im Tierversuch werden den Tieren z. B. Krebszellen injiziert, die (ursprünglich) alle genetisch identisch sind. Je länger der Tumor wächst, desto weiter wird er sich in seiner genetischen

Ausstattung und seinen Eigenschaften von den Tumoren in den anderen Tieren entfernen. Dies könnte eine mögliche Erklärung dafür sein, dass in den oben erwähnten neueren Studien des RP: CB die drei Zellkulturstudien, aber nicht der Tierversuch reproduzierbar waren; die Zellkulturversuche dauerten Minuten bis Stunden; der Tierversuch in diesem Fall zwei Monate. Die Relevanz derartiger Ergebnisse für die menschliche Situation lässt sich zumindest in Frage stellen.

## Alternativen zu Tiertests auf Karzinogenität

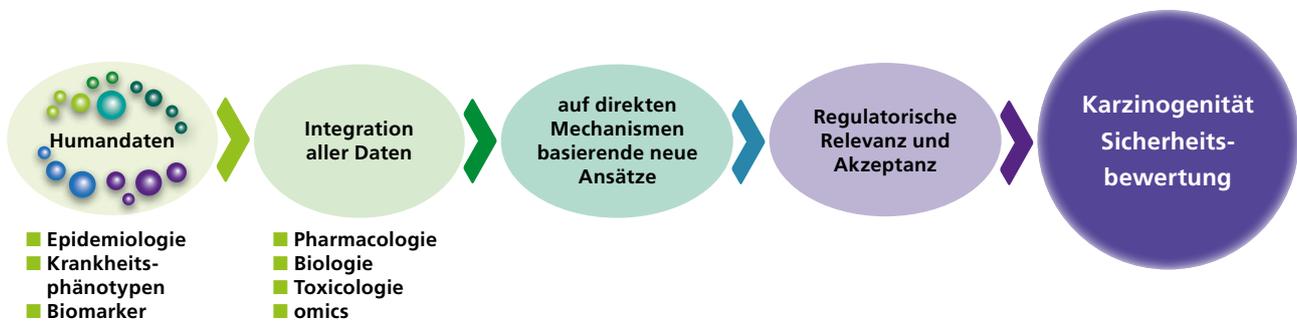
**Gibt es eine andere Möglichkeit, Karzinogenität festzustellen, ohne Tierversuche durchführen zu müssen?**

Lange Zeit scheiterte die in vitro-Testung bereits bekannter Kanzerogene daran, dass diese Substanzen im Organismus einen Prozess der metabolischen Aktivierung durchlaufen, was die frühen in vitro-Tests nicht nachvollziehen konnten. Ein früher Durchbruch bereits in den späten 1960er Jahren war der AMES-Test, mit dem erstmals eine verlässliche Korrelation zwischen Mutagenität in vitro und Karzinogenität in vivo hergestellt werden konnte<sup>(28)</sup> Diesen Bakterienkulturen werden jedoch Enzyme aus der Rattenleber beigefügt, um den Fremdstoffmetabolismus anzukurbeln.

Von 2006 bis 2012 hatte die EU das Projekt CarcinoGENOMICS im 6. Rahmenwerkprogramm mit mehr als 10 Millionen Euro finanziert. Ziel war es, mit einer Reihe von Mechanismus-basierten in vitro-Tests als Alternative zu Tests auf Genotoxizität und Karzinogenität an Nagetieren das karzinogene Potenzial von Chemikalien bewertet zu können. Mit den in vitro-Modellen sollten vor allem die Reaktionen der Organe Leber, Lunge und Niere simuliert werden. Eine Rolle spielten die sogenannten „omics“-Technologien. In der Toxikologie werden derartige ‚omics-Methodologien‘ z. B. verwendet, um Substanzen zu bewerten, die Änderungen im gesamten Genom induzieren, die letztlich zu einer Entwicklung schädlicher Wirkungen führen können.<sup>(29)</sup> Zu den omics-Technologien gehören die Genomik, die Proteomik und die Metabolomik. Während es in der Genomik um die Gesamtheit der Gene von Zellen oder Lebewesen geht, untersucht die Proteomik die Gesamtheit der Proteine und die Transkriptomik die aktiven Gene.<sup>(30)</sup> Bei der Prüfung auf stoffinduzierte Wirkungen können die omics-Daten für Stoffklassenvergleiche, Vorhersagen oder Entdeckungen verwendet werden.<sup>(29)</sup> Es sollten phänotypische Marker gefunden werden, Veränderungen in Genexpression und Stoffwechselprofilen sowie Wege identifiziert werden, um Mechanismen der chemischen Kanzerogenese vorherzusagen. Die gewonnenen transkriptomischen und metabolomischen Daten sollten in ein silico-Modell der chemischen Kanzerogenese integriert werden.<sup>(31)</sup>

Wissenschaftler\*innen der Tierärztlichen Hochschule Hannover haben 2016 drei bereits umfassend evaluierte Testsysteme (den BALB/c 3T3-Zelltransformationsassay, der Bhas 42-Zelltransformationsassay und den Embryoassay des syrischen Hamsters) auf ihre Eignung zum Ersatz von Karzinogenitätsstudien an Nagetieren hin untersucht. Nach Ansicht der Forscher\*innen können sie nicht-genotoxische Karzinogene identifizieren und stellen eine nützliche Ergänzung zu den In vitro-Genotoxizitätstestbatterien dar (siehe oben). Zumindest können sie Tierversuche stark reduzieren, weil sie Chemikalien vorauswählen können, die überhaupt einem In vivo-Karzinogenitätstest unterzogen werden müssen.<sup>(32)</sup> Die europäische Validierungsbehörde EURL-ECVAM hat zwei in vitro-Methoden mit Syrischen Hamsterembryo (SHE)-Zellen mit einer Maus-Fibroblasten-Zelllinie namens BALB/c 3T3 validiert. Sie sind in die OECD Testrichtlinien auf der Seite Series on Testing and Assessment unter den Nummern

214 (aus 2015) und 231 (aus 2016) zu finden.<sup>(33)</sup> EURL-EVCAM empfiehlt, die Zelltransmutations-Assays, obwohl sie anscheinend relevante Informationen über das Umwandlungspotenzial von Chemikalien liefern können, nicht als eigenständige Methoden zu verwenden, sondern immer in Kombination mit anderen ergänzenden Informationsquellen im Rahmen eines Beweiskraftverfahrens (Weight of Evidence-Ansatzes) oder einer integrierten Teststrategie einzusetzen.<sup>(34)</sup>



*Die Integration von Daten, neuen Technologieanwendungen und Ansätzen in einem abgestuften Testsystem soll eine bessere Sicherheitsbewertung von Arzneimitteln und Chemikalien ermöglichen.  
Grafik: Corvi et al. 2017. Toxicology In Vitro. (CC BY-SA 4.0)*

Es gibt zudem Entwicklungen, so z. B. eine in vitro-Methode, mit der Karzinogene in menschlichen Zellkulturen identifiziert werden können. Es handelt sich um eine Kultur mit lymphoblastoiden Zellen. Lymphoblastoide Zelllinien sind genetisch stabil und dienen als Ersatz für isolierte oder kryokonservierte periphere Lymphozyten aus dem Blut.<sup>(35)</sup> In einer fünfjährigen Forschungsarbeit haben Wissenschaftler\*innen der Swansea-University in Wales unter Prof. Gareth Jenkins und Prof. Shareen Doakin derartige lymphoblastoide Zellen (TK6<sup>(36)</sup> und MCL-5<sup>(37)</sup>) mit acht bekannten Karzinogenen getestet und dabei zuverlässige Ergebnisse erzielt. Untersucht wurden Chromosomenschäden, Zellsignale, Zellmorphologie, Zellzyklus-Dynamik und bioenergetische Störungen. Veränderungen der Zellmorphologie und der Genexpression haben sich als besonders geeignet für die Identifizierung von Umweltkarzinogenen erwiesen.<sup>(38)</sup> Der Ansatz kann sowohl zum Nachweis genotoxischer als auch nicht-genotoxischer Karzinogene verwendet werden. Allerdings können immer noch Fragen darüber aufkommen, ob sie wirklich repräsentativ für komplexe menschliche Organe und Systeme sein können. Deshalb wollen die Wissenschaftler\*innen den Test mit Hilfe von 3D-Modellen der menschlichen Leber, Haut und Lunge so anpassen, dass er die menschliche Physiologie besser imitiert.<sup>(39)</sup>

Der Test könnte den Autoren zufolge genügend Informationen liefern, um den zweijährigen Nagetier-Karzinogenitätstest für Nicht-Arzneimittel ersetzen oder den Einsatz von Tieren in diesem Bereich zumindest reduzieren.

## **Keine Zwei-Jahres-Karzinogenitätsstudie – Daten zur Pharmakologie, Genotoxizität und chronischen Toxizität reichen aus**

Es gibt neben ethischen und konsequenten politischen Bedenken gegenüber Tierversuchen auch praktische Bedürfnisse für einen anderen Ansatz als den Karzinogenitätstest am Tier.<sup>(40)</sup> Dadurch zeigten sich die ECHA und diverse Stakeholder in einem Workshopreport 2017 davon überzeugt, dass in vitro-Genotoxizitätstests und der drei- oder sechsmonatige subchronische Toxizitätstest an Ratten genügend Daten zur Bewertung des Karzinogenitätsrisikos von Chemikalien liefern kann. Hierdurch könne auf die zweijährige Studie an Ratten verzichtet werden.<sup>(41)</sup>

Amerikas führende pharmazeutische Forschungsunternehmen (PhRMA), die amerikanische Food and Drug Administration (FDA), die Japan Pharmaceutical Manufacturers Association (JPMA) sowie die Europäische Union haben in den letzten Jahren eine Vielzahl an Datensätzen rückblickend analysiert. Sie schlussfolgerten, dass auf der Grundlage von Informationen zur Pharmakologie, Genotoxizität und chronischen Toxizität (die bei der Entwicklung eines neuen Arzneimittels in der Regel am Ende der Phase 2 vorliegen) das Ergebnis einer 2-Jahres-Studie zur Kanzerogenität an Ratten mit hinreichender Sicherheit vorausgesagt werden kann. Eine negative Histopathologie aus einer chronischen Rattenstudie zusammen mit einem negativen Ergebnis der Genotoxizität und einem negativen Nachweis eines hormonellen Mechanismus könne mit 82%iger Genauigkeit ein negatives Ergebnis der 2-Jahres-Studie zur Kanzerogenität dieser Verbindungen bei Ratten vorhersagen. Dies träfe jedoch nur auf etwa 30-40% der Verbindungen zu.<sup>(19)</sup> Eine Bewertung der Karzinogenität, ohne eine 2-Jahres-Kanzerogenitätsstudie an Ratten durchzuführen, könne daher nur für bestimmte Pharmazeutika vorgenommen werden. Dies gelte nicht für biotechnologisch hergestellte Arzneimittel, die dem ICH S6(R1)-Leitfaden folgen.<sup>(16)</sup>

Auch die European Medicines Agency (EMA) ist dieser Information zugänglich, ein Verzicht könnte möglich sein: Ein sogenannter „Regulatorischer Hinweis auf Änderungen der Kernrichtlinie ICH S1 zur Prüfung der Karzinogenität von Arzneimitteln in Nagetieren“ (EMA/CHMP/ICH/536328/2013 Rev. 1) befasst sich vorsichtig mit einem möglichen Verzicht auf diese Tierstudien. Eine ICH S1-Expertenarbeitsgruppe (S1 EWG) hat Datensätze ausgewertet und den Schluss gezogen, dass die Kenntnis pharmakologischer Informationen zusammen mit toxikologischen und anderen Daten in bestimmten Fällen ausreichende Informationen liefern kann, um das Ergebnis von zweijährigen Rattenkarzinogenitätsstudien und ihren potenziellen Wert für die Vorhersage des Risikos der menschlichen Karzinogenität eines bestimmten Arzneimittels vorherzusagen.<sup>(42)</sup> Der regulatorische Hinweis wurde am 25. Februar 2016 angenommen.

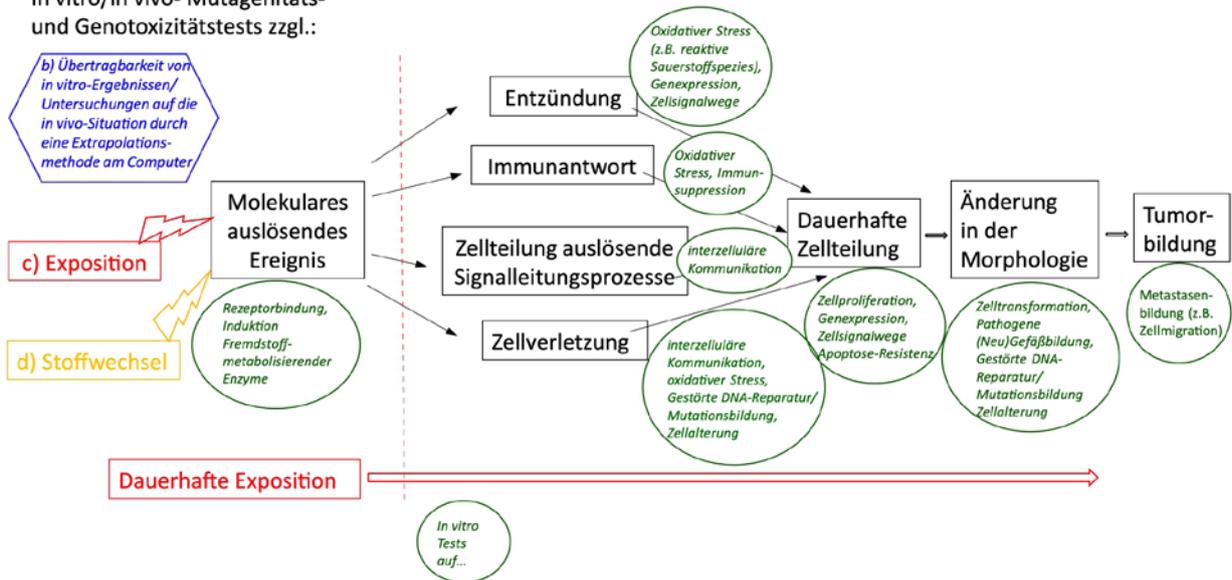
Auch die OECD kündigt an, dass es in Kürze einen integrierten Ansatz für die Testung und Bewertung von nicht-genotoxischen Karzinogenen (IATA) geben wird.<sup>(43)</sup> Zwar gibt es eine Reihe an in vitro-Genotoxizitätstests, die fehlende Humanrelevanz durch einen dann folgenden in vivo-Test am Nagetier lässt jedoch eine Informationslücke zurück, die die OECD mit einer integrierten Teststrategie schließen will. Jacobs et al. (2020) haben hier einen Entwurf skizziert, der die Komplexität aufzeigt.<sup>(44)</sup> Hilfreich waren unter anderem hier die Adverse Outcome Pathways (AOPs), bereits vorliegende Kenntnisse über Toxizitätsmechanismen auf verschiedenen Stufen der biologischen Organisation, die letztendlich zu der gesundheitlichen Auswirkung (Tumorentwicklung) führen. Die integrierte Teststrategie (IATA) soll auf menschlichen Zellen und Geweben basieren, die die humane in vivo-Situation am besten nachbilden können. Durch die Vielfalt an Zellmechanismen ist eine ganze Reihe von derartigen Tests notwendig. Derzeit sind jedoch die Zellsysteme noch nicht ausreichend entwickelt. Aus diesem Grunde berücksichtigt der erste IATA-Entwurf auch noch andere Säugetierzellsysteme und Testungen über drei oder sieben Tage bzw. 28 und 90 Tage am Tier. Die Teststrategie soll sich jedoch weiterentwickeln und an den Stand der wissenschaftlichen Erkenntnisse und Entwicklungen nach und nach angepasst werden. Der Karzinogenitätstest am Nagetier soll keine Berücksichtigung finden.<sup>(42)</sup>

1. a) Durchführung bewährter In vitro/in vivo- Mutagenitäts- und Genotoxizitätstests zgl.:

b) Übertragbarkeit von in vitro-Ergebnissen/ Untersuchungen auf die in vivo-Situation durch eine Extrapolationsmethode am Computer

c) Exposition

d) Stoffwechsel



2. Durchführung neuer in vitro-Tests in einer abgestuften Teststrategie

Integrierter Teststrategieentwurf zur Prüfung von nicht-genotoxischen Karzinogenen, hier vereinfacht. Zunächst werden bewährte in vitro- und in vivo-Genotoxizitäts- und Mutagenitätstests durchgeführt und mit zusätzlichen Informationen über Stoffwechsel (gelb) und Exposition (rot) und einer Extrapolationsmethode am Computer (blau) zur ersten Risikoabschätzung genutzt. In Fällen einer dauerhaften Exposition (unten rot) mit dem zu untersuchenden Umweltstoff kommt eine Vielzahl an Einzeltests zum Einsatz (in grünen Kreisen), von denen einige noch entwickelt werden müssen. Die einzelnen Schritte bis zur Tumor-bildung entsprechen der Kaskade von Ereignissen, wie sie in der Adverse Outcome Pathway-Konzeption ermittelt worden sind. Die in vitro-Tests werden noch mit weiteren Tests auf epigenetische Veränderungen kombiniert.

Schaubild nach Jacobs et al. Archives of Toxicology (2020) 94: 2899–2923, leicht vereinfacht.

## Ausblick

Engagement gibt es z. B. von der European Partnership for Alternative Approaches to Animal Testing (EPAA): Hier sind 35 Unternehmen aus den Industriesektoren Tiergesundheit, Chemikalien, Kosmetik, Pflanzenschutz, Duftstoffe, Arzneimittel sowie Seifen und Reinigungsmittel mit fünf Direktoraten der Europäischen Kommission zusammengeschlossen, unter anderem mit der Europäischen Validierungsbehörde ECVAM des Joint Research Centers.<sup>(41)</sup> Die Leitungsgruppe der EPAA setzt sich aus Mitgliedern der Industrie und Kommissionsvertretern zusammen und wird von einer Mirrorgroup beraten, die sich aus Experten aus Wissenschaft, Tierschutz, Vertretern der Bereiche Tierversuche, Innovationsakteuren und weiteren Organisationen zusammensetzt. Mit seinen Aktionsprogrammen konzentriert sich die EPAA auf die Umsetzung von neuen Methoden zum Ersatz von Tierversuchen und will die regulatorische Akzeptanz der Methoden fördern, auch bei der Karzinogenitätstestung.<sup>(41)</sup> Letztendliches Ziel der EPAA auf lange Sicht ist, für die Entscheidungsfindung im Regulierungsbereich über Testmethoden verfügen zu können, die wissenschaftlich robust, schneller und kostengünstiger sind als die derzeit verwendeten Tests mit Tieren.

Auf der Grundlage von Untersuchungsergebnissen und eines Workshops der EPAA bereits in 2013 sollten wissenschaftliche Beweise in einer erweiterten Datenbank gesammelt werden. Ziel war es, die Regulierungsbehörden zu überzeugen, den Verzicht auf die zweijährige Kanzerogenitätsstudie an Ratten zu akzeptieren. An der Universität Wageningen wurden dafür 364 Verbindungen in einer frei zugänglichen Datenbank (TOXRef) dokumentiert.<sup>(41)</sup>

Die Studie war interessanterweise Teil eines Regulierungspakets, das gleichermaßen Pharmazeutika, deren Zusatzstoffe und Chemikalien (hauptsächlich Agrochemikalien) umfassen sollte.<sup>(41)</sup> Eine von Fachleuten begutachtete Veröffentlichung mit den Schlussfolgerungen dieser Datenbank soll demnächst geliefert werden. Auf der Grundlage dieser Publikation will ein Team der EPAA gemeinsam mit der European Federation of Pharmaceutical Industries and Associations (EFPIA) ein Konzeptpapier entwickeln, das auf der nächsten ICH-Konferenz vorgestellt werden soll, und konkrete Schritte für Gespräche mit den Regulierungsbehörden vereinbaren.

Die meisten herkömmlichen Testergebnisse sind deskriptiv und liefern keine Informationen über die Abfolge der Ereignisse in Zellen und Geweben, die zur Krebsentwicklung durch Testsubstanzen führen können. Deshalb arbeiten Wissenschaftler, Industrie und Regulationsbehörden mittlerweile an einem sogenannten mechanistischen Ansatz, der von den amerikanischen Regulationsbehörden bereits 2009 in der Publikation „Toxicity in the 21st Century – a Vision and a Strategy“ vorgestellt worden war. Durch die Untersuchungsgenauigkeit und die Möglichkeit des Hochdurchsatzes ließen sich Kosten und Zeit einsparen. Informationssysteme haben sich weiterentwickelt und sind heute in der Lage, Milliarden von Daten auf einmal zu verarbeiten, die international ausgetauscht werden könnten und wichtige Informationen liefern könnten.<sup>(40)</sup>

Die Tumorbildung lässt sich zudem mit Hilfe mechanistischer Informationen besser vorher-sagen. Experten unterbreiteten daher einen alternativen, mechanistischen Ansatz für die Krebsrisikobewertung von Agrochemikalien.<sup>(45)</sup> Das neue Verfahren sieht vor, Ergebnisse aus Testmethoden zum Nachweis von Wirkungsweisen der nicht-genotoxischen Karzinogenität mit Informationen aus Studien zur subchronischen Toxizität zu verknüpfen. Nach und nach könnten in silico-, in vitro- und Kurzzeit- in vivo-Modelle genutzt werden, um die verschiedenen, an der Krebsentstehung beteiligten Aktionsmodi zu identifizieren. Die Teilnehmer halten die Umsetzung des Ansatzes für realistisch und so soll durch einen kontinuierlichen Dialog zwischen allen Interessengruppen Vertrauen in den vorgeschlagenen Ansatz und seine wissenschaftliche Korrektheit aufgebaut werden. In den kommenden Jahren soll auf die regulatorische Umsetzung hingewirkt werden.

# Literatur

- (1) <https://echa.europa.eu/de/substance-information/-/substanceinfo/100.005.779>
- (2) Europäische Union (2017). Durchführungsverordnung (EU) 2017/244 der Kommission vom 10. Februar 2017 zur Nichterneuerung der Genehmigung für den Wirkstoff Linuron gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1107/2009 des Europäischen Parlaments und des Rates über das Inverkehrbringen von Pflanzenschutzmitteln und zur Änderung des Anhangs der Durchführungsverordnung (EU) Nr. 540/2011 der Kommission. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/PDF/?uri=CELEX%3A32017R0244>
- (3) [https://www.euro.who.int/\\_\\_data/assets/pdf\\_file/0020/185312/Leading-causes-of-death-in-Europe-Fact-Sheet-Ger.pdf](https://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0020/185312/Leading-causes-of-death-in-Europe-Fact-Sheet-Ger.pdf)
- (4) <https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/todesfaelle.html>
- (5) <https://www.bundesgesundheitsministerium.de/themen/praevention/gesundheitsgefahren/krebs.html>
- (6) Marquardt, H., Schäfer, S. & Barth, H. (2013). Toxikologie. 3. Auflage, Stuttgart.
- (7) Bundesinstitut für Risikobewertung (2020). Risikobewertung von Pflanzenschutzmitteln. [https://www.bfr.bund.de/de/risikobewertung\\_von\\_pflanzenschutzmitteln-70187.html](https://www.bfr.bund.de/de/risikobewertung_von_pflanzenschutzmitteln-70187.html)
- (8) <https://www.nanopartikel.info/>
- (9) DocCheck Flexikon (2020). Kanzerogen. <https://flexikon.doccheck.com/de/Kanzerogen>
- (10) Jacobs, M. N., Colacci, A., Louekari, K., Luijten, M., Hakkert, B. C., Paparella, M. & Vasseur, P. (2016). International Regulatory Needs for Development of an IATA for Non-Genotoxic Carcinogenic Chemical Substances. *ALTEX* 33(4): 359-392.
- (11) Richtlinie 2010/63/EU des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2010 zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere. [https://www.bfr.bund.de/cm/343/5\\_Beratung\\_Anlage%203\\_2010-63-EU.pdf](https://www.bfr.bund.de/cm/343/5_Beratung_Anlage%203_2010-63-EU.pdf)
- (12) <https://www.bundesgesundheitsministerium.de/themen/praevention/gesundheitsgefahren/krebs.html>
- (13) Aktories, K., Förstermann, U., Hofmann, F. & Starke, K. (2009). Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Urban & Fischer Verlag, München.
- (14) DocCheck Flexikon (2020). Hyperplasie. <https://flexikon.doccheck.com/de/Hyperplasie>
- (15) European Medicines Agency (2020). ICH S1A The Need for Carcinogenicity Studies of Pharmaceuticals. <https://www.ema.europa.eu/en/ich-s1a-need-carcinogenicity-studies-pharmaceuticals>
- (16) OECD library (2018). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, Health effects, Test No. 451: Carcinogenicity Studies. <https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264071186-en.pdf?expires=1594372320&id=id&accname=guest&checksum=2BEE4654173F3925F79291EE5A4119E1>
- (17) <https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264071223-en.pdf?expires=1594372310&id=id&accname=guest&checksum=0A57DC76A662BE86865389397448B0DB>
- (18) Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (2020). The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). [https://www.bfarm.de/DE/BfArM/EU\\_Internationales/ICH/\\_node.html](https://www.bfarm.de/DE/BfArM/EU_Internationales/ICH/_node.html)
- (19) European Medicines Agency (2016). ICH guideline S1, Regulatory notice on changes to core guideline on rodent carcinogenicity testing of pharmaceuticals. EMA/CHMP/ICH/536328/2013 Rev. 1, Committee for Human Medicinal Products, 29 February 2016. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/regulatory-procedural-guideline/ich-guideline-s1-regulatory-notice-changes-core-guideline-rodent-carcinogenicity-testing\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/regulatory-procedural-guideline/ich-guideline-s1-regulatory-notice-changes-core-guideline-rodent-carcinogenicity-testing_en.pdf)
- (20) Gesellschaft für Versuchstierkunde GV-Solas (2009). Hygiene-Überwachung von Maus- und Rattenbeständen bei verschiedenen Haltungformen. [http://www.gv-solas.de/fileadmin/user\\_upload/pdf\\_publication/Hygiene/hyg-ueberw\\_maus-ratte.pdf](http://www.gv-solas.de/fileadmin/user_upload/pdf_publication/Hygiene/hyg-ueberw_maus-ratte.pdf)
- (21) Friedl, P. (2019). Rethinking research into metastasis. *eLife* 8:e53511. DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.53511>
- (22) Prinz, F., Schlange, T. & Asadullah, K. (2011). Believe it or not: how much can we rely on published data on potential drug targets? *Nat Rev Drug Discov* 10, 712. <https://doi.org/10.1038/nrd3439-c1>
- (23) Errington, T.M., Iorns, E., Gunn, W., Tan, F.E., Lomax, J. & Nosek, B.A. (2014). An open investigation of the reproducibility of cancer biology research. *Elife* 3:e04333. doi:10.7554/eLife.04333
- (24) Nosek, B. A. & Errington, T. M. (2017). Reproducibility in Cancer Biology. Making sense of replications. *eLife* 2017, 6: e23383. DOI: 10.7554/eLife.23383
- (25) Baker, M., Dolgin, E. (2017). Reproducibility project yields muddy results. *Nature* 541: 269–270. <https://www.nature.com/articles/541269a.pdf?origin=ppub>
- (26) Wen, H., Wang, H.-Y., He, X. & Wu, C.-I. (2018). On the low reproducibility of cancer studies. *National Science Review* 5/5: 619–624. <https://doi.org/10.1093/nsr/nwy021>
- (27) Begley, C., Ellis, L. (2012). Raise standards for preclinical cancer research. *Nature* 483, 531–533. <https://doi.org/10.1038/483531a>
- (28) Mobley, A., Linder S. K., Braeuer, R., Ellis, L. M. & Zwelling, L. (2013). A Survey on Data Reproducibility in Cancer Research Provides Insights into Our Limited Ability to Translate Findings from the Laboratory to the Clinic. *PLOS ONE* 8/5, e63221. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063221>
- (29) Sauer, U. G., Deferme, L., Gribaldo, L., Hackermüller, J., Tralau, T., van Ravenzwaay, B., Yauk, C., Poole, A., Tong, W. & Gant, T. W. (2017). The challenge of the application of 'omics technologies in chemicals risk assessment: Background and outlook. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 91: S14-S26.
- (30) [https://ekvv.uni-bielefeld.de/blog/uniaktuell/entry/omics\\_technologien\\_teilen](https://ekvv.uni-bielefeld.de/blog/uniaktuell/entry/omics_technologien_teilen)
- (31) European Commission (Last update: 26 March 2013). Development of a high throughput genomics-based test for assessing genotoxic and carcinogenic properties of chemical compounds in vitro. <https://cordis.europa.eu/project/id/37712>
- (32) Steinberg, P. (2016). In Vitro–In Vivo Carcinogenicity. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, DOI: 10.1007/10\_2015\_5013
- (33) <http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>
- (34) <https://ec.europa.eu/jrc/en/eurl/ecvam/alternative-methods-toxicity-testing/validated-test-methods/carcinogeny/three-cta>
- (35) Hussain, T. & Mulherkar, R. (2012). Lymphoblastoid Cell lines: a Continuous in Vitro Source of Cells to Study Carcinogen Sensitivity and DNA Repair. *Int J Mol Cell Med* 1/2: 76-87. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3920499/>
- (36) [https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/cb\\_95111735?lang=de&region=DE&gclid=EA1aIqobChMItJzKrazV-6wIVjNd3Ch2EhAL\\_EAMYASAAEgLfFD\\_BwE](https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/cb_95111735?lang=de&region=DE&gclid=EA1aIqobChMItJzKrazV-6wIVjNd3Ch2EhAL_EAMYASAAEgLfFD_BwE)

- (37) Crespi, C. L., Gonzales, F. J., Steimel, D. T. et al. (1991). A Metabolically Competent human Cell line Expressing Five cDNA Encoding Procarcinogen-Activating Enzymes: Application to Mutagenicity Testing. *Chem. Res. Toxicol.* 4: 566-572. <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/tx00023a013>
- (38) Wilde, E.C., Chapman, K.E., Stannard, L.M. et al. (2018). A novel, integrated in vitro carcinogenicity test to identify genotoxic and non-genotoxic carcinogens using human lymphoblastoid cells. *Arch Toxicol* 92, 935–951. <https://doi.org/10.1007/s00204-017-2102-y>
- (39) Jenkins, G. & Doak, S. (2018). Breakthrough could end animal testing in carcinogen research. <https://theconversation.com/breakthrough-could-end-animal-testing-in-carcinogen-research-99578>
- (40) Paparella, M., Colacci, A. & Jacobs. M. N. (2017). Uncertainties of testing methods: What do we (want to) know about carcinogenicity? *ALTEX* 34(2): 235-252. doi: 10.14573/altex.1608281. Epub 2016 Oct 24. PMID: 27776202.
- (41) European Chemicals Agency (ECHA) (2016). New Approach Methodologies in Regulatory Science. Proceedings of a scientific workshop Helsinki, 19–20 April 2016. [https://echa.europa.eu/documents/10162/22816069/scientific\\_ws\\_proceedings\\_en.pdf](https://echa.europa.eu/documents/10162/22816069/scientific_ws_proceedings_en.pdf)
- (42) [https://www.ema.europa.eu/en/documents/regulatory-procedural-guideline/ich-guideline-s1-regulatory-notice-changes-core-guideline-rodent-carcinogenicity-testing\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/regulatory-procedural-guideline/ich-guideline-s1-regulatory-notice-changes-core-guideline-rodent-carcinogenicity-testing_en.pdf)
- (43) OECD (2020). Overview of Concepts and Available Guidance related to Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA), OECD Series on Testing and Assessment, No. 329, Environment, Health and Safety, Environment Directorate, OECD.
- (44) Jacobs MN, Colacci A, Corvi R, Vaccari M, Aguila MC, Corvaro M, Delrue N, Desaulniers D, Ertych N, Jacobs A, Luijten M, Madia F, Nishikawa A, Ogawa K, Ohmori K, Paparella M, Sharma AK, Vasseur P. Chemical carcinogen safety testing: OECD expert group international consensus on the development of an integrated approach for the testing and assessment of chemical non-genotoxic carcinogens. *Arch Toxicol.* 2020 Aug;94(8):2899-2923. doi: 10.1007/s00204-020-02784-5. Epub 2020 Jun 27. PMID: 32594184; PMCID: PMC7395040.
- (45) Luijten, M., Corvi, R., Mehta, J., Corvaro, M., Delrue, N., Felter, S., Haas, B., Hewitt, N. J., Hilton, G., Holmes, T., Jacobs, M. N., Jacobs, A., Lamplmair, F., Lewis, D., Madia, F., Manou, I., Melching-Kollmuss, S., Schorsch, F., Schütte, K., Sewell, F., Strupp, C., van der Laan, J. W., Wolf, D. C., Wolterink, G., Woutersen, R., Zvonar, Z., Heusinkveld, H. & Braakhuis, H. (2020). A comprehensive view on mechanistic approaches for cancer risk assessment of non-genotoxic agrochemicals. *Regul Toxicol Pharmacol.* 118: 104789. doi: 10.1016/j.yrtph.2020.104789. Epub ahead of print. PMID: 33035627.

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:  
Severinusstr. 52 | 53909 Zülpich  
Tel. 02252 - 830 12 10 | Fax 02252 - 830 12 11  
[info@tierrechte.de](mailto:info@tierrechte.de) | [www.tierrechte.de](http://www.tierrechte.de)

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