

# Einsatz menschlicher Tumorzellkulturen als Testmodelle bei der Entwicklung von Wirkstoffen für die Krebstherapie

Günther Bernhardt, Thilo Spruß und Helmut Schönenberger

**Zusammenfassung:** Bei der Entwicklung und Prüfung neuer Arzneistoffe für die Krebstherapie können menschliche Tumorzellen sehr effektiv eingesetzt werden. Es wird ein standardisiertes computergestütztes Zellkulturverfahren zur zuverlässigen Beurteilung der Wirksamkeit potentieller Antitumormittel vorgestellt. Die Flexibilität der beschriebenen Methodik ermöglicht zusätzlich die in vitro Bestimmung pharmakologisch wichtiger Parameter wie etwaige Substanzinaktivierung durch Serumbestandteile, die zur Abtötung der Krebszellen erforderliche Dosis und Einwirkzeit. Die Anzahl der Substanzen die als "weiterverfolgungswert" erscheinen, reduziert sich dadurch erfahrungsgemäß auf ca. 1%. Für diese Substanzen muß trotz der ausgedehnten in vitro Untersuchungen die Wirksamkeit letztlich im Tierexperiment bestätigt werden. In diesen unerläßlichen Tierversuchen werden die Belastungen und Leiden der Tiere auf ein Minimum reduziert.

## Notwendigkeit und Problematik der Arzneistoffentwicklung für die Krebstherapie

Es besteht die allgemeine Auffassung, daß Fortschritte in der Krebstherapie nur durch Entwicklung neuartiger Wirkstoffe zu erreichen sind. Ein wichtiges Ziel der Arzneimittelforschung ist deshalb die Bereitstellung von stärker wirkenden und besser verträglichen Chemotherapeutika für die Behandlung von Krebserkrankungen, besonders von solchen, die sich in einem fortgeschrittenen Stadium befinden. In derartigen Fällen ist durch das Auftreten von Metastasen in den verschiedensten Bereichen des menschlichen Körpers eine kurative Therapie mit chirurgischen und strahlentherapeutischen Maßnahmen nicht mehr möglich.

Die großen Erfolge, die in der Therapie von Infektionskrankheiten durch Bereitstellung hochwirksamer Arzneimittel (Antibiotika und Chemotherapeutika) besonders in den letzten 60 Jahren erzielt wurden, lassen hoffen, daß auch in der Krebstherapie eine ähnliche positive Entwicklung möglich ist. Die kurative Wirkung chemotherapeutischer Maßnahmen bei einigen Krebserkran-

kungen (akute Lymphoblasten Leukämie, Hodenkarzinom, Burkitt Lymphom u.a.) stützen diese Prognose.

Neben dem Design neuer Wirkstoffe und ihrer Synthese ist die wichtigste Aufgabe der Arzneimittelforschung die Feststellung der Wirkung an Modellen, die den Verhältnissen in der Klinik möglichst nahe kommen. Nur so ist eine Übertragbarkeit der präklinischen Befunde auf den Menschen gewährleistet. Seit einigen Jahren stehen in der Experimentellen Krebsforschung Tierversuchsmodelle zur Verfügung, bei denen als Transplantate menschliche Tumoren eingesetzt werden. Die Meinung der Experten ist, daß diese Modelle eher die Voraussage einer Wirkung am Menschen zulassen als die bisher benutzten Nagertumormodelle.

Krebschemotherapeutika sind nicht an allen Tumormodellen (z.B. Mammakarzinom, Leukämie, Lungenkarzinom) gleich stark wirksam. Sie zeigen häufig eine bevorzugte Wirkung gegenüber einem speziellen Tumor (z.B. Brustkrebs). Diese Beobachtung hat die Arzneimittelforschung ermutigt, den Versuch zu unternehmen, Chemotherapeutika für die Behandlung einer speziellen Krebserkrankung (z.B. Brustkrebs) zu entwickeln. Entsprechend dieser neuen Zielsetzung war eine Umstellung im Aufbau des Testsystems erforderlich. Anstelle eines breiten Spektrums unterschiedlicher Tumorarten (Leukämien, Mamma-, Prostata-, Lungen-, Colonkarzinom und andere Tumormodelle) wurde nun ein Spektrum von Modellen eines speziellen menschlichen Tumortyps, für dessen Therapie die Entwicklung neuer Wirkstoffe geplant war, für das Testprogramm verwendet. Die in einem solchen Screening-System benutzten Tumormodelle zeichnen sich durch eine unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber klinisch etablierten Therapien aus; z.B. im Falle des Mammakarzinoms gegenüber Steroidhormonantagonisten, da die im Screening benutzten Modelle eine unterschiedliche Ausstattung an Steroidhormonrezeptoren (welche die Wirkung vermitteln) aufweisen.

## Klassische Testverfahren

Das National Cancer Institute (NCI), USA entwickelte als größte Institution auf dem Gebiet der experimentellen

Krebstherapie in den Jahren von 1959 bis heute eine Vielzahl von Screening - Programmen zur Auffindung antineoplastischer Substanzen (1). Entscheidungsgrundlage für die Trennung potentiell "brauchbarer" von "unbrauchbaren" Substanzen waren bis 1987 ausschließlich die Ergebnisse aus Tierversuchen (2). Ein Beispiel für ein derartiges Testsystem (3) ist nachfolgend dargestellt. Nach einem "Vorscreening" an der extrem empfindlichen P 388 Leukämie der Maus durchliefen die Substanzen drei weitere murine Tumormodelle (L1210 lymphatische Leukämie, B16 Melanom und M 5076 Sarkom). Die abschließende vorklinische Prüfung erfolgte am menschlichen MX-1 Mammakarzinom. Zu diesem Zweck wurde dieser Tumor in immuninkompetente Mäuse implantiert.

## Alternative Prüfverfahren

Im engeren Sinne versteht man unter Alternativen zum Tierversuch Methoden, die geeignet sind, Tierversuche vollständig zu ersetzen. Meistens - wie auch in diesem Beitrag - wird dieser Begriff jedoch umfassender verstanden und bezeichnet dann alle Maßnahmen und Verfahren, mit deren Hilfe die Zahl der Versuchstiere eingeschränkt oder der Grad ihres Leidens vermindert werden kann.

Die Weiter- und Neuentwicklung von Antitumormitteln stellt ein besonders prädestiniertes Einsatzgebiet für *in vitro* Testverfahren dar, da das Wirkprinzip in der Regel vorgegeben ist. Im Chemosensitivitätstest wird in der Zellkultur festgestellt, ob eine Substanz Krebszellen in ihrem Wachstum zu hemmen oder abzutöten vermag. Arzneistoffe mit neuem, bisher unbekanntem Wirkmechanismen, welche des Gesamtorganismus bedürfen, z.B. Immunmodulatoren, werden dabei freilich nicht entdeckt.

Besonders in den letzten Jahren stieg die Zahl der Publikationen über die Einsatzmöglichkeiten menschlicher Tumorzelllinien bei der Beurteilung der Wirkung zytotoxischer Substanzen lawinenartig an.

Die Hauptunterschiede zwischen den beschriebenen Verfahren betreffen die zu verwendende Kulturtechnik (Suspensionskultur, Monolayerkultur, Kultur als Sphäroid d. h. Zellhaufen) und die Parameter zur Quantifizierung der Wirkung (Bestimmung der Zellzahl, Einbau von radioaktiv markierten Verbindungen, Kolonienbildung z.B. in Weichagar, Verwendung unterschiedlicher Farbstoffe) (4).

## In vitro Substanz - Screening und Optimierung von Dosierplänen

Grundlegende Anforderungen an ein *in vitro* Testsystem zur Auffindung neuer Chemotherapeutika sind:

- (I) Reproduzierbare Dosis-Wirkungsabhängigkeit über einen Konzentrationsbereich, welcher die *in vivo* Dosis einschließt.
- (II) Linearität zwischen dem gewählten Zytotoxizitätsparameter und der Zellzahl.
- (III) Präzise Voraussage der *in vivo* Effekte aus den *in vitro* Daten.

## Standardisierung der *in vitro* Tumormodelle

Beim Einsatz von Zellkulturtechniken zur Auffindung neuer antineoplastischer Wirkstoffe liegt ein Hauptproblem in der extremen genetischen Variabilität der Tumorzellen. Der starke Selektionsdruck durch häufiges Passieren der Kulturen führt zur Entstehung neuer Subklone, die sich sowohl genotypisch als auch phänotypisch vom Ursprungstumor sehr stark unterscheiden können.

Diese Veränderungen betreffen unter anderem auch Wachstumsparameter der kultivierten Tumorzellen wie die Dauer der lag- und log-Phase, die Generationszeit und Zelldichte im Plateau. Da die Wirkung von Tumorchemostoffen sehr stark von den jeweiligen Wachstumsparametern einer Zellpopulation abhängen kann, muß zur Gewährleistung der Reproduzierbarkeit die Wachstumskinetik der Tumorzellen in jedem Experiment überprüft werden. Zu diesem Zweck wurde in unserer Arbeitsgruppe ein computergestütztes, colorimetrisches Verfahren zur Aufnahme von Wachstumskurven in Mikrotiterplatten nach Anfärben der Zellen mit Kristallviolett entwickelt (5).

Im Gegensatz zu herkömmlichen Methoden (graphische Abschätzung der mittleren Verdopplungszeit nach der Zellzählung) erlaubt diese Technik nicht nur die exakte Beschreibung der gesamten Wachstumskurve, sondern auch die präzise Zuordnung der Verdopplungszeit zu jedem Zeitpunkt während der gesamten Inkubationsdauer. Eine Auftragung der Verdopplungszeit gegen die Inkubationszeit liefert somit ein Maximum an Information (6).

## Testprinzip der Wirkstoffprüfung *in vitro*

Zur Wirkstoffprüfung wurde ein *in vitro* Chemosensitivitätstest in Mikrotiterplatten eingeführt.

Untersucht wird das Wachstumsverhalten der menschlichen Krebszellen in Gegenwart und in Abwesenheit von Hemmstoffen.

Nach unterschiedlich langen Inkubationszeiten werden die Kontrollkulturen und die mit Wirkstoff behandelten Zellen mit Glutardialdehyd fixiert, mit PBS (Phosphat gepufferte Salzlösung) überschichtet und bis zum Aufarbeiten des gesamten Versuchs im Kühlschrank aufbewahrt. Am Versuchsende werden alle Platten nach dem

Anfärben der Zellen mit Kristallviolett bei 578 nm vermessen. Wachstumskurven werden mit einem hierfür entwickelten Computerprogramm aus den optischen Dichten der angefärbten Tumorzellen bestimmt. Ein Vergleich der Wachstumskurven erlaubt im Gegensatz zu der in anderen Arbeitsgruppen üblichen Endpunktsbestimmung die Beurteilung der konzentrationsabhängigen Hemmverläufe über den gesamten Inkubationszeitraum. Eine eventuelle Erholungsphase anfänglich geschädigter Zellen bzw. die Entstehung resistenter Subpopulationen wird in einer derartigen Versuchsanordnung zusätzlich erfaßt. Die beschriebene Methode ermöglicht die Unterscheidung von zytostatischen und zytotoxischen Wirkungen.

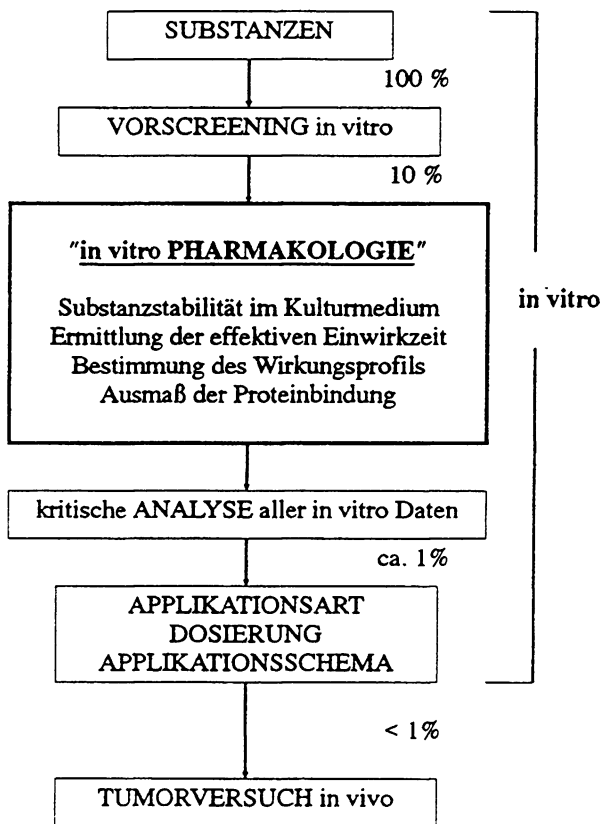


Abb. 1: Testschema bei der Entwicklung neuer Antitumormittel

## In vitro Pharmakologie

Zur Erstellung eines optimalen Dosierungsschemas für den eventuell anschließenden Tierversuch werden in verschiedenen Konzentrationen diejenigen Einwirkzeiten, die zu zytotoxischen Effekten führen, im Zellkultorexperiment ermittelt.

Zur Verbesserung der in vitro - in vivo Korrelation werden die Testsubstanzen bezüglich konkurrierender Inaktivierungsprozesse (z.B. Bindung an Serumalbumin, Reaktion mit Bionucleophilen) durch unterschiedlich lange Vorinkubation im Kulturmedium untersucht. Durch dieses Vorgehen soll der Einfluß von Inaktivierungsprozessen,

die im Organismus beim Transport des Wirkstoffs zum Tumor stattfinden, erfaßt werden.

Unter diesen Voraussetzungen kann festgestellt werden, ob eine antineoplastische Wirkung in klinisch relevanten Konzentrationen erreicht wird. Applikationsart, Einwirkzeit und Dosierungsintervall werden so in vitro optimiert.

Ziel dieses Ansatzes ist das selektive Herausfiltern potentieller Chemotherapeutika mit einer spezifischen Wirkung an einer ganz bestimmten Krebsart. Gelingt es nun, in vitro derartige Wirkstoffe ausfindig zu machen, wird die Prüfung in vivo am selben Tumormodell in der Nacktmaus fortgesetzt.

Nach kritischer Analyse aller vorliegender in vitro Daten kommen nur noch ca. 1% (wie in unserem Arbeitskreis in der Substanzklasse der Cisplatin-Analoga) der synthetisierten Substanzen für eine in vivo Testung in Frage. Die Tierversuche werden dann mit den optimierten Therapieplänen unter geringstmöglicher Belastung der Nacktmäuse durchgeführt. Am Beispiel des in der Klinik am Estrogenrezeptor - positiven Mammakarzinom der Frau eingesetzten Antiestrogens Tamoxifen wird in Abb.

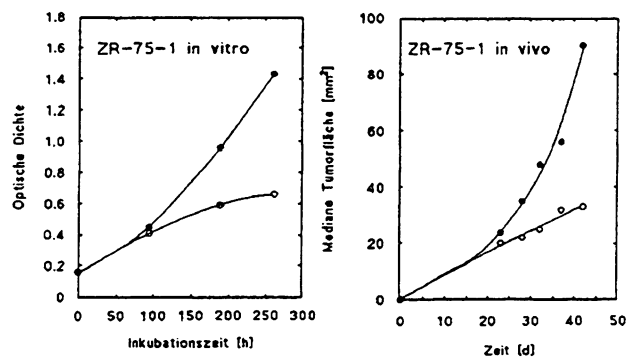


Abb. 2: Gegenüberstellung der in vitro und in vivo Wirkung von Tamoxifen am menschlichen Mammakarzinom ZR-75-1.

2 gezeigt, daß bei Anwendung der oben aufgeführten in vitro Methode präzise Voraussagen der in vivo Versuche möglich sind. An dieser Stelle muß darauf hingewiesen werden, daß Verbindungen, die erst nach Aktivierung im Organismus ihre Wirkung entfalten, beim in vitro Screening nicht erkannt werden. Zu diesen sogenannten Prodrugs gehört eines der wichtigsten Krebschemotherapeutika, das Cyclophosphamid.

Die Hemmung der hormonsensitiven menschlichen Mammakarzinomzelllinie ZR-75-1 in vitro erreicht in der Langzeitinkubation mit Tamoxifen in klinisch relevanter Dosierung Werte um 50%, die Tumorchemmung durch dieses Antiestrogen, das tumortragenden Nacktmäusen verabreicht wurde, lagen bei Anwendung des in vitro optimierten Therapieplans ebenfalls im 50% - Bereich. Diese Ergebnisse stimmen außerdem sehr gut mit dem Ansprechen dieses Tumortyps auf eine Tamoxifenbehandlung bei menschlichen Patientinnen überein (7).

## Unerläßliche Tierversuche

Die ausgedehnte in vitro Prüfung potentieller Arzneistoffe, gemäß der oben geschilderten Vorgehensweise, führt erfahrungsgemäß zu einer drastischen Reduktion der Versuchstierzahlen um etwa 99% im Vergleich mit konventionellen Teststrategien. Dennoch kann auch bei der Entwicklung neuer Arzneimittel für die Krebstherapie auf Tierversuche nicht völlig verzichtet werden. Wie eine Substanz im Körper aufgenommen, verteilt, um- oder abgebaut und ausgeschieden wird bzw. wie hoch ihre Toxizität ist, vermag nur die Untersuchung im Gesamtorganismus zu zeigen.

Tumorpharmakologische Tierexperimente nehmen in der Arzneistoffentwicklung bezüglich der Belastung der Versuchstiere eine Sonderstellung ein. In diesem Teilbereich der Pharmakologie ist eine (wie z.B. in der Bluthochdrucktherapie mögliche) Testung von potentiellen Arzneimitteln an gesunden menschlichen Probanden nicht möglich. Es ist nicht zu verantworten, Testsubstanzen die möglicherweise mutagene oder kanzerogene Eigenschaften haben, einem gesunden Probanden zu verabreichen, der außerdem per definitionem keinen Tumor hat, an dem sich eine mögliche antineoplastische Substanzwirkung feststellen ließe.

Die experimentelle Medizin muß demnach in der präklinischen Entwicklung von Antitumormitteln die Situation eines krebserkrankten Patienten und dessen Therapie möglichst "realistisch" simulieren, da die Tierversuche in dieser Disziplin der letzte Schritt vor dem möglichen Einsatz des Mittels am schwer erkrankten Menschen sind. Dies bedeutet, daß die Versuchstiere sowohl einen (menschlichen) Tumor tragen müssen, als auch mit stark toxischen Substanzen in hohen Dosierungen therapiert werden müssen, da nur auf diese Weise mögliche Therapieerfolge meßbar werden.

## Belastungen für die Versuchstiere in der Tumorpharmakologie

Menschliche Tumoren mit ihrem charakteristischen Ansprechverhalten auf Antitumormittel werden in der Tumorpharmakologie in der Regel in Nacktmäuse transplantiert, die durch eine embryonale Thymusdysgenese nur in sehr beschränktem Umfang T-Lymphocyten bilden und so die Xenotransplantate nicht abstoßen (8). Verbunden mit dieser Eigenschaft der Tiere ist eine Reihe von weiteren Defekten, die höchste Anforderungen an die Pflege und Haltung der Tiere stellen, um diese "Grundbelastung" der Tiere durch die Erbkrankheit und deren Folgen möglichst gering zu halten (9).

Eine deutliche Reduktion der Zahl der Versuchstiere sowie die Verminderung der Belastung der Tiere in der

präklinischen Tumorpharmakologie wird in unserer Arbeitsgruppe durch folgende Maßnahmen erreicht:

- (I) Nur Substanzen, für die ein optimaler Therapieplan (s.o.) in vitro erstellbar war, werden im unverzichtbaren Tierversuch eingesetzt.
- (II) Dieser Tierversuch ist so angelegt, daß die Gesamtbelastung, die sich während des Versuchs entwickelt, möglichst niedrig ist.

Unsere Kriterien zur Beurteilung der Belastungen der Tiere im Tumorexperiment sollen kurz erläutert werden, da eine einheitliche oder verbindliche Methodik zur Belastungsabschätzung noch nicht existiert (10).

Die meisten Empfehlungen zur Einschätzung des Grades der Belastung der Versuchstiere geben vier (11) bis fünf Belastungsstufen an. Die Grade der Belastung werden meist angegeben in "keine - niedrig - mittel - hoch - sehr hoch".

Die Zuordnung zu einer der fünf Belastungsstufen erfolgt in unserer Gruppe weitgehend nach dem "Analogieschluß - Prinzip" (12), das den Schluß vom Menschen auf das Tier voraussetzt und unserer Meinung nach auch auf Tumorexperimente angewendet werden kann. (Auch das Tierschutzgesetz (13) folgt z.B. im §5 (2) diesem Konzept, indem es vorschreibt, daß eine Betäubung eines warmblütigen Wirbeltieres nicht erforderlich ist, "wenn bei vergleichbaren Eingriffen am Menschen eine Betäubung in der Regel unterbleibt").

Abbildung 3 faßt unsere Einschätzung der Belastung von Nacktmäusen in tumorpharmakologischen Experimenten zusammen. Diese basieren u.a. auf der Beobachtung des Allgemeinzustands der Tiere, der Körpergewichtsentwicklung und des Verhaltens (z.B. gegenseitige Körperpflege).

Die Kurve A in Abb.3 gibt die Belastungen wieder, die durch den wachsenden Tumor hervorgerufen werden. Schnell vorübergehende, leichte Schmerzreaktionen

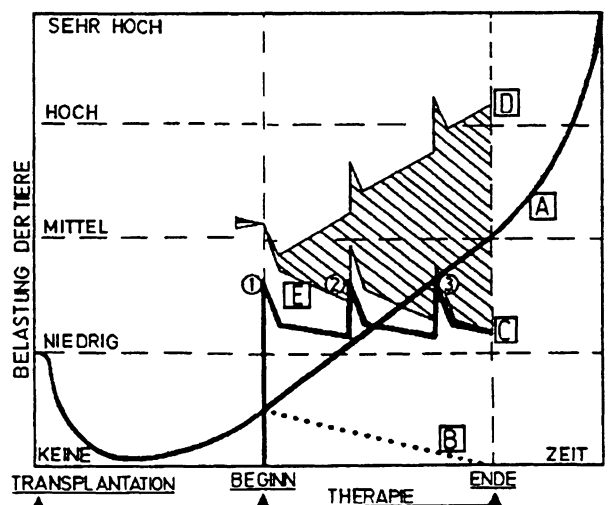


Abb. 3: Belastung von Nacktmäusen in der Tumorpharmakologie

werden am Anfang des Experiments durch die s.c. Injektion der Tumorzellen verursacht. Mit der Größenzunahme des Tumors nimmt die Belastung der Tiere kontinuierlich zu und steigt dann gegen Ende des Experiments rapide an. Wenn der Tumor eine durch die äußere Haut meßbare Fläche von etwa 150 mm<sup>2</sup> erreicht hat, liegt noch eine "mittelgradige" Belastung vor, da sich der Tumor unter der sehr gut dehnbaren äußeren Haut befindet und so vermutlich keine größeren Schmerzen verursacht.

Spätestens zu diesem Zeitpunkt werden die Versuche abgebrochen, da die in vitro optimierten Therapiepläne einen Versuchsaufbau ermöglichen, der die Wirksamkeit einer Substanz bereits dann eindeutig beurteilen läßt.

Kurve B zeigt die Belastungsabnahme bei Tumorremission.

Kurve C zeigt das Belastungsprofil für eine übliche Chemotherapie mit drei (①②③) Behandlungen am tumorfreien Tier. Da beim Versuchstier Meßgrößen wie Körpergewicht, kinisch-chemische und hämatologische Daten während der Chemotherapie in ähnlicher Weise wie beim Menschen verändert sind, kann von der Belastung eines Menschen während dreier aufeinander folgender Therapiezyklen, wie z.B. bei der Chemotherapie des Mammakarzinoms üblich, auf die Belastung der Tiere geschlossen werden.

Wird ein tumorpharmakologisches in vivo Experiment (Therapiebeginn = Pfeil) mit einem unwirksamen "Therapeutikum" oder nach einem unzureichenden Dossierplan durchgeführt, wird angenommen, daß sich die Belastungen addieren (Kurve D).

Die Belastung der Tiere im tumorpharmakologischen Experiment bewegt sich je nach Wirksamkeit der Substanz und gewähltem Applikationsschema in dem in Abb.2 schraffierten Bereich. Bei optimalem Dossierplan mit einem wirksamen Therapeutikum kann die Belastung im Idealfall, wie in Kurve E dargestellt, reduziert werden.

## Folgerungen

Tierversuche in der Tumorpharmakologie lassen sich nach dem heutigen Stand der Wissenschaft nicht vollständig durch Versuche an schmerzfreien Systemen ersetzen. Wie bereits erwähnt, kommt den in vivo Versuchen in diesem Teilbereich der experimentellen Medizin eine besondere Bedeutung zu, da bereits in der vorklinischen Phase der Arzneistoffentwicklung über den Einsatz einer

neuen Therapiemöglichkeit an schwer erkrankten Menschen entschieden werden muß.

Ein Hauptziel der Weiterentwicklung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch in der Tumorpharmakologie ist es deshalb, nicht nur die Anzahl der Tiere in den Tumorversuchen, sondern auch deren Belastungen auf ein Minimum zu reduzieren.

Durch die hier vorgestellten neu entwickelten in vitro Methoden kommt man unseren Erfahrungen nach diesem Ziel sehr nahe.

## Literatur

- 1) Geran R. I., Greenberg N. H., Macdonald M. M., Schumacher A. M., Abbott B. J. (1972): Protocols for Screening Chemical Agents and Natural Products Against Animal Tumors and Other Biological Systems (Third edition); Cancer Chemotherapy Reports Part 3 Vol. 3, No.2
- 2) Venditti J. M. (1981): Preclinical Drug Development: Rationale and Methods; Seminars in Oncology, Vol.8, No.4, (349-361)
- 3) Venditti, J. M. (1983): The National Cancer Institute Drug Discovery Program. Current and Future Perspectives: a Commentary. Cancer Treatment Report Vol. 67, (767-772)
- 4) Alley M. C., Scudiero D.A., Monks A., Hursey M.L., Czerwinski M.J., Fine D.L., Abbott B.J., Mayo J.G., Shoemaker R.H., Boyd M.R. (1988): Feasibility of Drug Screening with Panels of Human Tumor Cell Lines Using a Microculture Tetrazolium Assay; Cancer Research, Vol. 48, (589-601)
- 5) Reile, H., Birnböck, H., Bernhardt, G., Spruß, Th., and Schönenberger H. (1990) Computerized Determination of Growth Kinetic Curves and Doubling Times from Cells in Microculture. Analytical Biochemistry Vol. 187 (262-267)
- 6) Reile, H., Bernhardt, G., Birnböck, H., Spruß, T. & Schönenberger, H. (1989): Computer Aided Colorimetric Microtiter Assay for Chemosensitivity Evaluation Based on Doubling Time Analysis. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, Vol. 115 (Supplement), (26)
- 7) Nagel G.A., Sauer R., Schreiber H.W. [Hrsg.] (1989): Aktuelle Onkologie 46: Antiöstrogene in Forschung und Klinik; Zuckschwerdt Verlag, München
- 8) Holub M. (1989): Immunology of Nude Mice; CRC Press, Boca Raton, USA
- 9) Fortuncyer H. P. (1981): Thymusaplastische Maus (nu/nu), Thymusaplastische Ratte (mu/mu): Haltung, Zucht, Versuchsmodelle; Parey, Berlin - Hamburg
- 10) Gruber F. (1989): Vergleich verschiedener Schweregradtabellen zur Belastung von Versuchstieren; in: Tierlaboratorium 12 1988/89 [Hrsg.: Zentrale Tierlaboratorien und Institut für Versuchstierkunde der Freien Universität Berlin], Berlin, (152-166)
- 11) Allgemeine Verwaltungsvorschrift zur Durchführung des Tierschutzgesetzes vom 1. 7. 1988 (BAnz. Nr. 139a S.3)
- 12) Militzer K. [Hrsg.], (1986): Wege zur Beurteilung tiergerechter Haltung bei Labor-, Zoo- und Haustieren; Parey, Berlin - Hamburg
- 13) Tierschutzgesetz vom 24. 7. 1972 (BGBl. I S. 1277) in der Fassung der Bekanntmachung vom 18. 8. 1986 (BGBl. I S.1319)