

Fischembryos und Fischzelllinien zur Vermeidung von Tierversuchen

REACH hat zum Ziel, den Menschen und die Umwelt vor Chemikalien zu schützen, die schädlich für die Gesundheit von Mensch und Ökosystem sind. Um diesem Anspruch nachzukommen gilt es, für eine Vielzahl von Chemikalien verlässliche Grunddatensätze bezüglich ihrer Toxizität zu erstellen. Allerdings wird mit der Implementierung von REACH auch mit einer Zunahme von bis zu 1.5 Mio Tieren in den ersten Jahren gerechnet (Combes et al., World Congress on Alternatives to Laboratory Animals, August 2005). Allein mit traditionellen Versuchen der Toxikologie und Ökotoxikologie, also zum Beispiel Expositionsversuche an Mäusen und Fischen, können wir daher dem Anspruch von REACH kaum gerecht werden. Die dazu benötigte Anzahl an Tierversuchen wäre zudem nicht mit der gesellschaftlichen Forderung vereinbar, Tierversuche zu verbessern, zu verringern und zu ersetzen. Auch ist der mit Tierversuchen verbundene Aufwand an Personal, Zeit und Infrastruktur sehr hoch. Vor diesem Hintergrund sind alternative Methoden zur Toxizitätsbewertung notwendig. Viel versprechend dabei sind so genannte *in-silico* (also Computer-basierte) Methoden, wie zum Beispiel (Q)SAR, welche in den USA und Canada bereits für regulatorische Zwecke angewandt werden. (Q)SARs sind theoretische Modelle, welche die physik-chemischen als auch toxikologischen Eigenschaften von Molekülen anhand deren Struktur voraussagt. Für die Vorhersage toxikologischer Wirkungen sind jedoch auch gut charakterisierte Wirkmechanismen essenziell. Ein zweites Standbein zur Umsetzung von REACH sind, nicht zuletzt vor diesem Hintergrund, alternative experimentelle Methoden zu Tierversuchen – so genannte „*in vitro*“ Methoden (aus dem lat. „im Glas“). Diese beruhen zumeist auf Zellen, welche außerhalb des Organismus in einer gut definierten künstlichen Umgebung kultiviert und gegenüber Chemikalienwirkungen untersucht werden können. *In vitro* Untersuchungen beziehen sich aber auch auf Zebrafischembryonen.

Die mit REACH-verknüpften experimentellen Arbeiten des UFZ zielen darauf ab, Alternativen zu Versuchen mit adulten Fischen zu etablieren. Fische machen an der Gesamtzahl an Tierversuchen zwar „nur“ ca. 6% aus (an der Spitze stehen Mäuse mit ca. 54%, siehe Bericht der Kommission 2003/19), jedoch ist ihr Einsatz bei der Testung umweltgefährdender Substanzen steigend und Voraussetzung für die Zulassung von Chemikalien im Rahmen des Chemikaliengesetzes und des Pflanzenschutzgesetzes. Mit dem Ziel, diese Tests zu ersetzen, arbeiten die Wissenschaftler am UFZ dabei mit Embryonen des Zebraärlings (*Danio rerio*) als auch mit Zelllinien von Fischen als Modell.

Embryonen des Zebraärlings sind ein beliebtes Untersuchungsobjekt der Entwicklungsbiologie, aber zunehmend auch der Toxikologie und Ökotoxikologie. Sie entwickeln sich außerhalb des Muttertieres (deshalb „*in vitro*“) und sind transparent, wodurch Veränderungen in der Entwicklung gut sichtbar sind. Nach 48-72 h schlüpft der Embryo. In den vergangenen Jahren wurde der Zebraärlingsembryotest (auch *DarT* genannt) als *in vitro* Alternative zu akuten Fischtests propagiert (siehe Nagel, 2002, *DarT: The embryo test with the zebrafish *Danio rerio* – a general model in ecotoxicology and toxicology*. ALTEX 19, Suppl. 1/02, 38-48). In diesem Test werden befruchtete Fischeier für 48 h gegenüber der Testchemikalie exponiert und nachfolgend die Vitalität und Entwicklung mikroskopisch analysiert. Bei der Analyse einer Reihe von Chemikalien zeigte sich, dass die Toxizität im Embryo mit der in akuten Fischtests korreliert. Vor diesem Hintergrund wurde *DarT* – auch durch Mitarbeit von Wissenschaftlern des UFZ – in Deutschland zur Alternative zu akuten Fischtests bei der Überwachung von Industrieabwässern gesetzlich verankert.

Am UFZ werden zwei Wege beschritten, um die Einsatzmöglichkeiten von *DarT* zu erweitern. Zum einen wird geprüft, ob *DarT* erweitert werden kann zum so genannten

GenDarT. Mit Hilfe modernster molekularbiologischer Methoden, wie z.B. der Mikroarraytechnologie, wird untersucht, ob die Genaktivität im Embryo Vorhersagen für eine chronische Toxizität im Fisch erlaubt. Erste Ergebnisse mit einigen Modellsubstanzen sind viel versprechend. Sollten sich diese Ergebnisse für eine Vielzahl von Chemikalien bestätigen, könnten zukünftig chronische Fischtests mit Hilfe von Genexpressionsanalysen im Embryo ersetzt werden. Das Projekt wird in Zusammenarbeit mit Prof. Nagel (TU Dresden) und der Firma ECT Ökotoxikologie Flörsheim GmbH durchgeführt und durch das BMBF gefördert. Dabei untersucht ECT, ob sich die von den UFZ-Wissenschaftlern ermittelten Genaktivitäten im Rahmen der ökotoxikologischen Beratung und Testung eines typischen mittelständigen Unternehmens mit einfachen Methoden schnell und zuverlässig bestätigen lassen.

Zum anderen wird getestet, ob die Untersuchung des Proteinmusters neue Möglichkeiten der Risikobewertung im Zebrafischembryo eröffnen. Dabei sollen mit Hilfe umfassender Proteinanalysen („Proteomics“) Biomarker für gering dosierte, nicht tödliche also sublethale Giftwirkungen im Zebrafischembryo identifiziert und charakterisiert werden. Ein Einsatz von solchen spezifischen Biomarkern könnte dann als vereinfachter Test für eine Risikoanalyse von neuartigen Substanzen genutzt werden, wie dies im EU-geförderten Projekt PROTECTOR vorgesehen ist.

Zelllinien von Fischen stellen eine weitere mögliche Alternative zu Versuchen an Fischen dar. Gemeinsam mit kanadischen Wissenschaftlern haben Wissenschaftler am UFZ zum Beispiel in einem Blindvergleich zwischen Fischzelltests, dem akuten Fischtest und einem Standardtest mit Wasserflöhen (*Daphnia magna*) zeigen können, dass die eingesetzte Kiemenzelllinie genau mit den Ergebnissen in Fischen korrelierte. Von 16 Proben aus Industrieausläufen, die sowohl in den Fischzelllinien als auch in Fischen getestet wurden, zeigten 15 keine toxische Wirkung. Eine Probe war toxisch im Fischtest und diese Probe wurde auch von der Kiemenzelllinie als toxisch angezeigt. Dagegen bestand zwischen den Fischmodellen und *Daphnia magna* keine Korrelation in den Ergebnissen mit den komplexen Umweltproben. Drei Wege werden am UFZ beschritten, um Fischzelllinien als Alternativen zu Fischexperimenten zu entwickeln. Der erste ist die Etablierung neuer Fischzelllinien, um der Diversität von Angriffspunkten, wie sie im Gesamtorganismus zur Verfügung stehen, gerecht zu werden. Eine gemeinsam mit den kanadischen Wissenschaftlern etablierte Zelllinie vom Darm der Regenbogenforelle wird derzeit in beiden Laboratorien charakterisiert. Weitere Zelllinien liegen vor und erwarten ihre Charakterisierung. Der zweite Weg ist, Testprotokolle zu entwickeln, welche Chemikalienwirkungen möglichst sensitiv anzeigen. Ein Test mit Leberzellen der Regenbogenforelle wurde so weiter entwickelt, dass die dioxin-ähnliche Wirkung in nahezu unveränderten Wasserproben „aus dem Feld“ nachgewiesen werden kann. Die Etablierung von Methoden zur Bestimmung einer Reihe von Endpunkten an ein und denselben Zellen ist ebenfalls eine Möglichkeit um die Sensitivität zu erhöhen. Der dritte Weg besteht darin, die tatsächlich bioverfügbare Konzentration von Testchemikalien zu ermitteln. Es ist bekannt, dass sowohl das Zellkulturmedium als auch die Kulturgefäße einen erheblichen Einfluss auf die tatsächlich gelösten Konzentrationen von Chemikalien haben können. Die UFZ-Wissenschaftler konnten zeigen, dass Unterschiede in Konzentrations-Wirkungsbeziehungen aufgrund unterschiedlicher Expositionsszenarien aufgehoben werden, wenn man die interne Zellkonzentration der Chemikalie bestimmt und auf der X-Achse aufträgt. Zudem laufen Arbeiten zu einem lösemittelfreien Expositionssystem. Basierend auf diesen Erfahrungen wurde gemeinsam mit nationalen und internationalen Kooperationspartnern Anfang November ein Proposal beim Europäischen Interessenverband der chemischen Industrie (CEFIC) zur „Entwicklung einer Strategie zur Vorhersage der

akuten Fischtoxizität mittels Fischzelllinien“ („Development of a strategy to predict acute fish lethality using fish cell lines“) eingereicht.

Ansprechpartner:

Dr. Kristin Schirmer, Leiterin des UFZ-Departments Zelltoxikologie
(Zebrafischembryonen und Fischzelllinien, Analyse der Genexpression)

Telefon: 0341-235-2699

Dr. Eberhard Küster, Department Chemische Ökotoxikologie, Abt. Wirkungsanalyse
(Zebrafischembryonen, Analyse der Proteinexpression, Biomarker)

Telefon: 0341-235-2675