

Replacement des Jahres 2019

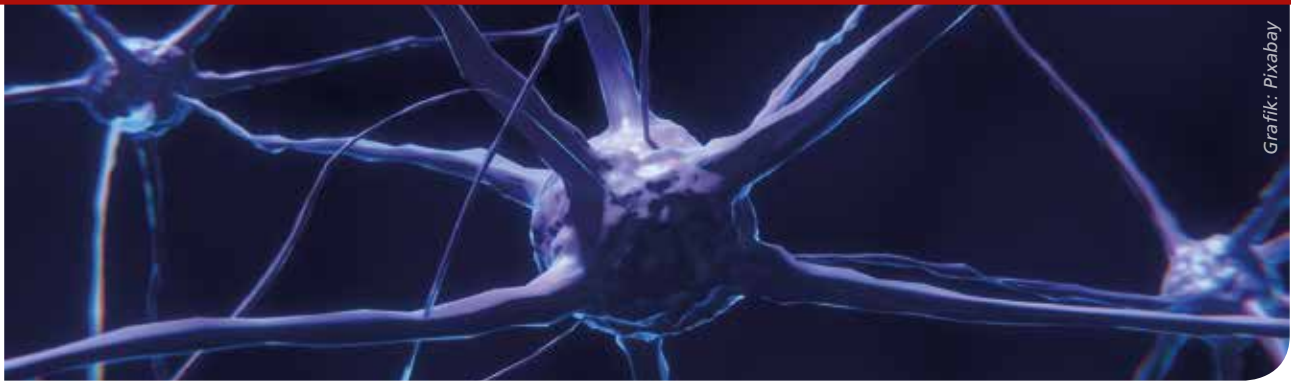


Grafik Kopf: Adobe Stock/adimas; Foto Ratte: Adobe Stock/Pakhnyushchy

Entwicklungsneurotoxizität (DNT) ohne Tierleid

Inhalt

Zusammenfassung	3
Einführung	4
Warum Entwicklungsneurotoxizität (DNT)?	4
Gesetzliche Vorschriften für die DNT-Testung sollten EU-weit routinemäßig verpflichtend werden, sie sind es aber noch nicht	5
Welche Tierversuche werden durchgeführt und welche Spezies dabei eingesetzt?	6
Die wesentliche Studie ist die OECD Testrichtlinie 426	6
Die Entwicklung des Gehirns	7
90 Milliarden Neuronen	8
Hirnentwicklung bis zum 20. Lebensjahr	8
Große Unterschiede des Gehirns zwischen Mensch und Tier	9
Differenzen bei der Hirnreifung	9
Zellen reagieren teilweise anders	9
Menschliche Zellen 7x empfindlicher	10
Am Horizont: In-vitro-, in-silico-Verfahren, abgestufte Teststrategie	10
Völlig ohne Tierversuch geht es auch in der Teststrategie noch nicht	12
Wie weit ist der Stand der Umsetzung?	12
Einschätzung der Regulatorik	14
Weiteres Vorgehen	15
Literatur	16
Anhang	18



Grafik: Pixabay

Replacement des Jahres 2019: Entwicklungsneurotoxizitätstests (DNT) ohne Tierleid

Zusammenfassung

Mit dieser Broschüre präsentieren wir unsere Ausgabe unserer Reihe „Replacement des Jahres“. Sie handelt von den gegenwärtigen Entwicklungen tierversuchsfreier Verfahren in der Entwicklungsneurotoxikologie – kurz DNT. Jüngste Studien haben gezeigt, dass es eine Zunahme von Erkrankungen wie Autismus, Lernbehinderungen, Aufmerksamkeitsdefizits- und Hyperaktivitätsstörungen gibt. Neben einer erblichen Veranlagung, Umweltstressoren und Faktoren im Zusammenhang mit dem sozioökonomischen Status kann auch eine Exposition gegenüber schädlichen Chemikalien wie Pestiziden zu solchen Störungen beitragen. Dabei besonders empfindsam gegenüber Chemikalien ist das sich entwickelnde Gehirn im Mutterleib. Wird der Embryo beziehungsweise der Fötus oder das Kind in den entscheidenden Entwicklungsphasen einer schädlichen Substanz ausgesetzt, kann es leicht zu Störungen kommen.

Die Leitlinien der Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (OECD) schreiben bislang Tierversuche mit Nagetieren vor, um Stoffe auf Entwicklungsneurotoxizität (DNT) zu testen. Die Tests sind jedoch noch nicht routinemäßig vorgeschrieben, eine verpflichtende Anwendung wird jedoch seit längerem diskutiert. Die Tiertests stehen jedoch seit langem wegen begrenzter Übertragbarkeit, langer Laufzeit und hohen Kosten in der Kritik. In der EU und in den USA hat die Industrie mehrfach einen großen Bedarf an alternativen Methoden geäußert. Regulationsbehörden wie European Food Safety Authority (EFSA) arbeiten mit Wissenschaftlern und Wissenschaftlerinnen bereits an einer kosteneffizienten Teststrategie auf Basis einer zuverlässigen in-vitro-Testbatterie, um DNT-Gefahren ermitteln und Maßnahmen zur Verringerung der Exposition gegenüber diesen Chemikalien einleiten zu können. Dabei sollen die komplexen Prozesse der Gehirnentwicklung in einzelne räumlich und zeitlich getrennte Entwicklungsschritte zerlegt und für jeden Schritt einzelne Tests entwickelt werden. 17 in-vitro-Methoden sind dazu derzeit bei der europäischen Validierungsbehörde EURL ECVAM im Validierungsprozess⁽²⁾. Der wissenschaftliche Entwicklungsstand der Testbatterie selbst wird jedoch von den Forschern derzeit noch als unreif angesehen. Unter anderen sieht deshalb die Teststrategie als letzten Baustein noch die Verwendung von Fischen vor.

Im Interesse der Versuchstiere müssen die neuen Methoden so schnell wie möglich zur Anwendung kommen. Der Bundesverband Menschen für Tierrechte setzt sich auf wissenschaftlicher, politischer und gesellschaftlicher Ebene für die Abschaffung des Tierversuchs ein. Das Replacement des Jahres ist eines der Mittel, mit dem der Verband die Öffentlichkeit aufklärt.



Einführung

Das diesjährige „Replacement des Jahres“ beleuchtet den Stand der Dinge bei der Entwicklung und Anerkennung eines überwiegend tierversuchsfreien Verfahrens. Es besteht aus einer abgestuften Teststrategie. Es soll als Ersatz für Nagetiertests zur Feststellung von entwicklungsneurotoxischen Wirkungen von Substanzen verwendet werden.

Tierversuche erfolgen oft mit der Begründung, dass das Leistungsspektrum der neuentwickelten, tierversuchsfreien Verfahren noch eingeschränkt sei und sie erst zusammen mit Tierversuchen zuverlässige und ausreichende Informationen bieten. Forscher wollen diesen Umstand mit immer leistungsfähigeren tierleidfreien Methoden begegnen oder eine Kombination mehrerer Methoden entwerfen, um notwendige Informationen ohne Tier gewinnen zu können. Mit dem „Replacement des Jahres“ wollen wir ein spezifisches Problem aufzeigen: Um Tierversuche zu reduzieren und zu beenden, muss das Leistungsspektrum der tierversuchsfreien Methode(n) kontinuierlich und so schnell wie möglich weiterentwickelt werden, danach müssen die Methoden jedoch auch verpflichtend angewendet werden. Die Entwicklung darf nicht bei einer veröffentlichten Publikation aus einer Validierungsstudie stehen bleiben, das Engagement muss weitergehen.

Konkret wird für den Abbau der Tierversuche ein perfektes System zur Aktualisierung der Prüfvorschriften und des Leistungsspektrums der tierversuchsfreien Methoden gebraucht. Nur so kann verhindert werden, dass weiter Tierversuche und veraltete tierversuchsfreie Verfahren genutzt werden, obwohl es gegebenenfalls bereits bessere gibt. Mit dem „Replacement des Jahres“ zeigen wir herausragende und förderungswürdige Entwicklungen für den Bereich Ersatzverfahren zum Tierversuch auf.

Warum Entwicklungsneurotoxizität (DNT)?

Während der Schwangerschaft kann es zu einer Störung der Nervenzellentwicklung des Fötus kommen, was zu veränderten Nervenzellverbindungen führen kann. Umweltgifte können die Teilung, Differenzierung oder Migration von Nervenzellen hemmen.⁽¹⁾

Jüngste Studien haben gezeigt, dass es eine Zunahme von daraus resultierenden Erkrankungen wie Autismus, Lernbehinderungen, Aufmerksamkeitsdefizits- und Hyperaktivitätsstörungen

Foto Schwangere mit Embryo: istock/janulla; Fässer: Adobe Stock/tiero; Pestizid-sprühende Menschen in Schutzkleidung: Adobe Stock/xb100; Sprüh-Traktor: Adobe Stock/Dusan Kostic; Auspuff, Fabrik, Tabletten: Pixabay

gen gibt. Zwar sind diese Störungen auf eine Kombination aus mehreren Ursachen zurückzuführen, darunter erbliche Veranlagung, Umweltstressoren und Faktoren im Zusammenhang mit dem sozioökonomischen Status. Sowohl Labor- als auch Humanstudien haben jedoch gezeigt, dass die Exposition gegenüber schädlichen Chemikalien signifikant zu den Auswirkungen beitragen kann.⁽²⁾ Es werden sowohl Umweltchemikalien als auch Arzneimittel diskutiert. Nach Schätzungen sollen allein ca. 4% der verschreibungspflichtigen Medikamente wegen beobachteter unerwünschter neurologischer Wirkungen vom Markt genommen worden sein.⁽³⁾ Kinder sind besonders anfällig für DNT-bedingte Gesundheitsschäden, denn das sich entwickelnde Gehirn ist sehr anfällig für die negativen Auswirkungen von Chemikalien. Derzeit werden hierzu Tierversuche an der Ratte durchgeführt, sie sind der Goldstandard der DNT-Tests. Die Studien auf der Basis dieser Testrichtlinien sind jedoch bezüglich Verwendung von Tieren, Zeit und Kosten unzureichend und machen eine Extrapolation der Ergebnisse von einer Nagetierart auf den Menschen notwendig. Daher sind alternative Methoden erforderlich.⁽⁴⁾



Foto: Volker_Pietzonka_Pixabay

Gesetzliche Vorschriften für die DNT-Testung sollten EU-weit routinemäßig verpflichtend werden, sie sind es aber noch nicht

Die drei wichtigsten Leitlinien der Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (OECD), die eine Lebensphasen-abhängige Neurotoxizität betrachten, sind die OECD-Testrichtlinie 424 (Neurotoxizität) mit Studien an Nagetieren, die Testrichtlinie 426 (Entwicklungsneurotoxizitätsstudie) mit Nagetieren sowie die Testrichtlinie 443 (Erweiterte Ein-Generationen-Reproduktions-toxizitätsstudie). Zusätzlich gibt es einen begleitenden Leitfaden für die Neurotoxizitätsprüfung, der sich mit dem Studiendesign und der Auswahl zusätzlicher oder alternativer In-vivo- oder In-vitro-Prüfverfahren befasst. Ziel der Studien ist es, Chemikalien zu identifizieren, die das Nervensystem dauerhaft oder reversibel beeinträchtigen können, chemisch induzierte Veränderungen im Nervensystem zu charakterisieren und die Dosierungen (Ausgangspunkte) für regulatorische Anwendungen zu bestimmen.⁽⁵⁾

Weder in der EU noch in den USA sind jedoch derzeit routinemäßig DNT-Tests vorgeschrieben, es sei denn, in vorhergehenden Studien wurden Hinweise auf Neurotoxizität oder endokrine Effekte bei Substanzen in adulten Nagetieren gefunden. Jedoch schreiben die USA Neurotoxizitätsstudien zur Beurteilung von Pestiziden vor.⁽⁵⁾

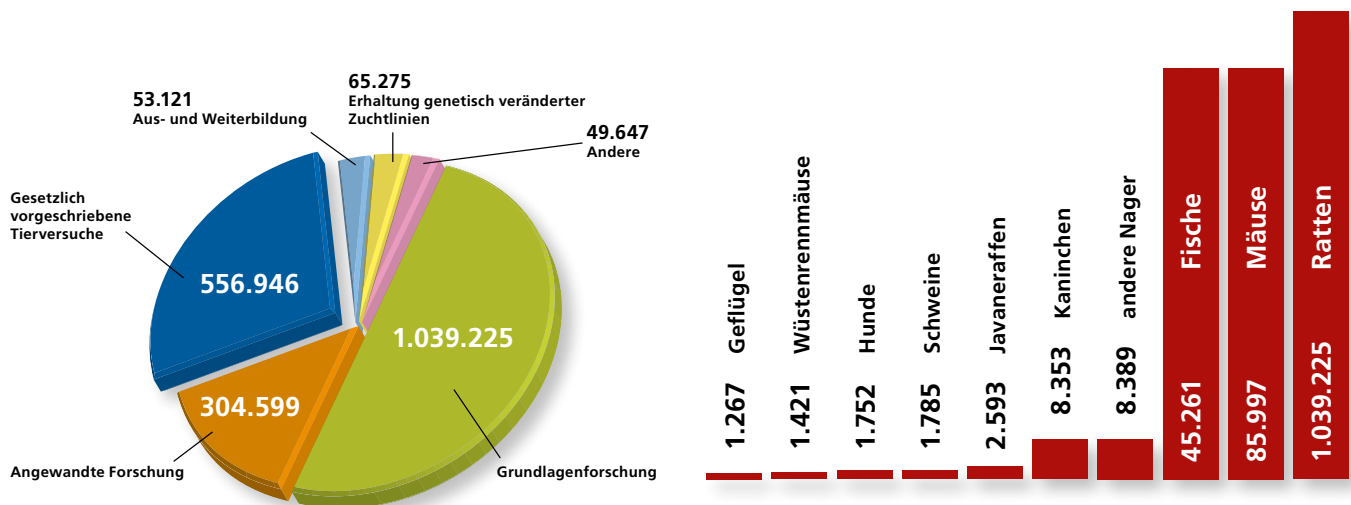
Pestizide werden als mögliche Auslöser für neurotoxische Einflüsse diskutiert.



Foto: Erich Westendarp, Pixabay.

Welche Tierversuche werden durchgeführt und welche Spezies dabei eingesetzt?

In-vivo-Studien auf Entwicklungsneurotoxizität bedeuten die Verwendung einer hohen Anzahl von Tieren, sie sind kosten- und zeitintensiv.^(6, 7) Bevorzugte Tierart ist die Ratte. Andere Tierarten können in begründeten Fällen eingesetzt werden. Derartige Tests werden durchgeführt, wenn in vorherigen routinemäßigen Untersuchungen Störungen bei der Cholinesterase (Leberschäden) oder Veränderungen bei den Schilddrüsenhormonen oder im Östrogenhaushalt gefunden wurden. Wissenschaftler wie *Prof. Marcel Leist*, der selbst an DNT forscht, kritisieren jedoch, dass die meisten entwicklungsneurotoxischen Phänomene, wie z.B. Sprachstörungen, eine Beeinträchtigung der Aufmerksamkeitsdauer oder der IQ am Tier gar nicht gemessen werden können.⁽⁸⁾



Anzahl der Tiere, welche 2017 in Deutschland in Tierversuchen verwendet wurden

Laut Statistik des BMEL, Quelle: https://www.bmel.de/DE/Tier/Tierschutz/_texte/TierschutzTierforschung.html?docid=1185087

Anzahl der Tiere nach Spezies, welche 2017 in Deutschland für Sicherheits- und Giftigkeitsprüfungen verwendet wurden

Laut Statistik des BMEL, Quelle: https://www.bmel.de/DE/Tier/Tierschutz/_texte/TierschutzTierforschung.html?docid=11850874

Die wesentliche Studie ist die OECD Testrichtlinie 426

Jede Test- und Kontrollgruppe sollte eine „ausreichende“ Anzahl von schwangeren Weibchen enthalten, die der Prüfsubstanz ausgesetzt werden, um sicherzustellen, dass eine „ausreichende“ Anzahl von Nachkommen für die Bewertung der Neurotoxizität produziert wird. Insgesamt werden 20 Würfe pro Dosisstufe empfohlen. Das Testmittel wird den Muttertieren in drei Dosen zzgl. Kontrolle mindestens täglich ab dem Zeitpunkt der Einnistung des befruchteten Eis bis zum 21.Tag der postnatalen Entwicklung (während der Säugung) verabreicht. Vergaberoute ist nach Möglichkeit die, der auch schwangere Frauen ausgesetzt sein könnten. Dadurch sind die Welpen während der prä- und postnatalen neurologischen Entwicklung der Prüfsubstanz ausgesetzt.⁽⁹⁾ Es werden mehr als 20 Weibchen behandelt, um wenigstens 20 trüchtige Tiere zu erhalten. Die Muttertiere werden auf Auswirkungen der Prüfsubstanz auf Schwangerschaft und Stillzeit untersucht.

Auf diese Weise werden wenigstens 80 Muttertiere, mit je geschätzten Nachkommen bis zu 12, also mit bis zu 960 Welpen benötigt (ca. 1040 Ratten). Um die Größe der Würfe statistisch zu



Foto: Adobe Stock/libreakstock

vereinheitlichen, werden überzählige Welpen nach dem Zufallsprinzip zunächst „eliminiert“⁽⁹⁾, also getötet. Ein Wurf sollte dann noch je die gleiche Anzahl an männlichen und weiblichen Welpen haben. Zur Beurteilung der Entwicklungsneurotoxizität werden von den Welpen nach dem Zufallsprinzip Tiere ausgewählt und in einer Batterie verschiedener Tests untersucht.

Klinischen Beobachtungen und der Untersuchung des Körpergewichts werden alle Tiere unterzogen. Je ein Welp pro Geschlecht und Wurf wird für detaillierte klinische Betrachtungen, Wiegen des Gehirngewichts (nach Hirngewebefixierung) im Stadium der postnatalen Entwicklung am 11. bis 22. Tag, Gehirngewichtsmessung (unfixiert) am 70. Tag der postnatalen Entwicklung (sexuelle Reifung), neuropathologische Untersuchungen am 11. bis 22. Tag und für neuropathologische Untersuchungen am 70. Tag der postnatalen Entwicklung verwendet.



Foto: Adobe Stock/Eric Isselée

Optional erfolgen Untersuchungen zur verhaltensbezogenen Ontogenie, motorischen Aktivität, motorischen und sensorischen Funktion, zu Lernen und Gedächtnis. Am Ende werden alle getötet, die Muttertiere schon nach dem Absetzen der Welpen.

Die Entwicklung des Gehirns

Die Entwicklung des menschlichen Gehirns ist ein äußerst komplexer und sensibler Vorgang. Wird der Embryo beziehungsweise der Fötus oder das Kind in den entscheidenden Phasen einer schädlichen Substanz ausgesetzt, kann es leicht zu Störungen kommen. Die Entwicklung des Gehirns beginnt ca. ab der dritten Woche nach der Empfängnis. Die sogenannte Keimscheibe gliedert sich zunächst in zwei embryonale Keimblätter: Ektoderm und Entoderm. Das dritte Keimblatt, das Mesoderm, entsteht um den 15. Tag durch Einwanderung von Ektodermzellen in die Mitte der Keimscheibe und der dadurch gebildeten Primitivrinne. Von der Primitivrinne ausgehend wird auch die Anlage des Nervensystems, das sogenannte Neuralrohr angelegt (zusammengefasst in (10)). Das hintere Ende des Neuralrohrs wird später zum Rückenmark. Am vorderen Ende lösen sich Zellgruppen ab und bilden die Neuralleisten

des Kopfes. Das röhrenförmige System verändert sich nun durch eine Welle migrierender Neuroblasten, die Nerven-Vorläuferzellen. Das Neuralrohr krümmt sich am Kopf-Ansatz und bläht sich zunächst in drei, dann in fünf Hirnbläschen auf: in das Telencephalon (Endhirn, später Großhirn), Diencephalon (Zwischenhirn), Mesencephalon (Mittelhirn), Metencephalon (Hinterhirn, später Pons, Kleinhirn) und Myelencephalon (Nachhirn, später Markhirn) (siehe Abb. 1).

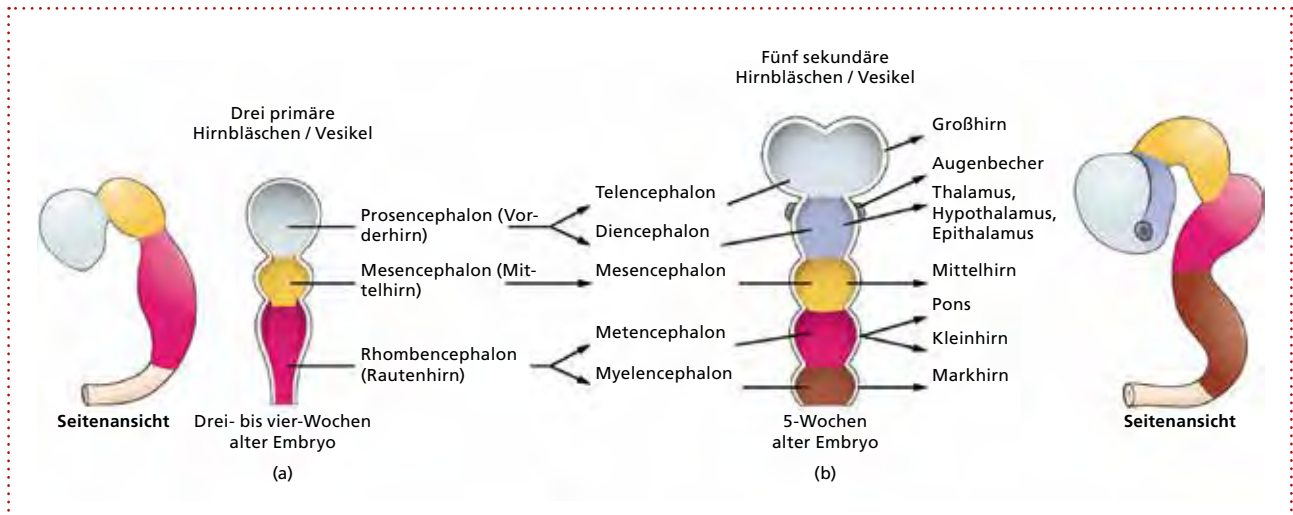


Abb. 1: Primäre und sekundäre Vesikel-Stadien der Entwicklung: Hirnbläschen im 3-Wochen (a) und 5-Wochen (b) alten menschlichen Embryo sowie die sich daraus entwickelnden Gehirnabschnitte.
 Quelle: „Primary and Secondary Vesicle Stages of Development“ von Philschatz auf der Website der Lecturio GmbH: <https://www.lecturio.de/magazin/diencephalon/> Lizenz: Attribution 4.0 International (CC BY 4.0)

90 Milliarden Neuronen

Jeder dieser Bereiche besitzt Zonen, in denen Neuronen und Gliazellen erzeugt werden. Die Zellen wandern anschließend zu ihren endgültigen Positionen. Die Kortexplatte, Vorläufer der Hirnrinde (Kortex), wächst von etwa einer Milliarde Zellen in der 13. Schwangerschaftswoche auf ungefähr sechs Milliarden in der 20. Woche an.⁽¹¹⁾ Sobald sich die Neuronen positioniert haben, sprießen ihre Axone, die Fortsätze der Nervenzellen, die elektrische Nervennimpulse vom Zellkörper weg leiten. Die Axone navigieren durch das Gehirn, wobei sie sich verzweigen und Synapsen bilden. Neuronen und Synapsen werden in vielen Regionen übermäßig produziert, später werden die nicht benötigten abgebaut.⁽¹²⁾ Der Kortex ist im reifen Zustand in sechs horizontalen Schichten von insgesamt 2-4 mm Dicke organisiert und besteht aus ca. 20-25 Milliarden Neuronen und ca. 30-40 Milliarden Gliazellen, den multifunktionalen Stützzellen des Nervensystems.

Hirnentwicklung bis zum 20. Lebensjahr

Mit der Geburt ist die Entwicklung des Gehirns nicht abgeschlossen. Zu diesem Zeitpunkt ist zwar die große Mehrheit der Neuronen vorhanden, die Gewichts- und Größenzunahme des Gehirns hält aber bis um das 20. Lebensjahr an und beruht unter anderem auf der enormen Zunahme der Nervenzellverbindungen.⁽¹³⁾ Wissenschaftler gehen heute von etwa 86 Milliarden Neuronen im ausgewachsenen Gehirn aus.⁽¹⁴⁾ Die komplexen Vorgänge von Teilung, Differenzierung, Migration und Verbindung von Neuronen sind sehr anfällig gegenüber äußeren Einflüssen.

Große Unterschiede des Gehirns zwischen Mensch und Tier

Gehirne von Nagetieren und Menschen unterscheiden sich deutlich in Größe und Organisation (siehe Abb. 2, Seite 10), und insbesondere in der strukturellen und funktionellen Anordnung des Kortex (Großhirnrinde). Als ein Grund für die menschliche Intelligenz wird die erhöhte kortikale Größe und komplexe Strukturierung durch Furchen und Windungen angenommen (bewertet in (15, 16)). Nagetieren fehlt diese Strukturierung (bewertet in (17)). Außerdem unterscheidet sich die Zellarchitektur. So fehlt zum Beispiel eine Hirnschicht, die granuläre Schicht IV, die bei Primaten hingegen gut ausgebildet ist.⁽¹⁸⁾ Auch wenn sonst die Anordnung der Hauptzelltypen auf der mikroskopischen Ebene ähnlich ist, ist bei Menschen die funktionale Vielfalt größer.⁽¹⁷⁾ Kürzlich wurde festgestellt, dass menschliche Neuronen, im Vergleich zu denen der Ratte, elektrische Signale auf andere Weise übertragen, was vermutlich die Leistung einzelner Neuronen und insgesamt die kognitiven Funktionen erhöht. Als entscheidend werden spezielle Ionenkanäle angenommen, die in den menschlichen Neuronen vermehrt vorkommen.^(19, 20)



Differenzen bei der Hirnreifung

Auch Speziesunterschiede bei der Hirnreifung machen einen Vergleich schwierig. Bei der Neurogenese, der Bildung von Nervenzellen, stimmen bei Ratten die Tage 18 und 21 nach Befruchtung mit den Wochen 8 bis 9 beziehungsweise 15 bis 16 bei Menschen überein. Das Timing unterscheidet sich jedoch erheblich zwischen den Hirnregionen.⁽²¹⁾ Außerdem weist die Signalübertragung bei der neurologischen Entwicklung im Menschen einzigartige Merkmale auf. Darüber hinaus gibt es viele Beispiele für artspezifische Unterschiede in der molekularen Ausstattung von Zellen, die die Wirkung von Substanzen bestimmen können.⁽²²⁾

Zellen reagieren teilweise anders

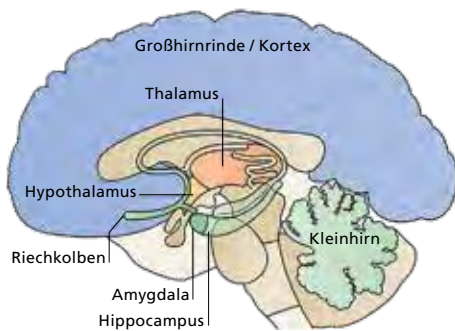
So wurden bedeutende Artunterschiede bei der Entwicklungsneurotoxizität zwischen Nagetier und Mensch mit in-vitro-Testsystemen gefunden. Das Forscherteam von Prof. Ellen Fritsche vom Leibniz-Institut für umweltmedizinische Forschung in Düsseldorf untersuchte mit sogenannten Neurosphären von Mensch und Maus den Einfluss von pharmakologisch wirksamen Stoffen, darunter Umweltchemikalien, auf die Frühentwicklung des Gehirns. Die Vorläuferzellen zeigten zum Beispiel unterschiedliche Reaktionen auf das Schilddrüsenhormon T3, welches wichtig für die Differenzierung und Ausreifung von Neuronen ist. Bei Mauszellen fördert es die Differenzierung von Gliazellen, nicht jedoch bei den menschlichen Zellen. Als Gliazellen werden alle Zellen des Nervensystems bezeichnet, die Nervenzellen unterstützen, selbst aber keine Nervenzellen sind. Pentabromdiphenylether (BDE-99), ein Flammschutzmittel, reduzierte die Bildung von humanen und murinen Gliazellen konzentrationsabhängig.⁽²³⁾

Menschliche Zellen 7x empfindlicher

Das Flammschutzmittel Pentabromdiphenylether (BDE-99) reduzierte beispielsweise je nach Konzentration die Bildung von Gliazellen bei Mensch und Maus, wobei die menschlichen Zellen siebenmal empfindlicher waren. Ascorbinsäure wirkte diesem Verlust nur in menschlichen, nicht aber in den Mauszellen entgegen, was auf unterschiedliche Wirkmechanismen von BDE-99 in den Spezies hinweist.⁽²³⁾ Diese Beispiele verdeutlichen die eingeschränkte Vorhersagekraft von Nagetierversuchen für die DNT bei Menschen.

Anatomie des Gehirns von Mensch und Nagetier

Das menschliche Gehirn



Manche Regionen wie die Substantia nigra sind nicht gezeigt, da sie durch andere Strukturen verdeckt sind.

Das Nagetiergehirn

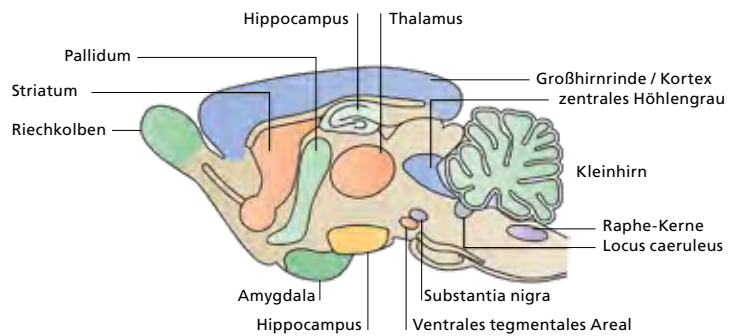


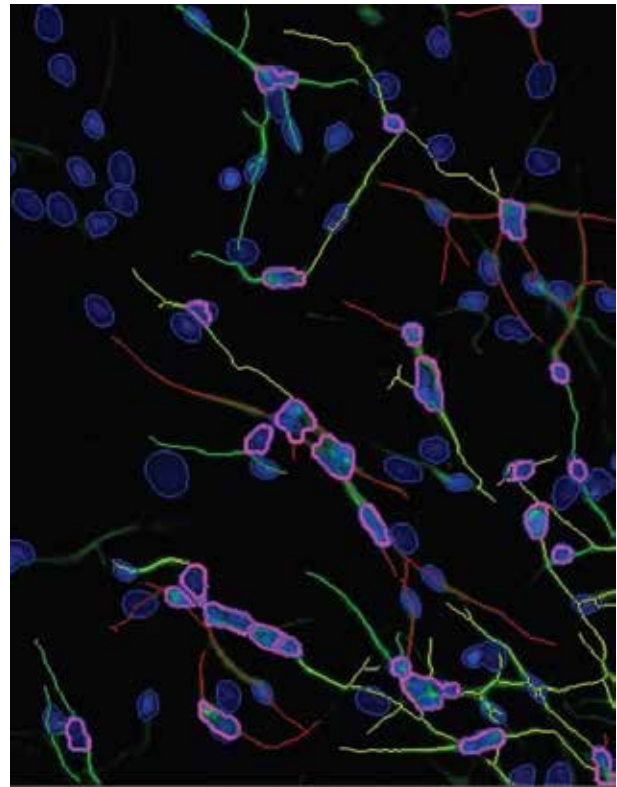
Abb. 2: Anatomie des Gehirns von Mensch und Nagetier. Reproduziert mit Erlaubnis von „The Company of Biologists Ltd.“ aus: Ellenbroek, B., & Youn, J. (2016). Rodent models in neuroscience research: is it a rat race? *Disease models & mechanisms*, 9(10): 1079-1087.

Am Horizont: In-vitro-, in-silico-Verfahren, abgestufte Teststrategie

Ein Forscherteam unter der Leitung von Prof. Ellen Fritsche vom Leibniz-Institut für umweltmedizinische Forschung (IUF) in Düsseldorf untersuchte mit Hilfe sogenannter Neurosphären aus neuronalen Stammzellen und induzierten pluripotenten Stammzellen des Menschen (hiP-SCs), der Maus und der Ratte den Einfluss von Umweltchemikalien auf die Frühentwicklung des Gehirns. Vergleichbar den embryonalen Stammzellen können sich neurale Stammzellen selbst erneuern und sind unbeschränkt lebensfähig. Sie unterscheiden sich jedoch von den embryonalen Stammzellen hinsichtlich ihres Differenzierungspotenzials, da sie sich lediglich in die drei dominanten Zelltypen des Gehirns entwickeln können, in Astrozyten, Oligodendrozyten und Neuronen. Neuronale Stammzellen können in Form von Einzelzellsuspensionen und auch in dreidimensionalen Zellaggregaten, sogenannten Neurosphären, kultiviert werden.⁽²⁴⁾ In vitro gezüchtet bilden sie eine Kugelform (Neurosphären). Sie simulieren den Prozess der Gehirnentwicklung.⁽²⁵⁾

Es gibt Firmen, die menschliche neuronale Vorläuferzellen züchten. Sie können daher käuflich erworben werden und zu Testzwecken, können sie käuflich erworben werden und zu Testzwecken, z. B. zur Untersuchung von Substanzen auf entwicklungsneurotoxische Einflüsse, genutzt werden. In der Arbeitsgruppe von Prof. Fritsche wurde solch ein dreidimensionales

Zellsystem aus humanen neuronalen Vorläuferzellen entwickelt. Mit diesem Verfahren lassen sich Pestizide oder andere Chemikalien auf ihre Beeinträchtigung von Nervenzellen testen. Untersucht wurden Zellproliferation (Zellteilung), Zelldifferenzierung, Zellmigration und Apoptose – alles Vorgänge, die sich im entwickelnden Gehirn abspielen.⁽²⁶⁾



*Normale humane neurale Progenitorzellen differenzieren zu Neurozyten, Astrozyten und Oligodendrozyten. Zu sehen sind Neurozyten (mit dem Marker β (III)Tubulin grün gefärbt) und Astrozyten (mit dem Marker GFAP rot gefärbt).
Foto: IUF*

Astrozyten, ein Zelltyp der grauen und weißen Substanz des Gehirns, haben eine wichtige Funktion bei der Ernährung von Nervenzellen durch ihren Kontakt zu den Blutgefäßen. Sie transportieren z. B. das Schilddrüsenhormon über die Schilddrüsenrezeptoren in das Nervengewebe.⁽²⁷⁾ Dieses Hormon ist bei Wachstum, Entwicklung und Funktion des Zentralnervensystems beteiligt.⁽²⁸⁾ Das von der Schilddrüse produzierte Hormon 3,3',5-Trijodthyronin (T3) beeinflusst sowohl den Differenzierungs- als auch den Reifeprozess von Nervenzellen.⁽²⁸⁾ Unter T3-Einfluss in vitro beenden Vorläuferzellen die Zellteilung und beginnen sich zu differenzieren. Das Hormon fördert zudem die Ausreifung der Zellen und das Längenwachstum der Zellfortsätze und deren Verzweigung. Funktionsstörungen der Schilddrüse haben so deutlichen Einfluss auf die Entwicklung der weißen Substanz im Zentralnervensystem. Die Wirkung von T3 wird durch die Bindung des Hormons an seinen Rezeptor (TR) vermittelt. Der TR fungiert nach der Bindung des Liganden (Hormons) als Transkriptionsfaktor, indem er an eine regulatorisch wirkende DNA-Sequenz bindet und dadurch die Genexpression reguliert.⁽²⁹⁾

Ein möglicherweise geeigneter Test für DNT ist der NeuriTox-Test aus der Arbeitsgruppe von Prof. Marcel Leist, Leiter des Doerenkamp-Zbinden-Lehrstuhls an der Universität Konstanz. Er basiert auf einer Zelllinie von humanen immortalisierten neuronalen Zellen des Mittelhirns, den sogenannten LUHMES-Zellen. Um die Eignung für Tests zu beurteilen, wurde bereits eine Vielzahl an Substanzen untersucht („gescreent“).⁽³⁰⁾ In einem Subtyp dieser Zelllinie hat Dr. Stefan Schildknecht von der Universität Konstanz ein Fluoreszenzgen in die Mitochondrien der Zellen eingebracht, um die Bewegung von Mitochondrien zur Einschätzung einer Degeneration von Nervenzellen durch Testsubstanzen verfolgen zu können.⁽³¹⁾ Der Test ist soweit weiterentwickelt worden, dass er im Hochdurchsatzverfahren eingesetzt werden kann.⁽³²⁾

Völlig ohne Tierversuch geht es auch in der Teststrategie noch nicht

Seit 2005 entwickeln internationale Forscher Konzepte zur Anwendung und Interpretation alternativer Methoden mit dem letztlichen Ziel der regulatorischen Anwendung.⁽³⁶⁾ Die neue, angestrebte Methode zum Ersatz des Tierversuchs besteht grob aus einer abgestuften Teststrategie:

Stufe 0: Toxikokinetische Modellierung

Stufe 1: In vitro Tests mit humanen Zellen

Stufe 2: Tests an alternativen Modellorganismen

Stufe 3: In vitro Tests an Nagetierzellen

Stufe 4 (optional): in vivo-Tests mit Nagetieren, wobei dieser Tierversuch nur als allerletztes Instrument vorgesehen ist.⁽³³⁾

Untersuchungen mit alternativen Modellorganismen (nicht-Säugetierarten) haben gezeigt, dass einige grundlegende Mechanismen bei der Entwicklung und Funktion des Nervensystems stammesgeschichtlich konserviert wurden und viele der grundlegenden molekularen Entwicklungsprozesse bei Säugetieren einschließlich dem Menschen und Nicht-Säugetieren, wie z.B. kleine Fischmodelle, wie der Zebra- oder Reifisch, identisch sind. Die Fische werden seit einigen Jahren insbesondere zum Screening von neuroentwicklungsrelevanten Chemikalien und für Verhaltensstudien herangezogen. Aufgrund seiner geringen Größe und Transparenz während der Embryogenese hat sich der Zebrafisch etabliert und gilt bereits als Alternative zum traditionellen in-vivo-DNT-Screening.⁽³⁴⁾ Verhaltenstests mit Zebrafischen in frühen Entwicklungsstadien (0-5 Tage nach der Befruchtung) gelten nach EU-Gesetzgebung nicht als Tierversuch. Der Test gilt als Gesamtorganismus-Ansatz ergänzend zu in-vitro-Tests.⁽³⁵⁾ Aus diesem Grunde wird er zur Untersuchung von Störungen beim Verhalten auch ein Bestandteil der DNT-Teststrategie sein.

Wie weit ist der Stand der Umsetzung?

Regulationsbehörden wie z.B. die European Food Safety Authority (EFSA) arbeiten mit Wissenschaftlern und Wissenschaftlerinnen zusammen an einer kosteneffizienten Strategie auf Basis einer zuverlässigen in-vitro-Testbatterie, um DNT-Gefahren ermitteln und Maßnahmen zur Verringerung der Exposition gegenüber diesen Chemikalien einleiten zu können.⁽²⁶⁾ Dabei sollen die komplexen Prozesse der Gehirnentwicklung in einzelne räumlich und zeitlich getrennte Entwicklungsschritte zerlegt und für jeden Schritt einzelne Tests entwickelt werden.⁽³⁸⁾ Zu den Schlüsselereignissen der Gehirnentwicklung gehören z.B. die Stammelldifferenzierung, Zellteilung und Apoptose von Stammzellen des neuronalen Typs, Wanderungsbewegungen der neuronalen Stammzellen an den Ort ihrer Bestimmung, Differenzierung und Reifung von Nerven- und Gliazellen, Synapsen- und Netzbildung. Mit einer Batterie mehrerer in-vitro-Tests lassen sich nach diesem Konzept Substanzen auf ihren Einfluss auf all diese Entwicklungsschritte sowie auf regionsspezifische Eigenschaften des Gehirns oder auf molekulare Aspekte von hormonell beeinflussten bzw. geschlechtsspezifischen neuronalen Zellfunktionen hin untersuchen.

Testbatterie für räumlich und zeitlich getrennte Entwicklungsschritte

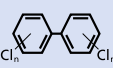
Entwicklungsprozesse	Entwicklungszeitraum →	1. Trimester	2. Trimester	3. Trimester	Postnatal	Kindheit	Tests vorhanden (+)/ nicht vorhanden (-)
Erste Schritte der Embryonalentwicklung	Nervenvorläuferzellen-Bildung und Vermehrung	—					+
Gehirn-entwicklung	Nervenzellenbildung		—				+
	Zellspezialisierung Zellverbindungen		—	—			+
	Zellwanderung Bildung von Synapsen		—	—	—		+
	Ausbau des neuronalen Netzwerks Verbindungen zwischen Hirnregionen			—	—	—	+
						—	-
Hirn und zentrales Nervensystem (ZNS)	1) Blut-Hirn-Schranke 2) Anatomische, kognitive Komplexität 3) Verhaltenskomplexität						+
	Mechanismen für die Entwicklung und Aufrechterhaltung des ZNS	—	—	—	—	—	+

Vereinfachter Auszug aus dem Schema für den Aufbau einer Testbatterie auf Basis der schrittweisen Entwicklung des Gehirns.

Die Grafik stellt dar, welche Schritte schon durch gute Tests abgedeckt sind (+) und für welche noch Verfahren entwickelt werden müssen (-). Die Entwicklungsschritte des Gehirns und Nervensystems werden einzeln betrachtet und Tests für eine mögliche schädliche Beeinflussung durch Substanzen entwickelt. Die roten Linien zeigen, in welchem zeitlichen Abschnitt der Entwicklung der jeweilige Schritt hauptsächlich abläuft und besonders angreifbar ist. Die Prozesse laufen teilweise parallel und sind nicht während der gesamten Dauer anfällig für Schädigungen. So wird schrittweise die gesamte Entwicklung abgedeckt.

Abb. 3: Vorgeschlagene Testbatterie auf Basis der schrittweisen Entwicklung des Gehirns. In Anlehnung an Hessel et al. (2018). *Toxicology and Applied Pharmacology*: 136–152.

Eine große Rolle spielt hier die sogenannte Adverse Outcome Pathway-(AOP) Konzeption. AOPs beschreiben Vorgänge, die von einem auslösenden molekularen Ereignis an der Zelloberfläche ausgehen. Dieses molekulare Ereignis bewirkt einen chemischen Stressfaktor, der eine Kaskade biologischer Reaktionen durch verschiedene biologische Ebenen aufwärts (Organell, Zelle, Gewebe, Organ, Gesamtorganismus) auslöst. Dies führt wiederum im Laufe der Zeit zu einem schädigenden Effekt. Ist einer dieser AOPs bei der Substanztestung nachweislich betroffen, ließe das Rückschlüsse auf die DNT-Eigenschaften der Substanz zu. Allerdings sind die Untersuchungsziele zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht vollständig entwickelt.⁽³⁶⁾

Toxisches Molekül	Makromolekulare Interaktion	Zellreaktion	Organreaktion	Organismusreaktion	Populationsreaktion
	z. B. Rezeptor-Liganden-Bindung	<ul style="list-style-type: none"> • Genaktivierung • Proteinproduktion • Veränderung Signalweg 	<ul style="list-style-type: none"> • Veränderung Physiologie • Homöostase • Gewebeentwicklung/-funktion 	<ul style="list-style-type: none"> • Lethalität • Entwicklungsstörung • Reproduktionsstörung 	<ul style="list-style-type: none"> • Änderung Zusammensetzung • Aussterben

Adverse Outcome Pathway (AOP) Konzeption nach OECD

Abb. 4: Bei der Adverse Outcome Pathway-(AOP) Konzeption geht es darum, den gesamten Vorgang zu beschreiben ausgehend von einem ursprünglichen Ereignis auf zellulärer Oberfläche Schritt für Schritt über die anschließende Wirkungskaskade auf Ebene der Zellen und Organe, bis hin zu dem letztendlichen Effekt auf den Gesamtorganismus zu beschreiben.

Der wissenschaftliche Entwicklungsstand der Testbatterie selbst wird von den Forschern derzeit noch als unreif angesehen. Zwar können wichtige Schlüsselereignisse wie Nervenzellteilung, Apoptose und Wanderung der Nervenvorläuferzellen schon gut dargestellt werden. Die Differenzierung und Untersuchung der Funktion der Gliazellen – einem wichtigen Immunzelltyp des Gehirns – und die Bildung und elektrische Aktivität neuronaler Netzwerke jedoch stecken noch in den Kinderschuhen. Hierfür werden derzeit hirnregionsspezifische Organoiden entwickelt.⁽³⁷⁾

Ein anderes wichtiges Thema, das bislang noch wenig untersucht wurde, ist der Zusammenhang zwischen Hormonen, Gehirnentwicklung und störenden Chemikalien. Endokrin wirksame Chemikalien stehen im Verdacht, die Neuroentwicklung zu beeinträchtigen. Der hormonelle Einfluss ist vielfältig und Störungen der Östrogen-, Androgen-, Progesteron- sowie Endocannabinoid-Signalwege könnten Auswirkungen auf das sich entwickelnde Gehirn in bestimmten Entwicklungsstadien haben.⁽³⁷⁾

Den Angaben von Industrievertretern aus EU und den USA zufolge besteht ein mehrfach geäußertes, großer Bedarf an alternativen Methoden, um zeit- und kosteneffizienter Substanzen produzieren zu können, die nicht entwicklungsneurotoxisch sind.⁽²⁶⁾ Dieser Bedarf kann nur durch neue, tierversuchsfreie Verfahren gedeckt werden.

Einschätzung der Regulatorik

Für Regulationsbehörden stehen vor allem praktische wissenschaftliche Fragen wie Qualitätskontrolle, Reproduzierbarkeit, Sensitivität, Spezifität, Vorhersagefähigkeit und Expositionsbetrachtungen im Vordergrund.⁽²⁶⁾ In einer Reihe von Workshops der letzten zehn Jahre wurden die Entwicklung von In-vitro-Assays oder -Methoden unter Verwendung alternativer Modellorganismen unterstützt. Unter den Referenten der verschiedenen Zulassungsbehörden herrschte Einigkeit über eine Unterstützung der Umsetzung einer standardisierten DNT-in-vitro-Teststrategie aus einer Reihe von in-vitro-Tests vor den angestrebten in-vivo-Tests, d. h. der Tierversuch als solches ist nicht vollständig ausgeschlossen, aber weitgehend reduziert.

Es gibt bereits Tests, mit denen Substanzen gescreent werden können. Jedoch sind die Tests noch nicht geeignet, um gesundheitsbezogene Grenzwerte ableiten und letztendlich den Tierversuch beenden zu können. Hier reiche das Vertrauen noch nicht aus, es gäbe noch Unsicherheiten bezüglich der neuen, tierversuchsfreien Methoden. Daher ist der gegenwärtige Arbeitsstand, Leistungsstandards und eine Prüfstrategie für das abgestufte Testsystem zu etablieren, das aus einer Mehrzahl an in-vitro-Methoden und einem in-vivo-Versuch mit dem Zebrafisch bestehen soll.⁽²⁶⁾ Aber auch in silico stehen viele Methoden zur Verfügung oder befinden sich in der Entwicklung, um humanspezifische molekulare und zelluläre Wirkungen von Chemikalien zu untersuchen und in Vorhersagemodelle für die Entwicklungsneurotoxizität zu integrieren.⁽³⁰⁾

Gemeinsam mit der European Food Safety Authority (EFSA), der Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (OECD), der amerikanischen Environmental Protection Agency (EPA) und Wissenschaftlern weltweit entwickelt die europäische Validierungsbehörde EURL ECVAM derzeit eine Strategie mit Schwerpunkt auf einer Reihe von in-vitro-Methoden, vorzugsweise auf Basis von humaninduzierten pluripotenten Stammzellen. Diese Methoden sollen die Bewertung von Chemikalien hinsichtlich ihrer Wirkung auf kritische Neuroentwicklungsprozesse in unterschiedlichen Hirnentwicklungsstadien untersuchen. Die verfügbaren in-vitro-Assays sollen zusammen mit in-silico-Methoden, Nicht-Säugetier-Modellen sowie vorhandenen tierischen und menschlichen Daten in sogenannte Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA) eingebaut werden. Dieser Ansatz wurde auch in ein OECD-Projekt übernommen, das die Entwicklung eines OECD-Leitfadens für die in-vitro-Methoden zur DNT-Testung zum Ziel hat. Das Projekt wird von der EFSA, EURL ECVAM und der US-EPA gemeinsam geleitet.⁽³⁾ Der EFSA kommt u. a. als zuständige Überwachungsbehörde für Pestizide eine bedeutende Rolle zu.

17 in-vitro-Methoden sind derzeit bei EURL ECVAM im Validierungsprozess.⁽²⁾ Es wird fest davon ausgegangen, dass eine Verwendung von derzeit verfügbaren human-relevanten in-vitro-Modellen aus induzierten pluripotenten Stammzellen, in Kombination mit den anderen vorgeschlagenen tierfreien Modellen, Ansätze zur Entwicklung von Vorhersagemodellen für DNT-Effekte liefern wird.⁽²⁾

Weiteres Vorgehen

Die bereits entwickelten Methoden müssen so schnell wie möglich zur Anwendung kommen. Der Bundesverband Menschen für Tierrechte setzt sich auf wissenschaftlicher, politischer und gesellschaftlicher Ebene für die Abschaffung des Tierversuchs ein. Das Replacement des Jahres ist eines der Mittel, mit dem der Verband die Öffentlichkeit aufklärt und konkrete Lösungsmöglichkeiten aufzeigt. Um sein Ziel zu erreichen, hat der Verband einen umfangreichen Maßnahmenkatalog zusammengestellt und fordert von der Politik eine Gesamtstrategie für eine tierleidfreie Wissenschaft.

Ganz oben auf der Liste der notwendigen Maßnahmen steht der massive Ausbau der tierversuchsfreien Forschung, insbesondere durch die massive Erhöhung der Forschungsgelder innerhalb Deutschlands und in der EU. Nur so kann eine erfolgreiche Entwicklung der neuen Methoden ernsthaft verfolgt werden.

Ebenso unentbehrlich sind neue Kriterien bei der Vergabe von Fördermitteln sowie die Förderung von Nachwuchswissenschaftlern und -wissenschaftlerinnen. Deshalb ist die Einrichtung von Lehrstühlen und Professuren für eine tierversuchsfreie Wissenschaft, Lehre und Ausbildung ein absolutes Muss. Eine weitere wichtige Begleitmaßnahme ist das Verbot bestimmter Tierversuche. Verbotsregelungen für Tierversuche sind schon heute EU-rechtlich möglich, auch wenn noch keine tierversuchsfreien Methoden vorhanden sind. Hierzu gehört insbesondere das ausnahmslose Verbot schwerbelastender Tierversuche. Auf Ebene der behördlichen Anerkennungsverfahren muss die drastische Verkürzung der Prüf- und Anerkennungszeiten für tierversuchsfreie Methoden ermöglicht werden. Derzeit dauert diese Phase zwischen sechs und 15 Jahre! Im Rahmen seines Projektes *InVitro+Jobs* stellt der Bundesverband tierversuchsfreie Verfahren sowie Wissenschaftler und Wissenschaftlerinnen vor. So trägt das Wissenschaftsportal dazu bei, die wichtigen Information zu verbreiten und die Vernetzung in diesem Bereich voranzutreiben.

Literatur

- (1) Aschner, M., Ceccatelli, S., Daneshian, M., Fritsche, E., Hasiwa, N., Hartung, T., Hogberg, H. T., Leist, M., Li, A., Mundi, W. R., Padilla, S., Piersma, A. H., Bal-Price, A., Seiler, A., Westerink, R. H., Zimmer, B. & Lein, P. J. (2017). Reference compounds for alternative test methods to indicate developmental neurotoxicity (DNT) potential of chemicals: example lists and criteria for their selection and use. *ALTEX* 34 (1): 49-74.
- (2) EURL ECVAM (2018). Status report on the development, validation and regulatory acceptance of alternative methods and approaches 2018. Publications Office of the European Union, DOI: 10.2760/818599 (online). <https://ec.europa.eu/jrc/en/publication/eur-scientific-and-technical-research-reports/eurl-ecvam-status-report-development-validation-and-regulatory-acceptance-alternative-3>
- (3) Lena Smirnova, Helena T. Hogberg, Marcel Leist & Thomas Hartung (2014). Food for Thought ...: Developmental Neurotoxicity – Challenges in the 21st Century and In Vitro Opportunities. *ALTEX* 31 (2): 129–156.
- (4) Baumann, J., Gassmann, K., Masjosthusmann, S., DeBoer, D., Bendt, F., Giersiefer, S. & Fritsche, E. (2016). Comparative human and rat neurospheres reveal species differences in chemical effects on neurodevelopmental key events. *Arch Toxicol.* 2016 Jun;90(6):1415-27. doi: 10.1007/s00204-015-1568-8
- (5) Bal-Price, A., Crofton, K. M., Leist, M., Allen, S., Arand, M., Buetler, T., Delrue, N., Fitzgerald, R. E., Hartung, T., Heinonen, T., Hogberg, H., Hougaard Bennekou, S., Lichtensteiger, W., Oggier, D., Paparella, M., Axelstad, M., Piersma, A., Rached, E., Schilter, B., Schmuck, G., Stoppini, L., Tongiorgi, E., Tiramani, M., Monnet-Tschudi, F., Wilks, M. F., Ylikomi, T. & Fritsche, E. (2015). International Stakeholder NETWORK (ISTNET): creating a developmental neurotoxicity (DNT) testing road map for regulatory purposes. *Arch Toxicol* 89: 269–287. DOI 10.1007/s00204-015-1464-2
- (6) Crofton, K., Fritsche, E., Ylikomi, T & Bal-Price, A. (2014). International Stakeholder NETWORK (ISTNET) for Creating a Developmental Neurotoxicity Testing (DNT) Roadmap for Regulatory Purposes. *Altex* 31, 2/14: 223-224.
- (7) Tohyama, C. (2016). Developmental neurotoxicity test guidelines: problems and perspectives. *The Journal of Toxicological Sciences* 41, Special Issue SP69-SP79. doi: 10.2131/jts.41.SP69
- (8) Leist, M. (2016). How to link test system to the prediction of developmental neurotoxicity (DNT). EFSA-Workshopbeitrag OECD/EFSA Workshop on Developmental Neurotoxicity (DNT): the use of non-animal test methods for regulatory purposes. online 18 October 2016. <http://www.efsa.europa.eu/en/events/event/161018b>.
- (9) https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-426-developmental-neurotoxicity-study_9789264067394-en
- (10) <https://opentextbc.ca/anatomyandphysiology/chapter/28-2-embryonic-development/>
- (11) Samuelsen, G. B., Larsen, K. B., Bogdanovic, N. et al. (2003): The changing number of cells in the human fetal forebrain and its subdivisions: A stereological analysis. *Cerebral Cortex* 13: 115-122. DOI: 10.1093/cercor/13.2.115
- (12) Purves, D., & Lichtman, J. W. (1985). Principles of neural development. Sunderland, Mass: Sinauer Associates.
- (13) <https://www.neurologen-und-psihiater-im-netz.org/gehirn-nervensystem/entwicklung/>
- (14) Herculano-Houzel S. (2009). The human brain in numbers: a linearly scaled-up primate brain. *Frontiers in human neuroscience*, 3, 31. doi:10.3389/neuro.09.031.2009
- (15) Hofman M. A. (2014). Evolution of the human brain: when bigger is better. *Frontiers in neuroanatomy*, 8, 15. doi:10.3389/fnana.2014.00015
- (16) Dicke, U., & Roth, G. (2016). Neuronal factors determining high intelligence. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 371(1685), 20150180. doi:10.1098/rstb.2015.0180
- (17) Snyder, J. M., Hagan, C. E., Bolon, B., & Keene, C. D. (2018). Nervous System. *Comparative Anatomy and Histology*, 403–444. doi:10.1016/b978-0-12-802900-8.00020-8
- (18) Öngür D. & Price J. L. (2000) The Organization of Networks within the Orbital and Medial Prefrontal Cortex of Rats, Monkeys and Humans, *Cerebral Cortex*, Volume 10, Issue 3, Pages 206–219. <https://doi.org/10.1093/cercor/10.3.206>
- (19) Beaulieu-Laroche, L., Toloza, E. H., van der Goes, M. S., Lafourcade, M., Barnagian, D., Williams, Z. M., Eskandar, E. N., Frosch, M. P., Cash, S. S. & Harnett, M. T. (2018). Enhanced dendritic compartmentalization in human cortical neurons. *Cell*, 175(3), 643-651. doi: 10.1016/j.cell.2018.08.045.
- (20) Kalmbach, B. E., Buchin, A., Long, B., Close, J., Nandi, A., Miller, J. A., ... & Ting J.T. (2018). h-Channels Contribute to Divergent Intrinsic Membrane Properties of Supragranular Pyramidal Neurons in Human versus Mouse Cerebral Cortex. *Neuron*, 100(5), 1194-1208. doi: 10.1016/j.neuron.2018.10.012. Epub 2018 Nov 1.
- (21) Pressler, R., & Auvin, S. (2013). Comparison of Brain Maturation among Species: An Example in translational Research Suggesting the Possible Use of Bumetanide in Newborn. *Frontiers in neurology*, 4, 36. doi:10.3389/fneur.2013.00036
- (22) Masjosthusmann, S., Becker, D., Petzuch, B., Klose, J., Siebert, C., Deenen, R., Barenys, M., Baumann, J., Dach, K., Tiggies, J., Hübenthal, U., Köhrer, K. & Fritsche E. (2018). A transcriptome comparison of time-matched developing human, mouse and rat neural progenitor cells reveals human uniqueness. *Toxicology and applied pharmacology*, 354, 40-55. doi: 10.1016/j.taap.2018.05.009. Epub 2018 May 9.
- (23) Dach, K., Bendt, F., Huebenthal, U., Giersiefer, S., Lein, P. J., Heuer, H. & Fritsche, E. (2017) BDE-99 impairs differentiation of human and mouse NPCs into the oligodendroglial lineage by species specific modes of action. *Scientific Reports* 7: 44861. DOI: 10.1038/srep44861
- (24) Moors, M. (2007): Normale Humane Neurale Progenitorzellen als in vitro Modellsystem für entwicklungsneuro-toxikologische Untersuchungen: Molekulare und zellbiologische Charakterisierung. Inaugural-Dissertation Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
- (25) Moors, M. et al. (2009): Human Neurospheres as Three-Dimensional Cellular Systems for Developmental Neurotoxicity Testing. *Environmental Health Perspectives* 117 (7): 1131-1138.
- (26) Fritsche, E., Crofton, K. M., Hernandez, A. F., Hougaard Bennekou, S., Leist, M., Bal-Price, A., Reaves, E., Wilks, M. F., Terron, A., Solecki, R., Sachana, M., Gourmelon, A. (2017). OECD/EFSA Workshop on Developmental Neurotoxicity (DNT): The Use of Non-Animal Test Methods for Regulatory Purposes. Meeting Report. *ALTEX* 34(2): 311-315. doi:10.14573/altex.1701171
- (27) Goncalves Trentin, A. (2006): Thyroid hormone and atscrocyte morphogenesis. *Journal of Endocrinology* 189: 189-197.
- (28) König, S. & Moura Neto, V. (2002): Thyroid hormone actions on neural cells. *Cell Mol Neurobiol.* 22 (5-6): 517-544.

- (29) Huber, K. (2005): Ursprung, Entwicklung und Differenzierung von Oligodendrozyten. Dissertation Universität München. http://edoc.ub.uni-muenchen.de/4250/1/Huber_Katharina.pdf
- (30) Fritsche, E., Grandjean, P., Crofton, K. M., Aschner, M., Goldberge, A., Heinonen, T., Hessel, E. V. S., Hogberg, H. T., Hougaard Bennekou, S., Lein, P. J., Leist, M., Mundy, W. R., Paparella, M., A. H. Piersma, Sachana, M., Schmuck, G., Solecki, R., Terron, A., Monnet-Tschudi, F., Wilks, M. F., Witters, H., Zurich M.-G. & Bal-Price, A. (2018). Consensus statement on the need for innovation, transition and implementation of developmental neurotoxicity (DNT) testing for regulatory purposes. *Toxicology and Applied Pharmacology* 354: 3–6.
- (31) Schildknecht, S. (2014). Etablierung von LUHMES als Zellmodell menschlicher Dopamin-Neurone. *BIOspektrum* 5/14: 583. <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs12268-014-0485-3.pdf>
- (32) Delp, J., Gutbier, S., Klima, S., Hoelting, L., Pinto-Gil, K., Hsieh, J.-H., Aichem, M., Klein, K., Schreiber, F., Tice, R. R., Pastor, M., Behl, M. & Leist, M. (2018). A High-Throughput Approach to Identify Specific Neurotoxicants / Developmental Toxicants in Human Neuronal Cell Function Assays. *ALTEX* 35/2.
- (33) <https://chemicalwatch.com/crmhub/50778/dnt-in-vitro-test-battery-agreed-at-oecdefsa-workshop>
- (34) Bal-Price, A., Pistollato, F., Sachana, M., Bopp, S. K., Munn, S. & Worth, A. (2018). Strategies to improve the regulatory assessment of developmental neurotoxicity (DNT) using in vitro methods. *Toxicology and Applied Pharmacology* 354: 7-18.
- (35) Bal-Price, A., Hogberg, H. T., Crofton, K. M., Daneshian, M., FitzGerald, R. E., Fritsche, E., Heinonen, T., Hougaard Bennekou, S., Klima, S., Piersma, A. H., Sachana, M., Shafer, T. J., Terron, A., Monnet-Tschudi, F., Viviani, B., Waldmann, T., Westerink, R. H. S., Wilks, M. F., Witters, H., Zurich, M.-G. & Leist, M. (2018). Recommendation on Test Readiness Criteria for New Approach Methods in Toxicology: Exemplified for Developmental Neurotoxicity. t4 Workshop Report. *ALTEX* 35(3): 306-352. doi:10.14573/altex.1712081
- (36) Barenys, M. & Fritsche, E. (2018). A Historical Perspective on the Use of Stem/Progenitor Cell-Based In Vitro Methods for Neurodevelopmental Toxicity Testing. *Toxicological Sciences* 165(1): 10–13.
- (37) Fritsche, E., Barenys, M., Klose, J., Masjosthusmann, S., Nimtz, L., Schmuck, M., Wuttke, S. & Tigges, J. (2018). Current Availability of Stem Cell-Based In Vitro Methods for Developmental Neurotoxicity (DNT) Testing. *Toxicological Sciences* 165/1: 21-30. doi: 10.1093/toxsci/kfy178.
- (38) Hessel, E. V. S., Staal, Y. C. M. & Piersma, A. H. (2018). Design and validation of an ontology-driven animal-free testing strategy for developmental neurotoxicity testing. *Toxicol Appl Pharmacol.* 354: 136-152. doi: 10.1016/j.taap.2018.03.013.

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 unseren Tierrechte-Newsletter und folgen Sie uns auf Facebook: 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 | www.tierrechte.de

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